



## 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-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

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

par **Fatima Dahboul**

**Evaluations physico-chimique, biochimique et pharmacologique  
de *S*-nitrosothiols : rôle des enzymes membranaires dans la  
libération de l'oxyde nitrique**

**Le 12 décembre 2013**

**Membres du jury :**

Rapporteurs :	Mme Céline DEMOUGEOT	PRU, Université de Franche-Comté, Besançon
	M Jean-Luc DECOUT	PRU, Université Joseph Fourier-Grenoble, Grenoble
Examineurs :	Mme Caroline PERRIN-SARRADO	MCU, EA 3452, Université de Lorraine, co-Directeur de thèse
	M Pierre LEROY	PRU, EA 3452, Université de Lorraine, Directeur de thèse
	Mme Denyse BAGREL	PRU, Université de Lorraine, Metz
	M Jean-François COLLET	PRU, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve
Membres invités :	M Alfonso POMPELLA	MD PhD, Université de Pise, Pisa
	Mme Caroline GAUCHER	MCU, EA 3452, Université de Lorraine, Nancy

-----  
**EA 3452 CITHEFOR ; Cibles Thérapeutiques, Formulation et Expertise Préclinique du  
Médicament – 5, rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France**

**Ce travail a été réalisé dans l'EA CITHEFOR  
3452, sous la direction du Pr Pierre Leroy et du  
Dr Caroline Perrin-Sarrado.**

# Remerciements

*Je n'aurais jamais pu réaliser cette thèse sans l'aide et l'encouragement d'un grand nombre de personnes à qui je tiens à exprimer mes vifs remerciements.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur Pierre LEROY, mon directeur de thèse, pour m'avoir conseillée, encouragée et soutenue tout au long de la thèse avec patience et disponibilité. Je le remercie aussi pour son organisation qui m'a évité le maximum de soucis administratifs. Cette thèse n'aurait jamais été ce qu'elle est sans lui.*

*Je remercie également Madame le Docteur Caroline PERRIN-SARRADO, ma co-directrice de thèse, pour ses conseils, sa disponibilité, son soutien, son humanité, sa bonne humeur et surtout son courage.*

*Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Philippe MAINCENT de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche mais aussi pour ses encouragements.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Madame le Professeur Céline DEMOUGEOT et Monsieur le professeur Jean-Luc DECOUT pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Jean-François COLLET, Monsieur le Professeur Alfonso POMPELLA et Madame le Professeur Denyse BAGREL de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.*

*Je souhaite remercier vivement Madame le Professeur Isabelle LARTAUD pour sa grande rigueur scientifique et ses encouragements. Je remercie également Madame le Docteur Caroline GAUCHER et Madame le Docteur Ariane BOUDIER pour leur nombreux conseils scientifiques, leur bonne humeur et leur gentillesse.*

*Je remercie Monsieur le Professeur Raphaël SCHNEIDER pour les synthèses des donneurs d'oxyde nitrique, sans lesquels ce travail n'aurait pu être effectué.*

*Je remercie également tous les autres membres de l'EA 3452 et tout particulièrement Anne SAPIN-MINET (MCU), François DUPUIS (MCU), Philippe GIUMMELLY (ingenieur) Isabelle FRIES, Patrick LIMINANA (techniciens), Marianne PARENT, Juliana*

*TOURNEBIZE, Wen WU, Ramia SAFAR (doctorants) pour leur bonne humeur, l'ambiance et leur disponibilité.*

*Je remercie les anciens stagiaires (Anaïs, Joanna, Mélanie, Loïc, Bertrand, Adrien, Mariem, Arnaud) qui ont contribué à ce travail.*

*Merci à mes amis qui m'ont entourée lors de ce travail.*

*Pour finir, je dédie ce travail de thèse à ma mère, mon père, mes deux frères et ma sœur, et les autres membres de ma famille. Ils m'ont toujours soutenue pour atteindre mes objectifs. Je les remercie.*

# Table des Matières

Travaux scientifiques .....	8
Liste des tableaux .....	10
Liste des figures .....	11
Liste des abréviations .....	14
Introduction générale.....	16
Chapitre I. Etude bibliographique.....	21
1. L'oxyde nitrique : généralités .....	22
1.1. Propriétés chimiques, biosynthèse et rôles physiologiques de l'oxyde nitrique .....	22
1.1.1. Propriétés chimiques de l'oxyde nitrique .....	22
1.1.2. Biosynthèse de l'oxyde nitrique.....	23
1.1.3. Rôles physiologiques de l'oxyde nitrique et ses voies de signalisation.....	25
1.1.3.1. Nitrosylation .....	27
1.1.3.2. Nitrosation .....	27
1.1.3.3. Nitration.....	30
2. Les donneurs d'oxyde nitrique .....	31
2.1. Les donneurs d'oxyde nitrique utilisés en thérapeutique .....	31
2.2. Les donneurs d'oxyde nitrique en cours de développement.....	34
2.3. Les <i>S</i> -nitrosothiols .....	36
2.3.1. Effets biologiques des <i>S</i> -nitrosothiols .....	37
2.3.2. Méthodes de synthèse des <i>S</i> -nitrosothiols.....	40
2.3.3. Les différents paramètres impliqués dans la dénitrosation des <i>S</i> -nitrosothiols... 41	
2.3.3.1. Paramètres non enzymatiques .....	41
2.3.3.2. Paramètres enzymatiques .....	46
2.3.3.3. Article 1. C. Gaucher, A. Boudier, F. Dahboul, M. Parent, P. Leroy. <i>S</i> -nitrosation/dénitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of <i>S</i> -nitrosothiols. <i>Curr. Pharm. Des.</i> 2013;19(3):458-72. ....	54

Chapitre II. Les <i>S</i> -nitrosothiols : synthèse, caractérisation physico-chimique et étude de stabilité .....	69
1. Introduction .....	70
2. Article 2. M. Parent, F. Dahboul, R. Schneider, I. Clarot, P. Maincent, P. Leroy, A. Boudier. A Complete Physicochemical Identity Card of <i>S</i> -nitrosoglutathione. <i>Curr. Pharm. Anal.</i> 2013;9(1)31-42.....	78
3. Article 3. F. Dahboul, C. Perrin-Sarrado, A. Boudier, I. Lartaud, R. Schneider, P. Leroy. <i>S,S'</i> -dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other <i>S</i> -nitrosothiols, soumise à <i>Eur. J. Pharmacol.</i> .....	90
4. Résultats complémentaires du chapitre II.....	128
4.1. Etude de la stabilité des <i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acétylcystéine et <i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acétylpénicillamine .....	128
4.2. Etude de la stabilité des <i>S</i> -nitrosothiols dans les conditions expérimentales du modèle <i>ex vivo</i> .....	131
4.2.1. Conditions opératoires.....	131
4.2.2. Résultats et discussion.....	132
4.3. Effet des cyclodextrines sur la stabilité des <i>S</i> -nitrosothiols et leur effect protecteur contre la dégradation enzymatique .....	134
4.3.1. Conditions opératoires.....	134
4.3.2. Résultats et discussion.....	135
Chapitre III. Evaluations biochimique et pharmacologique des <i>S</i> -nitrosothiols : rôle des enzymes dans les effets vasculaires .....	138
1. Introduction .....	139
2. Article 4. F. Dahboul, P. Leroy, K. M. Gate, A. Boudier, C. Gaucher, P. Liminana, I. Lartaud, A. Pompella, C. Perrin-Sarrado. Endothelial $\gamma$ -Glutamyltransferase Contributes to the Vasorelaxant Effect of <i>S</i> -Nitrosoglutathione in Rat Aorta. <i>PLoS One</i> 2012;7(9):e43190. ....	142
3. Résultats complémentaires du chapitre III .....	150
3.1. Etude <i>in vitro</i> des interactions du <i>S</i> -nitrosoglutathion avec la $\gamma$ -glutamyltransférase purifiée.....	150
3.1.1. Conditions opératoires.....	150
3.1.2. Résultats et discussion.....	150

3.2. Mesure de l'activité de la protéine disulfure isomérase purifiée par le test de turbidité à l'insuline.....	151
3.2.1. Conditions opératoires.....	152
3.2.2. Résultats et discussion.....	152
3.3. Etude <i>in vitro</i> des interactions du <i>S</i> -nitrosoglutathion avec la protéine disulfure isomérase purifiée .....	154
3.3.1. Conditions opératoires.....	154
3.3.2. Résultats et discussion.....	155
3.4. Evaluation du rôle de la protéine disulfure isomérase dans les effets vasculaires du <i>S</i> -nitrosoglutathion .....	156
3.4.1. Conditions opératoires.....	156
3.4.2. Résultats et discussion.....	156
Chapitre IV. Discussion générale, conclusion et perspectives.....	158
Références bibliographiques .....	171
Résumé/Abstract .....	190



# Travaux scientifiques

## Publications internationales

1. F. Dahboul, P. Leroy, K. M. Gate, A. Boudier, C. Gaucher, P. Liminana, I. Lartaud, A. Pompella, C. Perrin-Sarrado. Endothelial  $\gamma$ -Glutamyltransferase Contributes to the Vasorelaxant Effect of *S*-Nitrosoglutathione in Rat Aorta. *PLoS One* 2012;7(9):e43190.
2. M. Parent, F. Dahboul, R. Schneider, I. Clarot, P. Maincent, P. Leroy, A. Boudier. A Complete Physicochemical Identity Card of *S*-nitrosoglutathione. *Curr. Pharm. Anal.* 2013;9(1)31-42.
3. C. Gaucher, A. Boudier, F. Dahboul, M. Parent, P. Leroy. *S*-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of *S*-nitrosothiols. *Curr. Pharm. Des.* 2013;19(3):458-72.

## Soumise

4. F. Dahboul, C. Perrin-Sarrado, A. Boudier, I. Lartaud, R. Schneider, P. Leroy. *S,S'*-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other *S*-nitrosothiols, soumise à *Eur. J. Pharmacol.*

## Communications orales\* et affichées

\*F. Dahboul, C. Perrin-Sarrado, K. Maguin Gate, A. Boudier, C. Gaucher-di Stasio, P. Liminana, I. Lartaud, A. Pompella, P. Leroy. In which extent gamma-glutamyltransferase contributes to the vasorelaxant effect of *S*-nitrosoglutathione? Artery 11, Paris - France, 13 - 15 Octobre 2011.

F. Dahboul, P. Leroy, K. Maguin Gate, A. Boudier, C. Gaucher-di Stasio, P. Liminana, I. Lartaud, A. Pompella, C. Perrin-Sarrado. Endothelial gamma-glutamyltransferase contributes

to the vasorelaxant effect of *S*-nitrosoglutathione in rat aorta. Congrès de physiologie, de pharmacologie et de thérapeutique. Dijon - France, 4 – 6 Avril 2012.

\*F. Dahboul, C. Perrin-Sarrado, P. Leroy. Biological and pharmacological evaluation of a new *S*-nitrosothiol. Meeting of redox mechanism and drug development. Nancy - France, 5 July 2012.

F. Dahboul, C. Perrin-Sarrado, C. Gaucher, M. Parent, J.-F. Collet, A. Boudier, P. Leroy . A newly designed dinitrosothiol acting as an efficient vasorelaxant agent. Society for Free Radical Research International. London - England, 6 - 9 September 2012.

\*F. Dahboul, C. Perrin-Sarrado, A. Boudier, I. Lartaud, R. Schneider, P. Leroy. *S,S'*-dinitrosobucillamine: a new nitric oxide donor acting as an efficient vasorelaxant agent. Congrès de physiologie, de pharmacologie et de thérapeutique. Angers - France, 22 - 24 Avril 2013.

# Liste des tableaux

## De la partie écrite en français

<b>Tableau 1</b> : Principales caractéristiques des isoformes de NO synthases (NOS). .....	25
<b>Tableau 2</b> : Principales caractéristiques des donneurs d'oxyde nitrique. ....	32
<b>Tableau 3</b> : Principales caractéristiques des rédoxines à forte activité dénitrifiante : la thiorédoxine et la protéine disulfure isomérase. ....	52
<b>Tableau 4</b> : Propriétés physicochimiques des <i>S</i> -nitrosothiols (GSNO et BUC(NO) <sub>2</sub> ). ....	73
<b>Tableau 5</b> : Méthodes de dosage des RSNO et des espèces réactives dérivées de <sup>•</sup> NO utilisées au cours des présents travaux. ....	133
<b>Tableau 6</b> : Détermination de la constante de complexation entre cyclodextrines et <i>S</i> -nitrosothiols. ....	135
<b>Tableau 7</b> : Etude de l'interaction entre la PDI réduite et le GSNO en absence ou présence de bacitracine. Le milieu réactionnel contient de la PDI purifiée (1 μM), du GSNO (5 μM) en présence ou en absence de bacitracine (100 μM) préparé dans un tampon phosphate (10 mM) pH 7,4. La réaction est suivie en mesurant la diminution de l'intensité de la fluorescence intrinsèque de la protéine réduite ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{ém}} = 340 \text{ nm}$ ) à $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 min. La libération de <sup>•</sup> NO a été mesurée par spectrofluorimétrie (DAN) ( $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{ém}} = 415 \text{ nm}$ ) ( $n = 3$ , $*p < 0,05$ ). ....	155
<b>Tableau 8</b> : Utilisation du <i>S</i> -nitrosoglutathion dans des essais cliniques. ....	160
<b>Tableau 9</b> : Modulation de l'activité / expression des enzymes GGT et rédoxines en pathologie vasculaire. ....	167

# Liste des figures

## De la partie écrite en français

- Figure 1** : Production d'oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ) par les NO synthases (NOS). ..... 24
- Figure 2** : Concentrations d'oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ) produites par les NO synthases (NOS) d'après Jourdain *et al.* (1999). ..... 26
- Figure 3** : Voie de signalisation de l'oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ), quelques exemples de cibles cellulaires, réactions associées et principaux effets physiologiques. .... 30
- Figure 4**: Intérêts des *S*-nitrosothiols comme donneurs de l'oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ) ..... 36
- Figure 5** : Formules de résonance (A) et structure chimique (B) des *S*-nitrosothiols (RSNO). ..... 42
- Figure 6** : Structure du complexe théoriquement formé entre le glutathion oxydé et le  $\text{Cu}^{2+}$ . D'après Noble *et al.* (1999). ..... 44
- Figure 7** : Les différents paramètres environnementaux et enzymatiques jouant un rôle dans le métabolisme des *S*-nitrosothiols (RSNO). Oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ), *S*-nitrosoglutathion (GSNO), *S*-nitrosocystéinyglycine (CysGlyNO), *S*-nitrosocystéine (CysNO),  $\gamma$ -glutamyltransférase (GGT), sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ), protéine disulfure isomérase (PDI), système L de transport des acides aminés (L-AT), thiorédoxine (Trx), glutathion réduit (GSH), guanylate cyclase soluble (GCs), GSNO réductase (GSNOR). ..... 46
- Figure 8** : Structure de la  $\gamma$ -glutamyltransférase. .... 47
- Figure 9** : Etude de stabilité des solutions de NACNO ( $\square$ ) et SNAP ( $\triangle$ ) (10 mM) dans différentes conditions : A) 4 °C, pH 7,4, B) 37 °C, pH 7,4, C) 4 °C, pH 0,3, D) 4 °C, pH 7,4 avec  $\text{Cu}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ). Les résultats sont donnés en pourcentage de RSNO restant et évalués par spectrophotométrie à 334 nm pour le NACNO et 340 nm pour le SNAP (n = 3). ..... 130
- Figure 10** : Evolution de la concentration en GSNO ( $\square$ ), BUC(NO)<sub>2</sub> ( $\blacksquare$ ), SNAP ( $\blacksquare$ ) et NACNO ( $\blacksquare$ ) ( $10^{-7}$  M) en fonction du temps d'incubation dans les conditions expérimentales des études de vasorelaxation (solution de Krebs pH 7,4, 37 °C et oxygénation (95 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$ )) par la méthode spectrofluorimétrique ( $\text{Hg}^{2+}$  + DAN) ( $\lambda_{\text{ex}} = 375$  nm ;  $\lambda_{\text{ém}} = 415$  nm) (n = 3). ..... 132

**Figure 11 :** A) Etude de stabilité des RSNO (10 mM) en absence (□) et en présence (■) de HP-β-CD (36 mM) dans un tampon phosphate (10 mM) pH 7,4 à 23 ± 1 °C après 28 h d'incubation. B) Interaction entre GSNO (1 mM) et GGT de rein de bœuf (0,4 µg/mL) en absence (□) et en présence (■) d'α-CD (36 mM) dans un tampon Tris (10 mM) pH 7,4 contenant de la glycylglycine (20 mM) et de Cu<sup>2+</sup> (10 µM) à 37 °C après 2 h d'incubation. C) Interaction entre Trx-1 (1 µM) et RSNO (5 µM) en absence (□) et en présence (■) de HP-β-CD (160 mM) dans un tampon Tris (10 mM) pH 7,4 à 23 ± 1 °C après 2 h d'incubation. (n = 3, \*p < 0,05)..... 137

**Figure 12 :** Evolution des concentrations de GSNO (◆) mesurées par spectrophotométrie UV, et des concentrations des espèces dérivées du <sup>•</sup>NO (■) mesurées par spectrofluorimétrie (DAN) (λ<sub>ex</sub> = 375 nm, λ<sub>ém</sub> = 415 nm) en fonction du temps sous l'action de la GGT purifiée de rein de bœuf (0,4 µg/mL) dans un tampon phosphate (10 mM) pH 7,4, à 37 °C et en présence de Cu<sup>2+</sup> (10 µM) et de glycylglycine (20 mM) (n = 3)..... 151

**Figure 13 :** Mécanisme de réduction de l'insuline par la protéine disulfure isomérase (PDI) (1). Réduction de la PDI par le *D,L*-dithiothréitol (DTT) (2). ..... 151

**Figure 14 :** A) Suivi de la réduction de l'insuline (0,13 mM) en fonction du temps en présence de différentes concentrations de PDI purifiée de foie de bœuf (2 (◇), 1 (□), 0,5 (Δ) µM) (n = 3) en présence de DTT (1 mM) dans un tampon phosphate (10 mM) pH 7,4 et à 23 ± 2 °C. B) Tableau récapitulatif des valeurs de temps de latence (min), V<sub>max</sub> (UA/min) et activité enzymatique de la PDI (UA/min<sup>2</sup>). ..... 153

**Figure 15 :** A) Suivi de la réduction de l'insuline (0,13 mM) en fonction du temps en présence d'homogénats de foie de rat Wistar et de DTT (1 mM) avec (□) ou sans (Δ) bacitracine (100 µM) (n = 3) dans un tampon phosphate (10 mM) pH 7,4 à 23 ± 2 °C. B) Tableau récapitulatif des valeurs de temps de latence (min), de V<sub>max</sub> (UA/min), d'activité enzymatique (UA/min<sup>2</sup>) et spécifique des rédoxines (UA/min<sup>2</sup>/mg de protéines). ..... 154

**Figure 16 :** Rôle de la PDI dans les effets vasculaires du GSNO. A) production de <sup>•</sup>NO après incubation des anneaux aortiques isolés de rat avec du GSNO (1 mM) en absence ou en présence de bacitracine (100 µM). B et C) sections d'anneaux aortiques chargés pendant 2 h avec DAF-2 DA (10 µM) montrant les contrôles en absence et en présence de bacitracine, respectivement. D, E) sections d'anneaux aortiques de rat chargés pendant 2 h avec DAF-2 DA 10 µM montrant la production de <sup>•</sup>NO après 15 min d'incubation avec du GSNO (1 mM) en absence ou en présence de bacitracine (100 µM), respectivement. Toutes les images ont été prises avec le même temps d'exposition, gain et offset. F) courbe concentration-réponse de GSNO (0,0001 – 100 µM) obtenue sur des anneaux aortiques isolés de rat précontractés à la phényléphrine 10 µM en présence (■) ou en absence (▲) de bacitracine. (n = 3 – 12, \*p < 0,05). ..... 157

**Figure 17 :** Méthode de synthèse de GSNO et BUC(NO)<sub>2</sub>. ..... 161

**Figure 18** : Emplacement cellulaire de la thiorédoxine dans des conditions de non stress (gauche) et de stress (droite). Thiorédoxine (Trx), thioredoxin interacting protein binding (TXNIP). D'après Madrigal-Matute *et al.* (2012)..... 168

**Figure 19** : Impact de la GGT dans les effets vasorelaxants du GSNO chez les rats spontanément hypertendus (SHR, ■) et les rats Wistar-Kyoto (WKY, □). Les effets des modulateurs de la GGT dans les deux groupes de rat ont été analysés par une ANOVA 2 facteurs (variables = modulateurs GGT et hypertension) (p hypertension < 0,0001, p modulateurs GGT < 0,001 et p interaction > 0,05) (n = 6 - 12)..... 170

# Liste des abréviations

AlbSNO	<i>S</i> -nitrosoalbumine
BUC(NO) <sub>2</sub>	<i>S,S'</i> -dinitrosobucillamine
BUC(SH) <sub>2</sub>	Bucillamine
CE50	Concentration produisant 50 % de l'effet maximum de vasorelaxation
CD	Cyclodextrines
CLHP	Chromatographie en phase liquide haute performance
CysGlyNO	<i>S</i> -nitrosocystéinylglycine
CysNO	<i>S</i> -nitrosocystéine
DAF	4,5-diaminofluorescéine
DAF-2 DA	4,5-diaminofluorescéine diacétate
DAN	2,3-diaminonaphtalène
DTT	<i>D,L</i> dithiothréitol
EDRF	Endothelial-derived relaxing factor
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GCs	Guanylate cyclase soluble
GGT	$\gamma$ -glutamyltransférase
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GSH	Glutathion
GSNO	<i>S</i> -nitrosoglutathion
GSNOR	GSNO réductase
GSSG	Glutathion oxydé
<sup>1</sup> H RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton
HbSNO	<i>S</i> -nitrosohémoglobine
L-AT	Système L de transport des acides aminés
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
NACNO	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acétylcystéine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<sup>*</sup> NO	Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
NONOates	Diazéniumdiolates

NOS	Nitric oxide synthase (eNOS : endothéliale ; iNOS : inductible ; nNOS : neuronale)
PDI	Protéine disulfure isomérase
RSNO	<i>S</i> -nitrosothiols
SBC	Complexe sérine borate
SHR	Rats spontanément hypertendus
SIN-1	3-morpholino-sydnonimine
SM	Spectrométrie de masse
SNAP	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acétylpénicillamine
SNOPC	<i>S</i> -nitrosophytochélatines
SNP	Nitroprussiate de sodium
Trx	Thiorédoxine
TrxR	Thiorédoxine réductase
u.m.a.	Unité de masse atomique
WKY	Wistar-Kyoto



# Introduction générale

Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique ( $\text{NO}$ ) est un médiateur physiologique impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques dont le maintien de l'homéostasie vasculaire. Le  $\text{NO}$  est produit dans l'endothélium par la NO synthase endothéliale (eNOS). Ce messenger gazeux, radicalaire et ubiquitaire agit comme un puissant vasodilatateur, régulant le tonus vasculaire, prévient l'agrégation et l'adhésion plaquettaires, et limite l'inflammation et les phénomènes de prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Moncada et Higgs, 1997, Guzik *et al.*, 2003).

La synthèse de  $\text{NO}$  dans l'endothélium diminue avec l'âge (Bredt et Snyder, 1994). Des modifications de sa biodisponibilité sont des facteurs essentiels impliqués dans de nombreuses pathologies vasculaires en particulier l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et l'angor (Moncada *et al.*, 1991). Ces pathologies vasculaires touchent dorénavant un nombre croissant de personnes en particulier en Europe, et elles représentent une des principales causes de morbi-mortalité (Laslett *et al.*, 2012).

Pour pallier ce déficit en  $\text{NO}$ , une des approches thérapeutiques est d'apporter le  $\text{NO}$  de manière exogène à partir de molécules « donneurs de  $\text{NO}$  ». Différents médicaments sont actuellement utilisés : les dérivés nitrés, les sydnonimines et le nicorandil. Cependant, ces molécules présentent les inconvénients suivants : une demi-vie brève, l'induction d'un phénomène de tolérance observé avec les dérivés nitrés et l'utilisation de doses élevées susceptibles d'induire un stress oxydant. Pour remédier à ces inconvénients, d'autres molécules donnant du  $\text{NO}$  sont à l'étude. Parmi elles, les *S*-nitrosothiols (RSNO) représentent une famille chimique intéressante car ils présentent une stabilité supérieure à celle du  $\text{NO}$  et l'avantage de ne pas induire de phénomène de tolérance (Bauer et Fung, 1991a, Hanspal *et al.*, 2002). Par ailleurs, de nombreux RSNO existent de manière endogène et de plus en plus de travaux suggèrent qu'ils jouent un rôle physiologique important dans le stockage et le transport de  $\text{NO}$ . Ces RSNO existant au niveau physiologique sont donc susceptibles d'être dénués de toxicité (Stamler *et al.*, 1992a).

La libération de  $\text{NO}$  à partir de RSNO est induite par différents facteurs environnementaux comme le pH, la lumière, la température et les ions métalliques (Roy *et al.*, 1994, Megson *et al.*, 1997, Heikal *et al.*, 2009). Par ailleurs, de nombreux systèmes enzymatiques membranaires et cytosoliques sont également capables de décomposer les RSNO et de libérer

le  $\text{NO}$ . Parmi eux, la thiorédoxine (Trx) et la protéine disulfure isomérase (PDI), appartenant à la famille des rédoxines, sont impliquées dans la régulation redox du groupement thiol dans la cellule et métabolisent les RSNO de manière non spécifique (Arner et Holmgren, 2000, Sengupta *et al.*, 2007). En revanche, la  $\gamma$ -glutamyltransférase (GGT) et la GSNO réductase (GSNOR) sont des enzymes respectivement membranaires et cytosoliques impliquées spécifiquement dans la dégradation d'un RSNO endogène, le *S*-nitrosoglutathion (GSNO).

Différentes études ont mis en évidence dans des conditions physiologiques, la libération de  $\text{NO}$  et les effets vasorelaxants induits par les RSNO au niveau vasculaire dans des modèles de vaisseaux isolés (Al-S'adoni *et al.*, 2000, Sogo *et al.*, 2000, Tullett *et al.*, 2001, Alencar *et al.*, 2003, Heikal *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'administration *in vivo* de RSNO chez l'animal se traduit par une diminution de la pression artérielle (Ishibashi *et al.*, 2011, Nossaman *et al.*, 2012). Cependant, les mécanismes cellulaires impliqués dans l'effet vasorelaxant des RSNO, en particulier le rôle des enzymes responsables de la libération de  $\text{NO}$  à partir des RSNO, sont encore peu explorés dans la littérature.

Dans ce contexte, nous avons cherché à travers nos travaux de thèse, à étudier le rôle de deux enzymes membranaires, la GGT et la PDI, dans la libération de  $\text{NO}$  à partir des RSNO et leurs effets vasorelaxants. Ces travaux débouchent sur une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la dénitrosation des RSNO dans un contexte physiologique et permettront de mieux appréhender l'utilisation des RSNO en thérapeutique. Nous avons ciblé notre étude sur la GGT et la PDI, car non seulement elles jouent un rôle important dans la dénitrosation des RSNO, mais de par leur localisation sur la membrane plasmique, elles sont impliquées dans la libération et le passage du  $\text{NO}$  du milieu extracellulaire vers le compartiment cytosolique où il va ensuite exercer ses effets sur des protéines cibles. Nos études portant sur la GGT et la PDI sont d'autant plus importantes que des modulations de l'activité de ces enzymes ont été rapportées dans différentes pathologies vasculaires. En effet, des études épidémiologiques montrent que l'activité de la GGT plasmatique, connue comme marqueur d'atteintes hépatiques, est augmentée dans différentes pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle (Ermiš *et al.*, 2012) et l'athérosclérose (Franzini *et al.*, 2009). Cette augmentation d'activité plasmatique de la GGT a été corrélée à une augmentation de son activité dans la plaque d'athérome (Franzini *et al.*, 2009). En ce qui concerne la PDI, des études expérimentales ont récemment montré qu'une augmentation de l'activité PDI était associée au développement d'un stress oxydant, processus impliqué dans de nombreuses pathologies vasculaires (Janiszewski *et al.*, 2005).

Nous nous attacherons à étudier les effets vasorelaxants et les voies enzymatiques mises en jeu dans la dénitrosation de deux RSNO présentant des voies métaboliques différentes : (i) le GSNO, un mononitrosothiol endogène de faible masse moléculaire produit dans l'organisme par nitrosation du glutathion (GSH). Le GSNO est présent dans la cellule et dans le compartiment sanguin, où il est en équilibre avec d'autres RSNO de masse moléculaire élevée, principalement la *S*-nitrosoalbumine (AlbSNO). Existant de façon physiologique, il représente donc un choix logique pour le développement de nouveaux donneurs du  $\text{NO}$ . Il est considéré actuellement comme un "leader" en terme de potentiel thérapeutique et comme outil pour étudier les mécanismes biochimiques et les propriétés pharmacologiques des RSNO (Nikitovic et Holmgren, 1996, Alencar *et al.*, 2003, Angeli *et al.*, 2009).

(ii) la *S,S'*-dinitrosobucillamine ( $\text{BUC}(\text{NO})_2$ ), une molécule originale non décrite dans la littérature que nous avons synthétisée à partir d'un dithiol : la bucillamine ( $\text{BUC}(\text{SH})_2$ ). Ce dithiol présente plusieurs intérêts pour le développement d'un nouveau RSNO. Tout d'abord, il possède dans sa structure deux groupements thiols capables d'être nitrosés, ce qui offre au *S*-dinitrosothiol correspondant la capacité de libérer une plus grande quantité de  $\text{NO}$ . De plus,  $\text{BUC}(\text{SH})_2$  est un composé plus lipophile que la plupart des RSNO décrits dans la littérature (Al-Sa'doni *et al.*, 2000, Alencar *et al.*, 2003, Heikal *et al.*, 2011, Gaucher *et al.*, 2013), ce qui devrait favoriser son passage membranaire et son action au niveau intracellulaire. Enfin,  $\text{BUC}(\text{SH})_2$  possède des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires qui pourraient être mises à profit dans un contexte pathologique (Mazor *et al.*, 2006).

Les RSNO étudiés ont été synthétisés au laboratoire et dans une démarche de validation de cette synthèse, nous avons effectué une caractérisation physico-chimique approfondie pour chacun d'entre eux. La structure globale de la molécule a été vérifiée par spectrométrie de masse (SM), puis par analyse élémentaire et par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton ( $^1\text{H}$  RMN). La présence de la liaison S-NO a été par la suite vérifiée en spectrométrie UV-visible, par dichroïsme circulaire et par spectroscopie IR à transformation de Fourier, ainsi que par analyse thermique. Enfin, la pureté du produit, l'identification et la quantification des impuretés présentes ont été déterminées par spectrophotocolorimétrie et par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP). L'ensemble de cette caractérisation physico-chimique nous a permis de valider notre méthode de synthèse du GSNO et de la  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  et de les utiliser en toute sécurité dans les études *in vitro* et *ex vivo*. Après la synthèse et la caractérisation physico-chimique des RSNO, les propriétés pharmacologiques des RSNO ainsi que les mécanismes enzymatiques impliqués au niveau

vasculaire dans la libération de  $\text{NO}$  ont été évalués *in vitro* et *ex vivo* en situation physiologique sur un modèle d'anneau aortique isolé de rat.

Nos travaux de thèse ont donc nécessité une approche multidisciplinaire associant la physico-chimie, la biochimie et la pharmacologie et s'inscrivent dans un projet de l'équipe d'accueil EA CITHEFOR 3452 validé par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) : projet NanoSNO « Formulation nanoparticulaire de *S*-nitrosothiols en vue d'améliorer la biodisponibilité de l'oxyde nitrique. Evaluation toxicologique et pharmacologique ».

Ce manuscrit rassemblant les résultats obtenus est organisé en quatre chapitres.

Le **premier chapitre** est consacré à l'état de l'art. Il s'agit dans un premier temps de présenter les propriétés générales du  $\text{NO}$ , en présentant notamment les effets biochimiques qu'il engendre au niveau intra et extracellulaire. Nous présentons également les avantages et les inconvénients des médicaments « donneurs de  $\text{NO}$  » existant actuellement sur le marché ainsi que les différentes familles de nouvelles molécules actuellement à l'étude avec un intérêt particulier pour les RSNO. Dans un deuxième temps, les mécanismes enzymatiques et non enzymatiques intervenant dans la libération de  $\text{NO}$  à partir des RSNO sont exposés. Enfin, l'importance des phénomènes de nitrosation et dénitrosation en physiologie et en pathologie cardiovasculaire ainsi que les stratégies de développement d'un RSNO à fort potentiel thérapeutique sont exposées. Ce dernier aspect a fait l'objet d'une revue générale publiée dans *Curr. Pharm. Des.* (Gaucher *et al.*, 2013) : *S*-nitrosation / *S*-denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of *S*-nitrosothiols.

Le **second chapitre** correspond à la première partie de notre travail expérimental. Il est dédié à la synthèse des RSNO (GSNO et  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ ) ainsi qu'à leur caractérisation physico-chimique approfondie. Ces études ont permis de valider le protocole de préparation de ces RSNO ainsi que les différentes méthodes d'analyses colorimétrique et chromatographique nécessaires à leur contrôle et garantissant leur usage en toute sécurité dans les études biochimique et pharmacologique ultérieures. Ces résultats font l'objet de deux publications, l'une publiée dans *Curr. Pharm. Anal.* (Parent *et al.*, A Complete Physicochemical Identity Card of *S*-nitrosoglutathione), et la seconde soumise à *Eur. J. Pharmacol.* (Dahboul *et al.*, *S,S'*-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other *S*-nitrosothiols).

Le **troisième chapitre** rapporte nos travaux consacrés aux études biochimique et pharmacologique des RSNO. Dans un premier temps, des études *in vitro* ont été menées afin d'évaluer l'impact de deux enzymes purifiées, GGT et PDI, dans le métabolisme des RSNO. Dans un second temps, les propriétés vasorelaxantes des RSNO et le rôle de ces enzymes dans les effets pharmacologiques des RSNO ont été déterminés *ex vivo* à l'aide d'un modèle d'anneau aortique isolé de rat. Ces études correspondent à un article publié dans *PlosOne* (Dahboul *et al.*, Endothelial  $\gamma$ -glutamyltransferase contributes to the vasorelaxant effect of *S*-nitrosoglutathione in rat aorta) et à l'article soumis à *Eur. J. Pharmacol.* cité précédemment (Dahboul *et al.*, *S,S'*-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other *S*-nitrosothiols).

Le **quatrième chapitre** correspond à une discussion générale, présentant les faits marquants de nos travaux. Les résultats obtenus sont mis en parallèle à ceux de la littérature et les perspectives du travail sont évoquées. Sur ce dernier point, la poursuite de ce travail consistant à étudier l'impact des enzymes dénitrosantes (GGT et PDI) dans les effets des RSNO en situation pathologique comme l'hypertension est détaillée. En effet, deux questions principales se posent : 1) les effets vasculaires des RSNO sont-ils identiques dans une situation pathologique ? 2) les activités des enzymes impliquées dans l'effet vasculaire des RSNO sont-elles modifiées au niveau des vaisseaux dans une situation pathologique ? Des données bibliographiques et quelques résultats préliminaires sont présentés dans ce chapitre.

# **Chapitre I.**

## **Etude bibliographique**

## 1. L'oxyde nitrique : généralités

L'oxyde nitrique a envahi le domaine de la signalisation cellulaire dans la biologie de nombreux systèmes. En 1980, Furchgott et Zawadzki ont montré que l'action vasodilatatrice de l'acétylcholine nécessitait la présence de l'endothélium et mettait en jeu la libération d'une substance alors nommée endothelium-derived relaxing factor (EDRF) (Furchgott et Zawadzki, 1980). La nature chimique de l'EDRF fut découverte en 1987 quand l'équipe de Furchgott et celle d'Ignarro indiquèrent indépendamment que l'EDRF et le  $\text{NO}$  avaient des propriétés biologiques très similaires (Ignarro *et al.*, 1987). L'équipe de Moncada, appartenant aux laboratoires de recherche de Wellcome à Beckenham, a confirmé que le  $\text{NO}$  est impliqué dans l'action biologique de l'EDRF et que son précurseur est la L-arginine (Palmer *et al.*, 1987). En parallèle, les travaux de Murad sur la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) ont permis d'élucider le mécanisme par lequel  $\text{NO}$  permet la relaxation des cellules musculaires lisses (Murad, 1986). L'intérêt croissant porté à cette molécule simple l'a fait désigner molécule de l'année par la revue internationale *Science* en 1992 et a valu à ses découvreurs le prix Nobel en 1998.

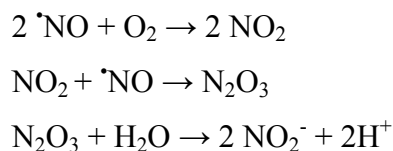
Aujourd'hui, on sait que le  $\text{NO}$  est également impliqué dans d'autres fonctions biologiques essentielles : neurotransmission, réponse immunitaire et agrégation plaquettaire. Quelles sont les propriétés chimiques de cette molécule ? Quels sont les facteurs qui contrôlent sa synthèse ? Quelles sont ses rôles physiologiques et ses voies de signalisation ? Comment peut-on pallier son déficit en cas de modifications de sa biodisponibilité ?

### 1.1. Propriétés chimiques, biosynthèse et rôles physiologiques de l'oxyde nitrique

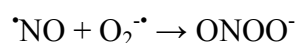
#### 1.1.1. Propriétés chimiques de l'oxyde nitrique

Le  $\text{NO}$  est un radical libre instable. En fonction de l'état d'équilibre d'oxydo-réduction dans lequel il se trouve, il se comporte soit comme un agent oxydant, soit comme un agent réducteur : en perdant ou en gagnant un électron, le radical  $\text{NO}$  se transforme respectivement en anion nitroxyle ( $\text{NO}^-$ ) ou en cation nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ), et ces différentes formes,  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}^-$  et  $\text{NO}^+$ , diffèrent dans leurs effets biologiques (Stamler *et al.*, 1992b). La demi-vie en milieu biologique est faible, de l'ordre de 1 à 3 s (Kelm et Scharder, 1990). Le  $\text{NO}$  réagit avec différentes molécules. Il réagit avec des métaux de transition, comme le fer, présents au niveau de différentes protéines telles que l'hémoglobine ou la guanylate cyclase soluble

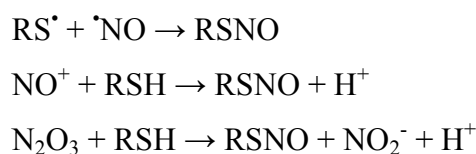
(GCs). En présence d'oxygène, le  $\cdot\text{NO}$  se transforme en dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ). Ce composé interagit avec le  $\cdot\text{NO}$  et produit un intermédiaire, le trioxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), qui réagit à son tour avec l'eau pour former l'ion nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ).



Le  $\cdot\text{NO}$  se combine également avec l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) pour générer le peroxyde nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ).



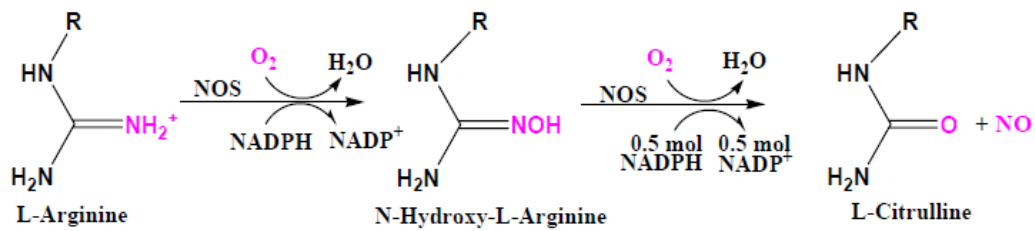
Enfin, le  $\cdot\text{NO}$  et ses dérivés, le  $\text{NO}^+$  et le  $\text{N}_2\text{O}_3$ , ont la capacité de réagir avec les thiols présents dans certains peptides ou protéines pour former les RSNO. Le « R » désigne une protéine, un peptide ou un acide aminé. Ils sont caractérisés par une liaison covalente entre le thiol d'un résidu cystéine et le  $\cdot\text{NO}$ .



### ***1.1.2. Biosynthèse de l'oxyde nitrique***

La production endogène de  $\cdot\text{NO}$  est catalysée par les  $\cdot\text{NO}$  synthases (NOS, EC 1.14.13.39). Les NOS appartiennent à la famille des oxygénases et sont présentes dans les cellules sous forme de monomères inactifs (Förstermann et Sessa, 2012). La forme active dimérique de NOS catalyse la réaction de formation de  $\cdot\text{NO}$  à partir de la L-arginine et du dioxygène ( $\text{O}_2$ ), en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), de tétrahydrobioptérine, de flavine mononucléotide, de flavine adénine dinucléotide et d'un groupement hème. Dans une première étape, la L-arginine est oxydée en  $\text{N}^{\omega}$ -hydroxy-L-arginine, qui dans une deuxième étape, est transformée en L-citrulline et  $\cdot\text{NO}$  (figure 1) (Schini et Vanhoutte, 1993).





**Figure 1** : Production d'oxyde nitrique ( $\text{NO}$ ) par les NO synthases (NOS).

A l'heure actuelle, trois isoformes de NOS ont été décrites (tableau 1). L'isoforme de type III (NOS3, NOS endothéliale ou eNOS) est présente majoritairement dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes (Förstermann et Munzel, 2006). L'isoforme de type I (NOS1, NOS neuronale ou nNOS) est exprimée majoritairement dans les neurones et également dans les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales (Förstermann et Sessa, 2012). Ces deux isoformes sont des enzymes constitutives et produisent de faibles concentrations de  $\text{NO}$  de façon transitoire. Leur activation nécessite la fixation du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline suite à une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. L'isoforme de type II (NOS2, NOS inducible ou iNOS) fonctionne indépendamment d'une augmentation de la concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle est induite dans de nombreux types de cellules après exposition à des composants bactériens ou des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 et le TNF alpha (Suschek *et al.*, 2002).

**Tableau 1** : Principales caractéristiques des isoformes de NO synthases (NOS).

	eNOS	nNOS	iNOS
<b>Expression</b>	Constitutive	Constitutive	Inductible
<b>Gène</b>	7q35-36	12q24.2-31	17q11.2-12
<b>Masse moléculaire (kDa)</b>	133	161	131
<b>Lieux d'expression</b>	Cellules endothéliales Cellules myocardiques Plaquettes Neurones	Cellules neuronales Cellules musculaires lisses Neutrophiles	Macrophages activés Monocytes, neutrophiles Cellules endothéliales Cellules musculaires lisses Cellules neuronales
<b>Rôle physiologique du 'NO produit</b>	Homéostasie vasculaire Vasorelaxation Antiagrégant plaquettaire	Neurotransmetteur Régulateur de la plasticité synaptique	Défense immunitaire
<b>Production de 'NO</b>	Faible	Faible	Forte
<b>Activation dépendante du complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline</b>	Oui	Oui	Non

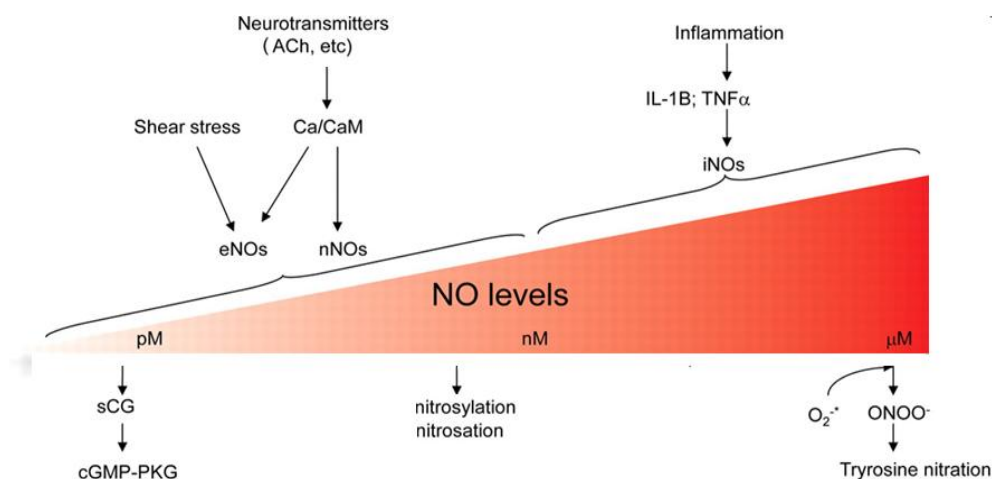
### *1.1.3. Rôles physiologiques de l'oxyde nitrique et ses voies de signalisation*

La production de 'NO par la cellule endothéliale est modulée par différents stimuli physiques et biologiques. Parmi les stimuli physiques, les forces mécaniques de cisaillement pariétal (shear stress) exercées par le flux sanguin sur les cellules endothéliales par l'intermédiaire des mécanorécepteurs de surface constituent l'un des principaux facteurs régulant la libération de 'NO (Davies, 1995, White et Frangos, 2007). La libération de 'NO est également stimulée par de nombreux facteurs biologiques comme l'acétylcholine, la noradrénaline, la vasopressine, la bradykinine, l'histamine, la sérotonine, l'ADP ou la thrombine.

Le 'NO est responsable de multiples effets sur l'organisme tant bénéfiques que potentiellement délétères. Dans des conditions physiologiques, le 'NO généré à faible concentration (de l'ordre du picomolaire à nanomolaire) (figure 2) de façon régulée et transitoire par la eNOS et la nNOS, joue un rôle majeur dans l'homéostasie vasculaire et

plaquettaire (Garg et Hassid, 1989, Loscalzo et Welch, 1995, Rajj, 2006) et dans le contrôle de l'activité neuronale et la plasticité synaptique. Le  $\cdot\text{NO}$  induit une relaxation au niveau des cellules musculaires lisses *via* sa diffusion à partir de l'endothélium. Cette diffusion a été longtemps considérée comme passive mais des études récentes ont montré l'existence d'un mécanisme actif au niveau des jonctions myoendothéliales impliquant l'hémoglobine et la cytochrome b5 réductase 3 (Straub *et al.*, 2012).

Dans des conditions pathologiques, le  $\cdot\text{NO}$  produit en concentration élevée (de l'ordre du micromolaire) (figure 2) par la iNOS est impliqué dans la réponse immunitaire et induit un effet cytotoxique sur les cellules bactériennes. Il provoque un stress oxydant et un stress nitrosant par l'intermédiaire de  $\text{ONOO}^-$  et de  $\text{N}_2\text{O}_3$ , respectivement (Jourd'heuil *et al.*, 1999, Pacher *et al.*, 2007). Un autre facteur qui participe aux effets délétères de  $\cdot\text{NO}$  est le découplage de la eNOS (par déplétion du cofacteur : le tétrahydrobioptérine) qui conduit à la production simultanée de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et de  $\cdot\text{NO}$ , à l'origine de la production de  $\text{ONOO}^-$  (Alp et Channon, 2004).



**Figure 2 :** Concentrations d'oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ) produites par les NO synthases (NOS) d'après Jourd'heuil *et al.* (1999).

Ces différents effets cellulaires résultent de l'interaction du  $\cdot\text{NO}$  avec des atomes métalliques, des groupements thiols ou d'autres radicaux libres *via* trois sortes de réactions: nitrosylation, nitrosation et nitration (figure 3). Il faut noter que les termes « nitrosation » et « nitrosylation » sont souvent employés dans la littérature indistinctement même si, du point de vue chimique, leur signification est différente. Cette situation a été discutée en détails dans

l'ouvrage de Jacob et Winyard (2009) et récemment abordée par Heinrich *et al.* (2013). Nous avons suivi leurs recommandations de nomenclature dans le présent manuscrit.

### **1.1.3.1. Nitrosylation**

La nitrosylation correspond à la réaction entre le  $\cdot\text{NO}$  et les métaux de transition comme le fer, le cuivre présents dans les protéines. De nombreuses protéines nitrosylées ont été identifiées à l'heure actuelle et ce processus revêt une grande importance physiologique (Martínez-Ruiz et Lamas 2004, Hess *et al.*, 2005, Foster *et al.*, 2009, Jacob et Winyard, 2009, Lima *et al.*, 2010). Par la suite, nous examinerons quelques exemples importants de protéines nitrosylées au niveau vasculaire dans des conditions non pathologiques.

- L'exemple le plus connu de nitrosylation est la liaison de  $\cdot\text{NO}$  avec le fer hémique de l'enzyme GCs, une hémoprotéine responsable d'une grande partie des effets du  $\cdot\text{NO}$ , dits GMPc-dépendants. Cette réaction aboutit à l'activation de l'enzyme qui transforme la guanosine triphosphate en GMPc. La GMPc active la protéine kinase G de type I qui phosphoryle alors la phosphatase des chaînes légères de la myosine. Celle-ci se trouve ainsi activée et déphosphoryle les chaînes légères de la myosine, entraînant une relaxation des muscles lisses (Murad, 1986). La GMPc inhibe également l'agrégation plaquettaire, la prolifération des cellules musculaires lisses, la migration/adhésion des monocytes et le remodelage vasculaire (Lima *et al.*, 2010).

- Le  $\cdot\text{NO}$  réagit également avec le cytochrome C de la chaîne respiratoire en compétition avec l'oxygène et inhibe le flux d'électrons de la chaîne respiratoire. Cette inhibition du cytochrome C est rapide, réversible et elle est associée à une diminution de l'apoptose de  $15 \pm 5 \%$  (Schonhoff *et al.*, 2003).

- Un autre exemple de nitrosylation est la réaction de  $\cdot\text{NO}$  avec la NADPH oxydase au niveau de sa sous-unité régulatrice : le p47phox. La NADPH oxydase est un complexe enzymatique permettant la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Cette nitrosylation provoque une diminution de l'activité de l'enzyme de  $30 \pm 5 \%$  ainsi qu'une diminution de la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$  de  $70 \pm 10 \%$  (Selemidis *et al.*, 2007).

### **1.1.3.2. Nitrosation**

La nitrosation est définie comme l'addition de  $\cdot\text{NO}$  ou de ses formes dérivées ( $\text{NO}^+$  et  $\text{N}_2\text{O}_3$ ) sur un résidu cystéine pour former des RSNO (Jacob et Winyard, 2009,

Tsikas *et al.*, 2012). Cette modification réversible sensible aux variations du statut redox est reconnue comme l'une des modifications post-traductionnelles régulant l'activité des protéines au même titre que la phosphorylation ou la glycosylation (Stamler *et al.*, 1997a, Seth et Stamler, 2011).

Chez les mammifères, les protéines cellulaires cibles régulées par nitrosation sont extrêmement variées (Foster *et al.*, 2009, Lima *et al.*, 2010). Bien que la plupart des protéines possèdent des résidus cystéine, toutes ne peuvent pas être nitrosées. En effet, la nitrosation est favorisée pour des résidus cystéine présents dans la chaîne latérale de la protéine facilement ionisable et se trouvant dans des compartiments hydrophobes (Stamler *et al.*, 1997a).

Par la suite, nous détaillerons quelques exemples importants de protéines cibles nitrosées au niveau vasculaire dans des conditions physiologiques.

Le  $\text{NO}$  nitrose des groupements thiols d'acides aminés, de peptides et de protéines cellulaires et circulantes, donnant ainsi naissance aux RSNO. Certains jouent un rôle dans le stockage et le transport du  $\text{NO}$ . Selon la classification de Tsikas *et al.* (2013), les RSNO de masse moléculaire élevée représentés par l'AlbSNO dans le plasma et la *S*-nitrosohémoglobine (HbSNO) dans les érythrocytes sont considérés comme les principales formes de stockage de  $\text{NO}$ . Par ailleurs, les RSNO de faible masse moléculaire comme la *S*-nitrosohomocystéine (HCysNO), le GSNO, la *S*-nitrosocystéinylglycine (CysGlyNO) et la *S*-nitrosocystéine (CysNO) sont considérés comme des transporteurs permettant à  $\text{NO}$  de diffuser *in vivo* vers les cellules cibles.

Les valeurs de concentrations physiologiques des RSNO endogènes restent controversées. L'équipe de Stamler *et al.* (1992c) a signalé que la concentration en AlbSNO chez l'Homme sain est de 7  $\mu\text{M}$ . Quelques années plus tard, l'équipe de Tsikas *et al.* (1999) a rapporté que la concentration d'AlbSNO humaine est 35 fois plus faible que celle déterminée par Stamler *et al.* (1992d).

La concentration totale des RSNO plasmatiques de faible masse moléculaire, mesurée pour la première fois par Stamler *et al.* (1992c), est de 300 nM. Par ailleurs, l'équipe de Taubert *et al.* (2007) a montré que la concentration moyenne de GSNO plasmatique est de 0,33 nM. L'équipe de Bramanti *et al.* (2010) a démontré que la concentration de GSNO et d'autres RSNO de faible masse moléculaire varie entre 50 et 350 nM. Ces concentrations sont 150 - 1000 fois plus élevées que celles rapportées par l'équipe de Taubert *et al.* (2007) mais proches de celles indiquées par Stamler *et al.* (1992c). Ces concentrations de RSNO mesurées plus élevées correspondent à l'emploi de conditions expérimentales particulières lors du prélèvement sanguin :

- inhibition de l'activité de la GGT plasmatique par le complexe sérine borate (SBC), inhibiteur compétitif de la GGT

- utilisation de facteurs de stabilisation de la liaison S-NO comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (chélateur des ions métalliques) et le *N*-éthylmaléimide (agent bloquant les groupements thiols libres donc limitant les réactions de transitrosation).

Récemment, l'équipe de Tsikas *et al.* (2013) a montré comme l'équipe de Bramanti *et al.* (2010) que l'inhibition de la GGT provoque une augmentation de la concentration plasmatique du GSNO mesurée. Toutefois, l'équipe de Tsikas a trouvé que la concentration du GSNO est de 2,8 nM et non de 50 - 350 nM. Ainsi, les valeurs des concentrations de ces RSNO *in vivo* restent incertaines à ce jour et extrêmement difficiles à évaluer vraisemblablement en raison des différentes méthodologies analytiques et pré-analytiques utilisées par les équipes travaillant dans le domaine.

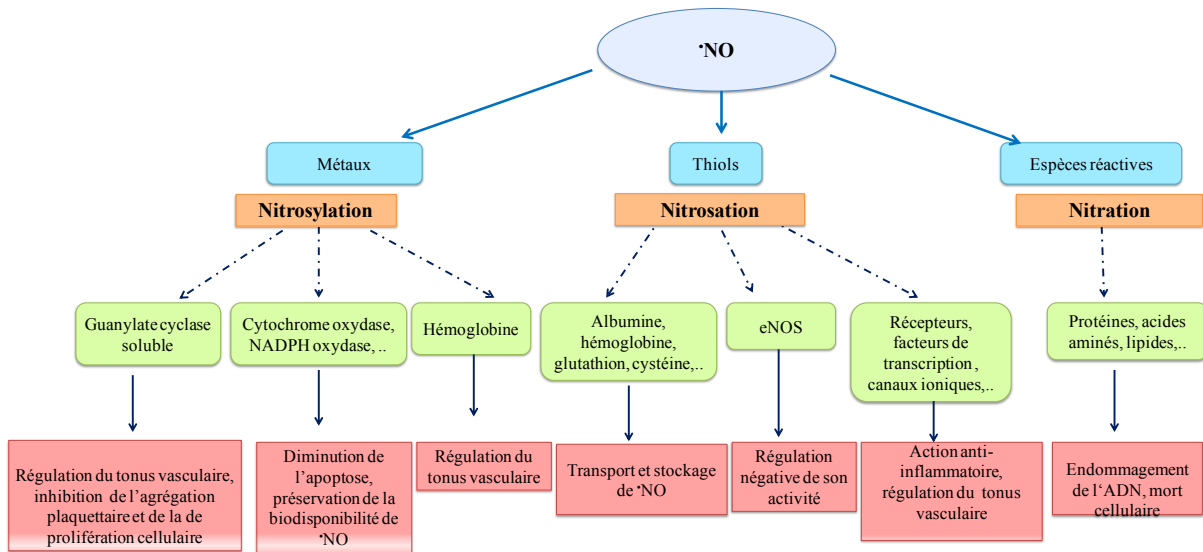
Le  $\cdot\text{NO}$  nitrose également une grande variété d'enzymes, de facteurs de transcription, de kinases, de caspases, de canaux ioniques et de récepteurs modulant ainsi leur fonction.

- L'équipe de Ravi *et al.* (2004) a montré que la nitrosation des eNOS au niveau de la cystéine 101 du bovin ou 99 de l'Homme provoque une diminution de la dimérisation de la eNOS réduisant son activité de  $92 \pm 4$  %. Cette nitrosation des eNOS représente un mécanisme d'autorégulation négative de la production de  $\cdot\text{NO}$ .

- Concernant les facteurs de transcription, le  $\cdot\text{NO}$  exerce des effets anti-inflammatoires *via* l'inhibition de l'activité de NF- $\kappa$ B par nitrosation de la cystéine 62 de la sous-unité p50. Cependant, il a été démontré que le  $\cdot\text{NO}$  pouvait être un activateur de NF- $\kappa$ B, en agissant sur les facteurs régulant négativement son activité (nitrosation du facteur inhibiteur de l'activité NF- $\kappa$ B p<sup>21</sup>ras) (DelaTorre *et al.*, 1999).

- La nitrosation de certaines familles de canaux potassiques BK<sub>Ca</sub> a également été décrite ; elle entraîne leur activation et ensuite une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses et un relâchement vasculaire (Bolotina *et al.*, 1994).

- Enfin, il a été récemment démontré que de nombreux récepteurs peuvent être nitrosés (Zhang *et al.*, 2012). La nitrosation du récepteur I à l'angiotensine II au niveau de la cystéine 289 diminue l'affinité du récepteur (de 20 à 60 %) pour l'angiotensine II de manière dose dépendante (Leclerc *et al.*, 2006). Par ailleurs, la nitrosation de la kinase des récepteurs couplés aux protéines G et/ou des arrestines inhibe la désensibilisation des récepteurs bêta-adrénergiques (Ozawa *et al.*, 2008).



**Figure 3** : Voie de signalisation de l'oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ), quelques exemples de cibles cellulaires, réactions associées et principaux effets physiologiques.

### 1.1.3.3. Nitration

La nitration est l'insertion d'un groupement nitro ( $-\text{NO}_2$ ) dans une molécule (Jacob et Winyard, 2009). Bien que les réactions de nitration interviennent dans le turn-over des protéines (Ischiropoulos et Gow, 2005), leur rôle physiologique n'est pas encore clairement établi.

L'ion peroxy-nitrite est à l'origine de l'oxydation et de la nitration des acides aminés des protéines (exemple : oxydation des résidus cystéine, nitration des résidus tyrosine). La nitration de la tyrosine provoque la formation de la 3-nitrotyrosine. Elle induit un changement de la structure tertiaire des protéines et une altération de leur fonction (Souza *et al.*, 2008). La présence de protéines aux résidus tyrosine nitrée a été mise en évidence dans de nombreuses pathologies, comme l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, la myocardite et le diabète (Turko et Murad, 2002).

Toutes ces données confortent l'hypothèse que la nitrosation et la nitrosylation sont des mécanismes universels dans la voie de signalisation du  $\cdot\text{NO}$  représentant un facteur clé de l'homéostasie vasculaire.

## 2. Les donneurs d'oxyde nitrique

La diminution de la biodisponibilité de  $\text{NO}$  est impliquée dans de nombreuses pathologies vasculaires, en particulier au cours de l'hypertension artérielle, l'athérosclérose ou les pathologies coronaires d'origine ischémique (Moncada *et al.*, 1991).

Plusieurs stratégies pharmacologiques sont développées pour pallier ce déficit de  $\text{NO}$  et la perte de ses effets vasculo-protecteurs :

- 1) moduler l'action de différentes enzymes dont les activités sont modifiées :
  - améliorer le fonctionnement de la eNOS, soit en augmentant les concentrations de tétrahydrobioptérine, soit en inhibant l'arginase (Demougeot *et al.*, 2005) ou la tyrosine phosphatase de type 1B (Richard *et al.*, 2009)
  - activer la GCs (Geschka *et al.*, 2011)
  - inhiber les phosphodiésterases, enzymes responsables de la dégradation du GMPc (Geschka *et al.*, 2011)
- 2) diminuer le stress oxydant afin d'améliorer la biodisponibilité du  $\text{NO}$  (Touyz *et al.*, 2011).
- 3) apporter du  $\text{NO}$  de manière exogène à partir de molécules capables de le libérer.

### 2.1. Les donneurs d'oxyde nitrique utilisés en thérapeutique

Les « donneurs de  $\text{NO}$  » sont des molécules appartenant à différentes familles chimiques qui sont capables de libérer directement le  $\text{NO}$  soit de manière directe soit indirecte sous une forme intermédiaire qui sera convertie en  $\text{NO}$ . L'expression « donneur de  $\text{NO}$  » suscite un désaccord dans la littérature (Tsikas *et al.*, 2012). En effet, il semble peu probable que tous ces composés libèrent la ou les même(s) espèce(s) chimique(s). Dans les milieux biologiques, toutes les formes rédox de NO ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}^-$ ) sont capables d'être libérées. Néanmoins, le terme « donneur de  $\text{NO}$  » sera utilisé dans cette thèse.

Les différents médicaments « donneurs de  $\text{NO}$  » actuellement sur le marché regroupent plusieurs familles : les dérivés nitrés tels que la trinitrine et le dinitrate d'isosorbide, les sydnonimines, le nicorandil et le nitroprussiate de sodium (SNP). Ils présentent des caractéristiques pharmacocinétiques variables et sont principalement indiqués dans le traitement de l'angor, de l'insuffisance cardiaque et dans le traitement d'urgence des crises hypertensives (tableau 2).



**Tableau 2 : Principales caractéristiques des donneurs d'oxyde nitrique.**

	<b>Principe actif</b>	<b>Voie</b>	<b>Délai d'action</b>	<b>Durée d'action</b>	<b>Indications principales</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Complexe inorganique métal-NO</b>	Nitroprussiate de sodium	Intraveineuse	Aucun	3 à 10 min	Traitement d'urgence des crises hypertensives sévères (milieu hospitalié)	Production d'ion cyanure (toxique)
<b>Dérivés nitrés</b>	Trinitrine	Sublinguale	2 à 3 min	30 à 60 min	Traitement préventif (à très court terme) ou curatif de la crise d'angor	Développement d'une tolérance lors de l'administration de façon continue. Nécessité d'instaurer des fenêtres thérapeutiques pour limiter le phénomène
		Transdermique	-	24 h	Traitement préventif de la crise d'angor	
		Intraveineuse	3 min	3 min	Insuffisance cardiaque Infarctus du myocarde (phase aigue) Angor instable	
	Mononitrate d'isosorbide	Orale	1 h	12 h	Insuffisance cardiaque Traitement préventif de l'angor	
	Dinitrate d'isosorbide	Sublinguale	2 à 3 min	30 à 60 min	Traitement préventif (à très court terme) ou curatif de la crise d'angor	
		Orale	30 à 60 min	4 à 6 h	Insuffisance cardiaque	
			1 h	8 h	Traitement préventif de l'angor	
		Intraveineuse	30 à 60 min	5 à 6 h	Œdème aigu du poumon Insuffisance cardiaque Angor instable	
Intracoronaire	30 à 60 min	6 à 8 h	Levée de spasme artériel coronaire Vasoconstriction spontanée ou induite Recherche d'une vasodilatation coronaire maximale en cours de coronarographie en préparation notamment à une angioplastie coronaire			
<b>Sydnominines</b>	Molsidomine	Orale	20 min	1 à 3 h	Traitement préventif de la crise d'angor (repos, effort)	Risque d'induction de stress oxydant
	Chlorhydrate de linsidomine	Intracoronaire	1 h	8 h	Levée de spasme artériel	
		Intraveineuse	4 à 6 min	25 à 40 min	Traitement curatif de la crise d'angor	

- Les dérivés nitrés sont des esters d'acide nitrique avec un nombre variable de groupements -C-O-NO<sub>2</sub>. Le chef de file est la nitroglycérine (également appelée trinitrine) obtenue par nitration du glycérol. Les autres dérivés sont le mononitrate d'isosorbide et le dinitrate d'isosorbide. Le mécanisme de libération du <sup>•</sup>NO par les dérivés nitrés nécessite une biotransformation enzymatique.

Plusieurs enzymes, en particulier, les glutathion-S-transférases, les cytochromes P-450 (Bennett *et al.*, 1994, Braun *et al.*, 1995) et l'aldéhyde déshydrogénase (Chen *et al.*, 2002) sont impliquées dans la libération d'ions nitrite à partir des dérivés nitrés ; cependant, les mécanismes responsables de la transformation de l'ion nitrite en <sup>•</sup>NO restent encore inconnus. Les dérivés nitrés constituent l'une des familles les plus utilisées dans le traitement de l'angine de poitrine. Leur utilisation au long cours est associée au développement d'un phénomène de tolérance avec une diminution rapide de l'amplitude de l'effet pharmacologique. Ce phénomène de tolérance met en jeu l'inactivation de l'aldéhyde déshydrogénase mitochondriale, la génération de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ou la déplétion de groupements sulfhydriles (Kjøller-Hansen *et al.*, 1994).

- Les sydnonimines regroupent la molsidomine (*N*-éthoxycarbonyl-3-morpholinosydnonimine) et le linsidomine (3-morpholino-sydnonimine, SIN-1). La molsidomine est une prodrogue *N*-acétylée qui est convertie par les estérases du foie en un métabolite actif, le SIN-1 (Feelisch *et al.*, 1989). Elles sont utilisées dans le traitement de l'angine de poitrine. En présence d'oxygène moléculaire, le SIN-1 est oxydé en *N*-morpholinoaminoacétonitrile qui lui-même produit simultanément du ONOO<sup>-</sup> toxique pour la cellule (Hogg *et al.*, 1992).

- Le nicorandil est un principe actif hybride possédant un groupement nitrate et un résidu nicotinamide. Il possède un double mécanisme d'action (Kukovetz *et al.*, 1992) : 1) il libère du <sup>•</sup>NO et augmente le taux de GMPc intracellulaire, du fait de la présence d'un radical nitré dans sa structure; 2) il active l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants. Ces deux propriétés participent aux effets vasodilatateurs artériels et veineux du nicorandil mis à profit dans le traitement de l'angine de poitrine.

- Le nitroprussiate de sodium est un complexe inorganique dans lequel le fer est sous forme ferreux et lié au NO (lequel est sous forme NO<sup>+</sup>). Selon certains auteurs, le SNP ne libère pas de <sup>•</sup>NO spontanément et sa dégradation nécessiterait une réduction réalisée par un thiol,

l'hémoglobine ou l'acide ascorbique (Rao *et al.*, 1991, Kruszyna *et al.*, 1993). Il a été également proposé qu'une enzyme membranaire nécessitant du NADH ou NADPH comme co-facteur serait impliquée dans sa dégradation (Mohazzab *et al.*, 1999). Cependant, un de ses produits de décomposition est l'ion cyanure (CN<sup>-</sup>) qui s'accumule dans l'organisme et induit des effets toxiques.

En conclusion, différents médicaments « donneurs de <sup>•</sup>NO » sont disponibles, mais leur usage reste limité aux pathologies coronaires d'origine ischémique et à l'insuffisance cardiaque. Une description plus détaillée de ces différents donneurs de <sup>•</sup>NO et de leurs limites d'utilisation a fait l'objet d'une revue (Parent *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'utilisation de ces médicaments au long cours est associée au développement d'un phénomène d'échappement thérapeutique ou d'un risque de toxicité par induction d'un stress oxydant/nitrosant.

## **2.2. Les donneurs d'oxyde nitrique en cours de développement**

Suite aux problèmes rencontrés dans l'utilisation thérapeutique des donneurs de <sup>•</sup>NO, de nombreuses équipes de recherche s'intéressent au développement de nouvelles familles de molécules capables de libérer <sup>•</sup>NO. Parmi ces familles, on distingue les diazéniumdiolates (NONOates), les composés porteurs d'un groupement -C=NOH, les complexes fer-dinitrosyle et les RSNO.

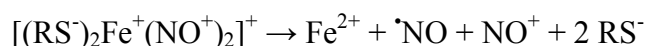
Certains auteurs proposent d'utiliser les ions nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) et nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) comme précurseurs de <sup>•</sup>NO (Kevil *et al.*, 2012). Les NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apportés par l'alimentation sont transformés par des enzymes du tube digestif (réductases des bactéries) en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> qui sont ensuite réduits en <sup>•</sup>NO. Des études montrent que l'administration des ions nitrate ou nitrite n'entraîne pas de phénomène de tolérance. Mais des auteurs ont montré que leur administration à fortes doses entraîne la formation de nitrosamines carcinogènes, ce qui constitue une limite à leur utilisation en thérapeutique (Lidder et Webb, 2013).

- Les NONOates sont des molécules hybrides. Le premier NONOate (le diéthylamine NONOate) a été synthétisé en 1960. Ils sont produits par réaction entre des agents nucléophiles (X) et le <sup>•</sup>NO. Un « dimère de <sup>•</sup>NO » est relié *via* un atome d'azote, ce qui aboutit à la structure générale X-[N(O)NO]-. (Megson et Webb 2002). Ils se décomposent spontanément en libérant deux molécules de <sup>•</sup>NO par molécule de NONOate et leur vitesse de décomposition dépend essentiellement de l'agent nucléophile lié, de la température et du pH

(Keefer *et al.*, 2001). Parmi les caractéristiques intéressantes des NONOates, on peut citer : une décomposition indépendante des thiols et une cinétique de libération de  $\cdot\text{NO}$  de premier ordre (Morley et Keefer, 1993). Les effets vasodilatateurs et anti-agrégants plaquettaires de cette famille ont été mis en évidence (Diodati *et al.*, 1993, Morley et Keefer, 1993). Cependant, leur potentiel thérapeutique reste limité car leur inconvénient majeur est la formation possible de nitrosamines carcinogènes (Fitzhugh et Keefer, 2000).

- Les molécules porteuses d'un groupement  $-\text{C}=\text{NOH}$ , comme le 4-chlorobenzamidoxime, le 4-nitrobenzamidoxime, le 4-hexyloxybenzamidoxime et le 4-méthoxybenzamidoxime, sont des molécules susceptibles d'être biotransformées en  $\cdot\text{NO}$  par les NOS, les peroxydases et les cytochromes P450 (Mansuy et Boucher, 2002). Il a été démontré sur des artères isolées de rat que ces composés induisent une vasorelaxation (Vetrovsky *et al.*, 2002).

- Les complexes fer-dinitrosyle (DNCI) sont des composés ayant pour formule générale :  $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2]^+$ . Leur vitesse de décomposition est variable en fonction du thiol lié (Vanin, 1998). Les DNCI se décomposent d'une manière spontanée selon l'équation suivante :



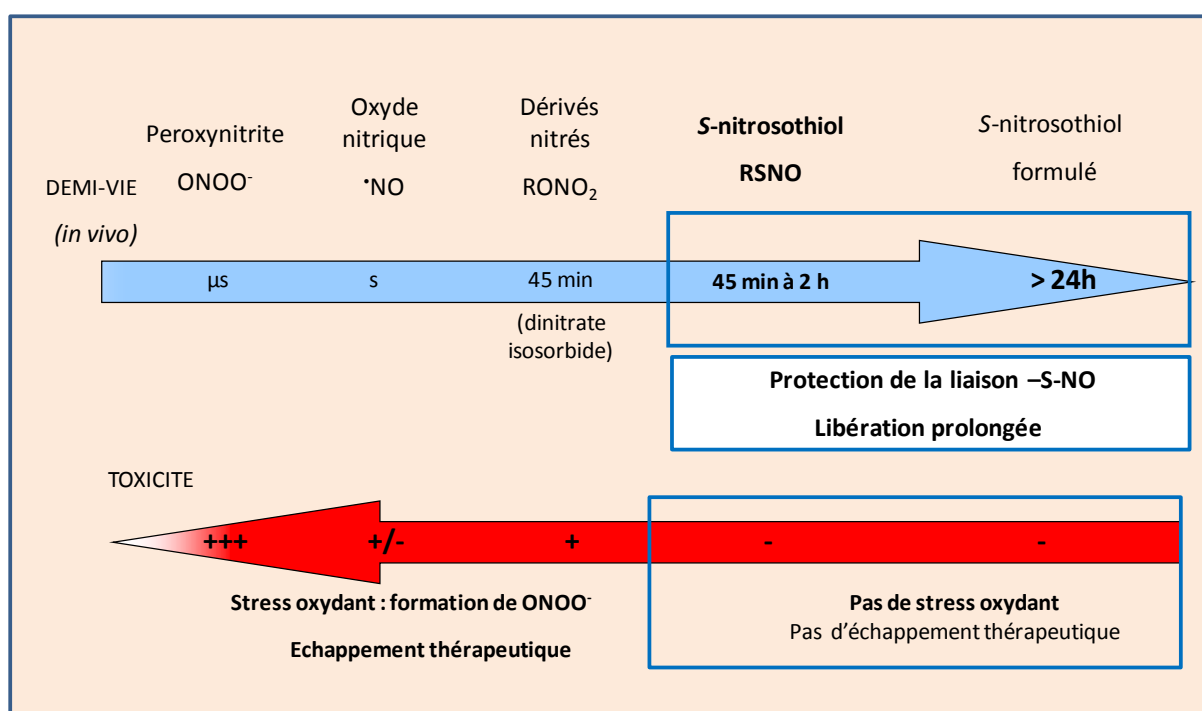
Le  $\text{NO}^+$  libéré à partir des DNCI réagit avec  $\text{RS}^-$  pour former un RSNO. Les DNCI les plus étudiés sont les complexes incorporant la cystéine, le glutathion et la *N*-acétylcystéine (Vanin, 1998) ; ils sont capables par libération de  $\cdot\text{NO}$ , d'activer la GCs et d'induire une vasorelaxation (Mülsch *et al.*, 1991, Pereira Ade *et al.*, 2011). Ces composés induisent également une diminution persistante de la réponse à des agonistes vasoconstricteurs sur des artères isolées de rat (Vanin *et al.*, 2007). En revanche, l'inconvénient majeur des complexes DNCI est l'induction d'un processus inflammatoire (Shekhter *et al.*, 2007).

- Une nouvelle approche dans le design des molécules libérant du  $\cdot\text{NO}$  consiste à synthétiser des molécules hybrides en associant un résidu  $\cdot\text{NO}$  sur de molécules possédant des propriétés pharmacologiques connues, comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'aspirine (Lazzarato *et al.*, 2011) ou le naproxène (Rossoni *et al.*, 2004). Les actions biologiques des molécules hybrides de  $\cdot\text{NO}$  ont reçu beaucoup d'attention et ont été examinées en détail par ailleurs (Keeble et Moore, 2002, Chirolì *et al.*, 2003, Turnbull *et al.*, 2006).

La dernière famille de donneurs de  $\cdot\text{NO}$  qui sera décrite dans ce chapitre, est celle à laquelle nous nous sommes tout particulièrement intéressée dans ce travail de thèse : les *S*-nitrosothiols.

### 2.3. Les *S*-nitrosothiols

Les RSNO représentent un choix logique pour le développement de nouveaux donneurs de  $\cdot\text{NO}$  car ils ont des demi-vies *in vivo* variant de 45 min à 2 h (Mathews et Kerr, 1993), ils n'induisent pas de stress oxydant ou nitrosant, ni de tolérance (Bauer et Fung 1991a, Miller *et al.*, 2000). C'est pourquoi l'utilisation de RSNO dans un contexte thérapeutique est prometteuse, car ces molécules sont capables à la fois de libérer  $\cdot\text{NO}$  et un thiol qui peut lui aussi présenter une très faible toxicité et des propriétés pharmacologiques intéressantes (propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires,..) (figure 4).



**Figure 4:** Intérêts des *S*-nitrosothiols comme donneurs de l'oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ).

L'utilisation thérapeutique des RSNO peut se faire au moyen de :

- RSNO endogènes tels que l'AlbSNO ou le GSNO, dont nous avons décrit les rôles physiologiques dans le paragraphe 1.1.3.2,

- RSNO exogènes comme la *S*-nitroso-*N*-acétylcystéine (NACNO) et la *S*-nitroso-*N*-acétylpénicillamine (SNAP) et ses dérivés plus lipophiles.

Dans le chapitre suivant, nous allons détailler les effets vasculaires de ces différents RSNO.

### **2.3.1. Effets biologiques des *S*-nitrosothiols**

#### *- La S-nitrosoalbumine*

En 1992, l'équipe de Stamler a observé que le  $\cdot\text{NO}$  réagit avec les thiols des protéines, comme l'albumine pour former de l'AlbSNO (Stamler *et al.*, 1992c). L'AlbSNO ainsi formée par la fixation du groupement -NO sur le résidu cystéine en position 34 présente une demi-vie *in vitro* dans le sang humain de 5,5 h (Stamler *et al.*, 1992a). Plus tard, la même équipe a démontré que l'inhibition de la production endogène de  $\cdot\text{NO}$  par la eNOS provoquait une diminution de 40 % de la concentration en AlbSNO (Stamler *et al.*, 1992c). Les effets vasorelaxants et antiagrégants plaquettaires GMPc-dépendants de l'AlbSNO ont été mis en évidence sur vaisseaux et plaquettes isolées, respectivement (Stamler *et al.*, 1992c, Simon *et al.*, 1993, Giustarini *et al.*, 2011).

Par ailleurs, *in vivo*, la perfusion d'AlbSNO (1,8  $\mu\text{mol/kg}$ ) chez des rats Sprague-Dawley sains provoque une réduction immédiate de la pression artérielle de  $29 \pm 6$  %. Cette réduction de la pression artérielle est nettement potentialisée par la co-administration d'albumine (Orie *et al.*, 2005).

#### *- La S-nitrosohémoglobine*

Le  $\cdot\text{NO}$  réagit avec l'hémoglobine selon deux types de modification : nitrosylation et nitrosation. La première réaction conduit à la formation de nitrosyl-hémoglobine (fixation de  $\cdot\text{NO}$  sur l'hème). Cette réaction de nitrosylation joue un rôle dans la régulation du tonus vasculaire basal (Stamler *et al.*, 1997b, Gladwin *et al.*, 2000). La nitrosation, fixation de  $\cdot\text{NO}$  sur le groupement thiol de la cystéine 93 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine, aboutit à la formation d'HbSNO. Des études réalisées *ex vivo* ont montré un effet vasodilatateur de l'HbSNO dépendant de la pression en oxygène et de la présence de thiols (Crawford *et al.*, 2003). En outre, il a été rapporté que l'HbSNO joue un rôle dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire chez l'Homme en stimulant le taux de production de GMPc (Pawloski *et al.*, 1998). *In vivo*, l'administration d'HbSNO (1  $\mu\text{mol/kg}$ ) chez des rats Sprague-Dawley induit une diminution de la pression artérielle de  $20 \pm 5$  % (Stamler *et al.*, 1997b).

### - Le S-nitrosoglutathion

Le GSNO a été identifié dans l'organisme dans les érythrocytes (Messana *et al.*, 2000), dans les plaquettes (Hirayama *et al.*, 1999), dans le tissu cérébral (Do *et al.*, 1996) et dans le fluide extracellulaire des poumons (Gaston *et al.*, 1998). Les travaux menés sur le GSNO sont largement dominants dans la littérature par rapport aux autres RSNO. Les effets vasorelaxants du GSNO ont été mis en évidence sur des vaisseaux isolés ; ils mettent en jeu la production de  $\text{NO}$  et l'activation de la voie de la GCs. Les valeurs de concentration produisant 50 % de l'effet maximum de vasorelaxation (CE50) du GSNO obtenues varient entre 0,10 et 0,40  $\mu\text{M}$  (Megson *et al.*, 1997, Tullett *et al.*, 2001, Alencar *et al.*, 2003, Heikal *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été montré qu'une incubation de vaisseaux isolés avec du GSNO permettait de former un stock intracellulaire de  $\text{NO}$ , qui peut être par la suite libéré pendant plusieurs heures ( $\leq 4$  h) et induire des effets vasorelaxants persistants (Megson *et al.*, 1999, Alencar *et al.*, 2003, Sarr *et al.*, 2005).

Des effets anti-agrégants plaquettaires et anti-proliférateurs du GSNO ont également été mis en évidence *in vitro* (Tullett *et al.*, 2001). En outre, des études réalisées *in vivo* montrent que l'administration de GSNO par voie intraveineuse chez le lapin (0,3  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou chez le rat (0,003  $\mu\text{mol/kg}$ ) anesthésié diminue la pression artérielle moyenne de 50 % et de 20 %, respectivement (Ishibashi *et al.*, 2011, Nossaman *et al.*, 2012). Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés dans notre laboratoire montrant que l'injection en sous-cutanée chez le rat Wistar de GSNO (10  $\mu\text{mol/kg}$ ) provoque une diminution de  $24 \pm 3$  mmHg de la pression artérielle moyenne, par rapport aux valeurs initiales (données non publiées).

Par ailleurs, dans un contexte de pathologies vasculaires cérébrales, l'administration de GSNO par voie orale (entre 0,15  $\mu\text{mol/kg}$  et 3,10  $\mu\text{mol/kg}$ ) chez le rat, dans des modèles expérimentaux de trauma cérébral (Khan *et al.*, 2005, Khan *et al.*, 2011) ou d'accident vasculaire cérébral (Khan *et al.*, 2009), augmente la concentration cellulaire de GSH endogène et réduit l'inflammation, les lésions oxydatives neurovasculaires induites et la taille de l'infarctus.

Le GSNO a été administré dans plusieurs essais cliniques (de phase I ou II) avec pour principal objectif l'étude des propriétés vasodilatatrices ou antiagrégantes plaquettaires. Une centaine de patients au total ont été inclus dans ces essais. Une description plus détaillée de ces essais cliniques est rapportée dans la revue Gaucher *et al.*, (2013).

### - Les S-nitrosothiols synthétiques

La NACNO et le SNAP et ses dérivés plus lipophiles ont également fait l'objet de nombreux de travaux de recherche en physiopathologie vasculaire.

La NACNO est obtenue par nitrosation de la N-acétylcystéine ; cette dernière est un médicament dérivé de la cystéine qui est administré par voie orale comme agent mucolytique (Prescott *et al.*, 1979). Sur l'anneau d'aorte isolé de rat, la NACNO induit une vasorelaxation-dépendante de la voie GMPc avec une valeur de CE50 comprise entre 0,20 et 1,40  $\mu\text{M}$  (Ceron *et al.*, 2001, Tullet *et al.*, 2001, Alencar *et al.*, 2003). En outre, la NACNO présente également un effet antiagrégant plaquettaire sur des plaquettes humaines isolées (Mendelsohn *et al.*, 1990). La NACNO exerce aussi des effets hypotenseurs dose-dépendants après injection intraveineuse (de 0,028 à 4,28  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) chez le rat sain. Ces effets sont potentialisés chez le rat spontanément hypertendu (SHR) en comparaison au rat normotendu de type Wistar-Kyoto (WKY) (Ricardo *et al.*, 2002).

Plusieurs essais cliniques ont été réalisés afin d'évaluer les propriétés vasodilatatrices et antiagrégantes plaquettaires de NACNO et sont détaillés dans la revue Gaucher *et al.* (2013).

La deuxième famille de RSNO synthétiques comporte le SNAP et ses dérivés. Le SNAP est obtenu par nitrosation de la N-acétylpénicillamine. La pénicillamine est utilisée comme immunosuppresseur dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Jaffe, 1965) ou comme chélateur du cuivre dans la maladie de Wilson (Walshe, 1956). Les effets vasodilatateurs du SNAP ont bien été démontrés à l'aide d'anneau d'aorte isolé de rat et sont dépendants de la GMPc. Les valeurs de CE50 du SNAP sont comprises entre 0,10 et 1,5  $\mu\text{M}$  (Megson *et al.*, 1997, Alencar *et al.*, 2003). Le SNAP exerce également des effets hypotenseurs dose-dépendants après injection intraveineuse (0,05 à 75  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) chez le rat sain. A l'inverse de la NACNO, ces effets hypotenseurs sont diminués chez le rat SHR (Styś *et al.*, 1998). Les différences observées dans les effets sur la tension artérielle des deux molécules SNAP et NACNO à travers les deux souches WKY et SHR de rat pourraient s'expliquer par des voies métaboliques différentes impliquées dans la libération de  $\text{NO}$  différentes pour SNAP et NACNO.

Différents dérivés du SNAP ont été synthétisés en vue d'augmenter la stabilité, la lipophilie et l'effet biologique de la molécule mère SNAP. La première stratégie utilisée consiste à ajouter une chaîne de carbone allant de C3 à C7 au lieu du groupement N-acétyle du SNAP.



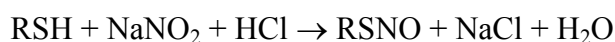
La deuxième stratégie consiste en un couplage d'un acide aminé (leucine, glycine, proline, acide aspartique ou glutamique) à la molécule mère SNAP, formant ainsi des dipeptides nitrosés. Enfin, une série de dérivés glycosylés du SNAP a été développée.

Ces différentes stratégies de synthèse sont rapportées dans la revue Gaucher *et al.*, (2013). Les dérivés correspondants sont plus stables, plus lipophiles et induisent des effets vasorelaxants plus prolongés que la molécule mère SNAP (Megson *et al.*, 1997, Megson *et al.*, 1999, Al-S'adoni *et al.*, 2000, Gaucher *et al.*, 2013).

### 2.3.2. Méthodes de synthèse des S-nitrosothiols

Les RSNO sont synthétisés selon différentes méthodes :

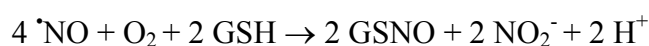
(i) par réaction d'un thiol avec du nitrite de sodium en milieu acide : c'est la méthode la plus utilisée. Elle est efficace, rapide et permet d'obtenir un produit avec un rendement élevé. Elle consiste à faire réagir une mole de thiol avec une mole de nitrite de sodium (Hart, 1985) suivant la réaction suivante :



Cette réaction se déroule en milieu acide à 4 °C pendant une période qui varie entre 40 min et 1 h (temps nécessaire pour atteindre le plateau de la réaction). Des étapes de précipitation et de purification peuvent être réalisées sur cette solution afin d'obtenir un produit pur sous forme solide, ce qui permet une meilleure conservation (Roy *et al.*, 1994, Al-S'adoni *et al.*, 2000, Al-S'adoni *et al.*, 2004).

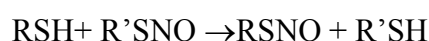
D'autres agents de nitrosation comme le tétrafluoroborate de nitrosonium, le chlorure de nitrosonium, le trioxyde d'azote, et le tétraoxyde de diazote (Williams, 1999) sont également utilisés dans la synthèse des RSNO. Toutefois, l'utilisation d'une solution de nitrite de sodium acidifiée est préférée pour des applications biologiques, en raison de la simplicité, de la compatibilité avec des solutions aqueuses et des rendements de synthèse élevés.

(ii) par réaction avec l'oxygène et  $\cdot\text{NO}$  : cette méthode consiste à faire réagir un mélange gazeux d'oxyde nitrique et de dioxygène avec une solution aqueuse de RSH selon la réaction suivante :



A la différence de la première méthode décrite ci -dessus, le plateau de réaction est atteint en quelques minutes. Cette méthode est utilisée pour synthétiser des RSNO en solution aqueuse, mais également des RSNO dans une matrice composée de polyéthylène glycol et d'eau (Seabra *et al.*, 2004).

(iii) par transnitrosation avec un autre RSNO : cette méthode est destinée à une meilleure compréhension des mécanismes de transnitrosation qui peuvent se produire *in vivo*. Elle consiste à faire réagir un thiol avec un nitrosothiol (R'SNO) selon la réaction suivante (Wang *et al.*, 2001) :



### **2.3.3. Les différents paramètres impliqués dans la dénitrosation des S-nitrosothiols**

Il a été démontré que les RSNO se décomposent de manière homolytique en produisant le radical thiyl (RS $\cdot$ ) et le  $\cdot$ NO radicalaire, ou d'une manière hétérolytique par un clivage catalysé par des ions métalliques, produisant NO $^+$  ou NO $^-$ . Ce dernier mécanisme est prédominant dans les milieux biologiques (Singh *et al.*, 1995).

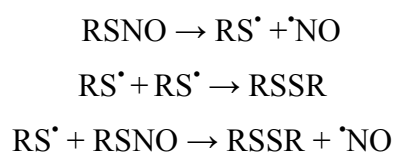
Ces deux mécanismes se produisent spontanément ou sont catalysés par différents paramètres, parmi lesquels nous distinguerons dans les paragraphes suivants ceux d'origine non enzymatique et enzymatiques.

#### **2.3.3.1. Paramètres non enzymatiques**

Différents facteurs non enzymatiques, comme la lumière, la température, le pH, le dioxygène, les ions métalliques et les thiols, jouent un rôle dans la dégradation des RSNO.

##### *- Lumière et température*

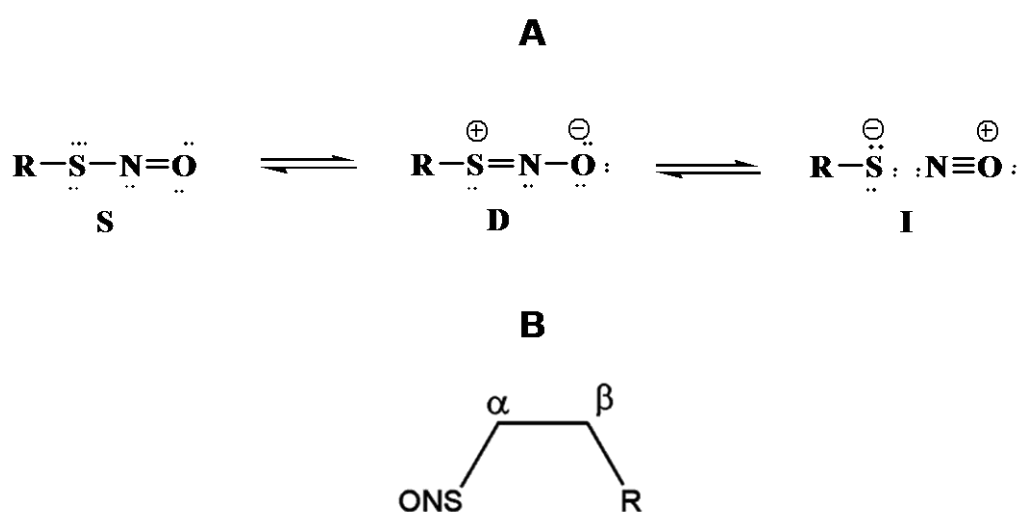
Le mécanisme de décomposition des RSNO en fonction de la température et de la lumière est similaire (Singh *et al.*, 1995, Veleparampil *et al.*, 2009) ; il consiste en une rupture homolytique produisant un radical thiyl (RS $\cdot$ ) et un  $\cdot$ NO radicalaire.



Le radical thiyl se combine avec un autre RSNO ou bien avec un autre radical thiyl pour libérer une autre molécule de  $\cdot\text{NO}$  et pour former le disulfure correspondant, respectivement. Cette rupture est indépendante de la structure du RSNO (Veleparampil *et al.*, 2009).

- *pH*

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'influence du pH sur la dégradation des RSNO. En effet, un RSNO existe en équilibre de résonance entre trois structures. On distingue la forme conventionnelle (I), la forme zwitterion (II) et la forme ionique (III) (figure 5).

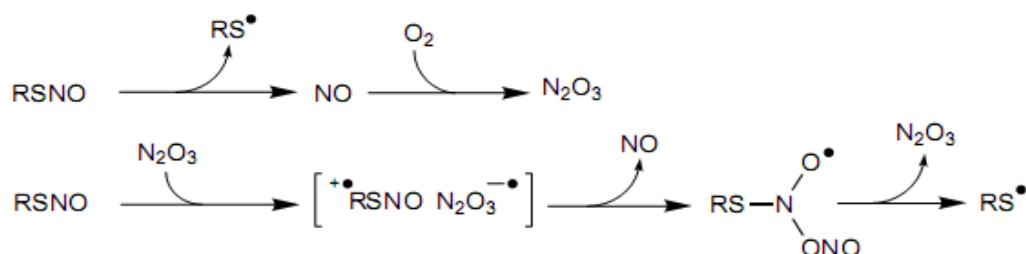


**Figure 5 :** Formules de résonance (A) et structure chimique (B) des *S*-nitrosothiols (RSNO).

Tout facteur qui favorise la prépondérance de la forme II sur la forme I conduira à une augmentation de la stabilisation de la liaison S-NO (Roy *et al.*, 1994). En fonction des structures des RSNO, et notamment des substituants présents sur les carbones en positions  $\alpha$  et  $\beta$  du soufre, l'équilibre entre les différentes formes sera déplacé vers la forme II, diminuant ainsi la labilité de la liaison S-NO. Cette forme II est prédominante en milieu acide et elle stabilise le RSNO. En opposition, quand la valeur de pH augmente, l'abondance de la forme II diminue conduisant ainsi à une augmentation de la vitesse de décomposition de RSNO. Les rôles des substituants présents sur les atomes de carbone en positions  $\alpha$  et  $\beta$  du soufre dans la stabilisation de la liaison S-NO sont détaillés dans la revue de Gaucher *et al.* (2013).

### - Dioxygène

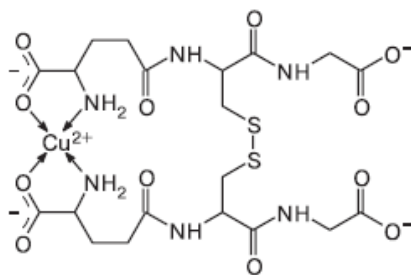
Le dioxygène joue également un rôle dans la stabilité de la liaison S-NO. Le mécanisme proposé pour la dégradation des RSNO par le dioxygène est le suivant (Grossi et Montevecchi, 2002) :



Le  $\bullet\text{NO}$  libéré dans le milieu réactionnel par la décomposition du RSNO est susceptible de réagir avec le dioxygène de l'air pour former  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Par la suite,  $\text{N}_2\text{O}_3$  réagit avec RSNO, ce qui conduirait à la formation du complexe  $[\text{RSNO}^+ \text{N}_2\text{O}_3^-]$  qui se décomposerait ensuite en un intermédiaire radicalaire avec libération de  $\bullet\text{NO}$ . Le  $\bullet\text{NO}$  ainsi libéré réagit de nouveau avec le dioxygène pour reformer le  $\text{N}_2\text{O}_3$  (Grossi et Montevecchi, 2002).

### - Ions métalliques

Les ions métalliques sont connus comme étant des catalyseurs de la dégradation des RSNO notamment  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Cu}^+$ . *In vitro*, le rôle de ces métaux a été mis en évidence en comparant la stabilité des RSNO sans et avec ajout de  $\text{Cu}^{2+}$  dans la solution. Cette décomposition est dépendante de la concentration initiale de la solution en RSNO. L'équipe de Noble *et al.* (1999) a montré qu'à des concentrations millimolaires le GSNO est stable en présence de  $\text{Cu}^{2+}$  alors que pour des concentrations plus faibles (micromolaires), la stabilité de GSNO est réduite. Selon cette équipe, le glutathion oxydé (GSSG) produit par la décomposition de GSNO en présence de  $\text{Cu}^{2+}$  complexe le  $\text{Cu}^{2+}$  (figure 6) limitant ainsi la formation de  $\text{Cu}^+$  et stabilisant par conséquent le RSNO (Noble *et al.*, 1999, Noble et Williams, 2000).



**Figure 6 :** Structure du complexe théoriquement formé entre le glutathion oxydé et le Cu<sup>2+</sup>.  
D'après Noble *et al.* (1999).

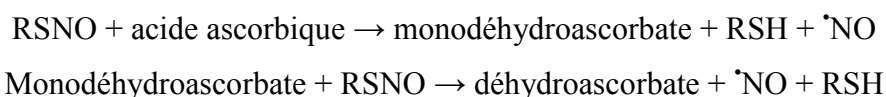
Un débat existe sur le rôle exact du cuivre dans la décomposition des RSNO *in vivo*. En effet, les concentrations physiologiques de cuivre libre qui dégrade les RSNO sont très faibles (estimées entre 10<sup>-6</sup> et 10<sup>-12</sup> M) par rapport aux concentrations utilisées dans les études de dégradation *in vitro* (10<sup>-6</sup> M). Cependant, certains auteurs montrent que les ions Cu<sup>2+</sup> liés à un acide aminé, un peptide ou une protéine génère également du Cu<sup>+</sup> *in vivo* (Dicks *et al.*, 1996). Donc, il serait possible que les ions cuivreux présents *in vivo* jouent un rôle dans la libération de <sup>•</sup>NO à partir des RSNO.

D'autres ions métalliques endogènes comme le Fe<sup>2+</sup> ou exogènes comme Ag<sup>+</sup> et Hg<sup>2+</sup> sont également capables de dégrader les RSNO par hydrolyse stœchiométrique (Swift et Williams, 1997).

#### - Agents réducteurs

Les agents réducteurs comme l'acide ascorbique et les thiols jouent également un rôle dans la dégradation des RSNO.

Concernant l'acide ascorbique, il dégrade les RSNO *in vitro* en deux étapes, selon la réaction suivante (Kashiba-Iwatsuki *et al.*, 1996) :



Cette réaction est fortement dépendante du pH (Smith et Dasgupta, 2000). Conformément à son impact *in vitro* dans la dégradation des RSNO, il a été montré sur un modèle *ex vivo* d'anneau d'aorte isolé de lapin que l'acide ascorbique augmente 10 fois la vasorelaxation induite par des RSNO (De Saram *et al.*, 2002).

De même, les études *in vitro* montrent que les thiols libres comme la cystéine diminuent significativement la stabilité des RSNO (Tullett *et al.*, 2001). A des concentrations de l'ordre du micromolaire, les thiols se comportent comme des agents réducteurs et favorisent la dégradation des RSNO. Cependant, cette dégradation est ralentie en présence de fortes concentrations (de l'ordre du millimolaire) en thiol, car il se comporte alors comme un chélateur des ions métalliques (Dicks *et al.*, 1997).

Au niveau de vaisseaux isolés, la présence de thiols comme l'albumine, la cystéine, la *N*-acétylcystéine et le glutathion augmente (de 9 à 41 fois) les effets vasorelaxants des RSNO (Alencar *et al.*, 2003, Giustarini *et al.*, 2011).

Par ailleurs, après traitement de rats avec l'AlbSNO ou la CysNO, l'administration de cystéine ou de *N*-acétylcystéine potentialise (de 5 à 10 fois) les effets vasodilatateurs des RSNO (Scharfstein *et al.*, 1994, Warnecke *et al.*, 2009).

Un autre thiol endogène, le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), joue également un rôle dans la dégradation des RSNO. Le H<sub>2</sub>S est produit de manière endogène au cours du métabolisme de la *L*-cystéine par deux enzymes : la cystathionine β-synthase (EC 4.2.1.22) et la cystathionine γ-lyase appelée aussi cystathionase (EC 4.4.1.1). Ses concentrations plasmatiques physiologiques rapportées sont comprises entre 35 et 52 μM (Chen *et al.*, 2005, Jiang *et al.*, 2005). Il exerce des effets similaires à ceux produits par le <sup>•</sup>NO tels que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Zagli *et al.*, 2007) et de l'apoptose (Rinaldi *et al.*, 2006), et l'induction de la vasorelaxation (Zhao *et al.*, 2001). D'autres travaux ont montré que NaHS, qui donne HS<sup>-</sup>, forme ionisée de H<sub>2</sub>S à pH physiologique, libère <sup>•</sup>NO *in vitro* à partir de différents RSNO comme le GSNO, le SNAP (Ondrias *et al.*, 2008).

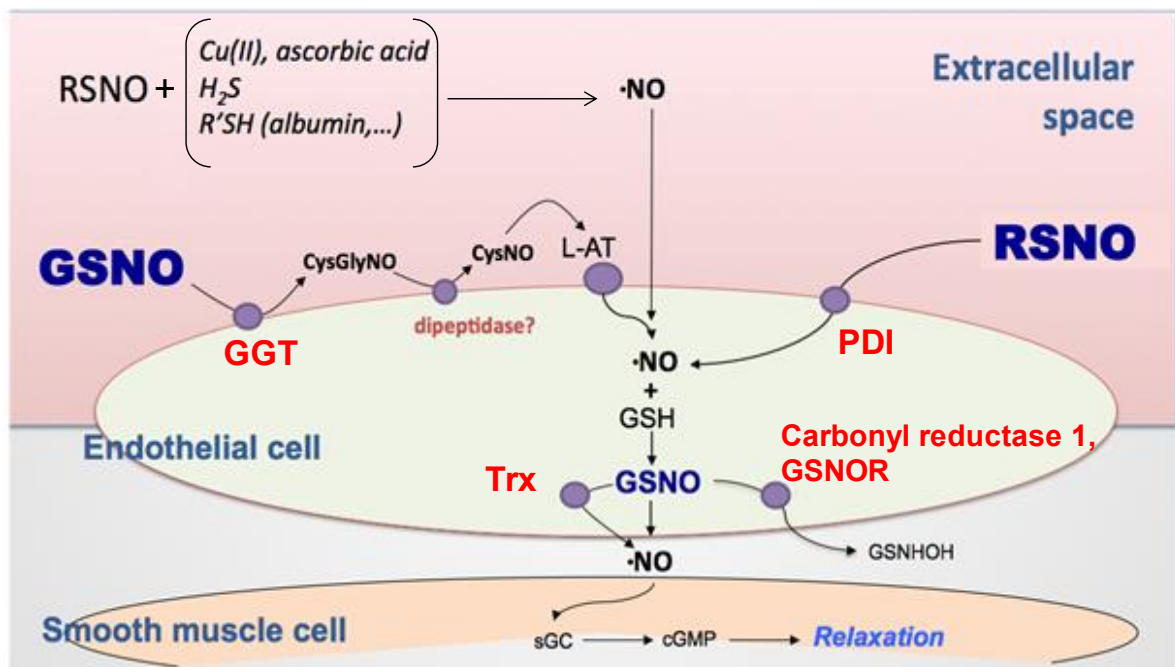
Par ailleurs, au niveau de vaisseaux isolés, la présence de NaHS potentialise significativement (de 4 à 5 fois) les effets vasorelaxants des RSNO. Donc, H<sub>2</sub>S, produit de façon endogène chez les mammifères, influence *in vivo* l'activité des RSNO (Ondrias *et al.*, 2008).

En résumé, les différents paramètres décrits ci dessus interviennent dans le métabolisme et les effets vasorelaxants des RSNO ; cependant, la contribution exacte de chacun d'entre eux *in vivo* est encore difficile à déterminer (Al-S'adoni *et al.*, 2000).

### 2.3.3.2. Paramètres enzymatiques

Au niveau membranaire, de nombreux systèmes enzymatiques, tels que la GGT, la PDI et le système L de transport des acides aminés (L-AT), jouent un rôle dans la dénitroration des RSNO et le transfert du  $\cdot\text{NO}$  dans le compartiment intracellulaire. Par ailleurs, de nombreux systèmes enzymatiques cytosoliques sont également capables de décomposer les RSNO comme la Trx et la GSNOR. La figure 7 représente les acteurs principaux du métabolisme des RSNO.

Par la suite, nous détaillerons, dans les conditions physiopathologiques, le rôle de chaque enzyme et transporteur (GGT, L-AT, PDI, Trx, GSNOR et carbonyle réductase 1) dans le processus de dénitroration des RSNO.

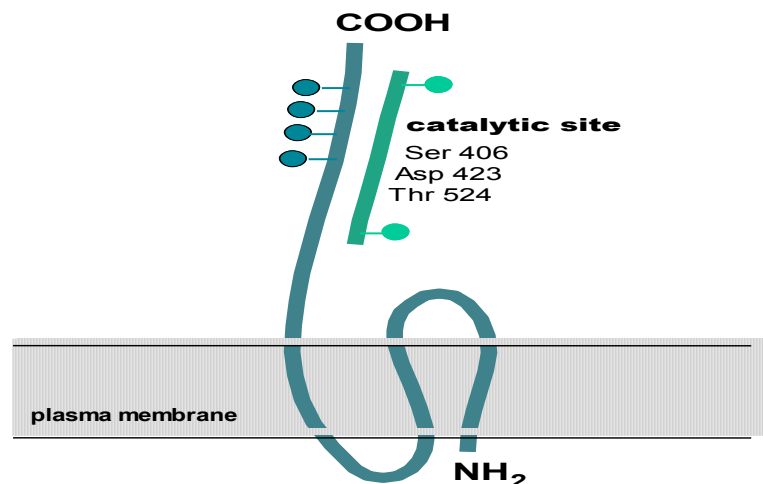


**Figure 7 :** Les différents paramètres environnementaux et enzymatiques jouant un rôle dans le métabolisme des S-nitrosothiols (RSNO). Oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ), S-nitrosoglutathion (GSNO), S-nitrosocystéinyglycine (CysGlyNO), S-nitrosocystéine (CysNO),  $\gamma$ -glutamyltransférase (GGT), sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ), protéine disulfure isomérase (PDI), système L de transport des acides aminés (L-AT), thiorédoxine (Trx), glutathion réduit (GSH), guanylate cyclase soluble (GCs), GSNO réductase (GSNOR).

### - La $\gamma$ -glutamyltransférase

La GGT (EC 2.3.2.2) est une glycoprotéine hétérodimérique amphiphile, ancrée en position exofaciale dans la membrane plasmique. Elle est composée de 2 chaînes polypeptidiques formant une sous unité lourde et une sous unité légère (figure 8). Son site actif (Ser 406, Asp 423, Thr 524) est situé sur la sous-unité légère. La masse moléculaire des sous unités varie selon les espèces (Meister *et al.*, 1981). Chez l'Homme, les masses moléculaires de la sous unité légère et de la sous unité lourde sont respectivement de 28 à 30 kDa, et de 60 à 64 kDa.

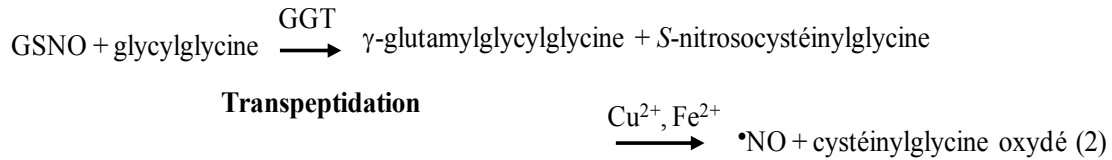
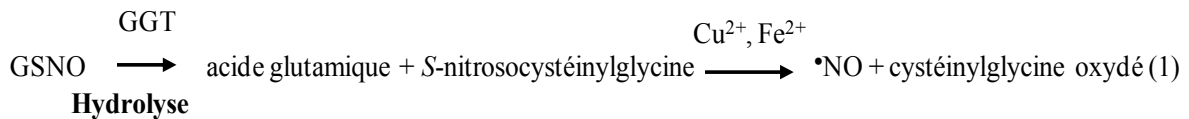
La GGT est présente dans les membranes des cellules de nombreux organes comme les reins, les voies biliaires, le pancréas, le foie, la rate, le cœur, le cerveau, et les vésicules séminales. Cinq à sept gènes ou pseudogènes codant pour la GGT ont été identifiés chez l'Homme, localisés pour certains d'entre eux sur le chromosome 22.



**Figure 8 :** Structure de la  $\gamma$ -glutamyltransférase.

La GGT est l'enzyme majoritairement impliquée dans le clivage du GSH, du GSSG, et ses dérivés sulfo-conjugués (Lieberman *et al.*, 1995). Elle représente l'enzyme clé du cycle  $\gamma$ -glutamyle permettant le recyclage du GSH. Le GSH sérique n'étant pas capable de pénétrer dans la cellule sous forme de tripeptide, son clivage par la GGT permet la capture des acides aminés, en particulier de la cystéine, destinés à la synthèse du GSH intracellulaire. La GGT catalyse également de façon spécifique le catabolisme du GSNO selon deux types de réactions, hydrolyse (1) ou transpeptidation (2) :





Cette dernière réaction correspond au transfert du résidu  $\gamma$ -glutamyle d'un donneur à un accepteur conduisant à la libération de la CysGlyNO. La CysGlyNO est un composé instable qui va rapidement libérer le  $\bullet$ NO en présence d'ions métalliques tels que les ions cuivrique (Hogg *et al.*, 1997, Angeli *et al.*, 2009).

*In vitro*, les études cinétiques montrent que le GSNO est converti en CysGlyNO avec une constante de Michaelis (Km) semblable à celle du GSH, de l'ordre de 28  $\mu$ M (Hogg *et al.*, 1997, Angeli *et al.*, 2009).

Quelques études se sont intéressées à l'implication de la GGT dans le métabolisme et les effets cellulaires médiés par le GSNO. Le rôle de la GGT dans ces effets a été déterminé par l'utilisation de l'inhibiteur compétitif, le complexe sérine borate (SBC), ainsi que l'emploi d'un inhibiteur non compétitif, l'acivicine. D'autres inhibiteurs compétitifs de la GGT existent, comme le *S*-méthylglutathion et le *S*-hexylglutathion, mais ils sont peu utilisés pour étudier l'impact de la GGT dans les effets cellulaires médiés par le GSNO (Hogg *et al.*, 2007, Zheng *et al.*, 2009). Un autre moyen pour étudier l'implication de la GGT dans les effets cellulaires médiés par le GSNO est d'évaluer l'impact de la glycylglycine, un activateur de l'activité enzymatique de la GGT agissant comme un accepteur du résidu  $\gamma$ -glutamyle (Hogg *et al.*, 1997).

Il a été démontré sur des lymphocytes T que l'inhibition de la GGT diminue les effets antiprolifératifs du GSNO de 5 à 10 fois (Henson *et al.*, 1999). Le rôle de la GGT a également été mis en évidence dans l'activation de la voie AKT/HIF-1 médiée par le GSNO sur des cellules endothéliales pulmonaires (Carver *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'équipe de Lipton *et al.* (2001) a montré que le GSNO régule les réponses ventilatoires à l'hypoxie et que cette réponse est altérée chez les souris knockout en GGT. Ces observations montrent que le GSNO et son métabolisme par la GGT sont impliqués dans la régulation de la respiration.

Au meilleur de notre connaissance, peu d'études se sont déjà focalisées sur l'implication de la GGT dans le métabolisme du GSNO au niveau vasculaire. Il a été démontré que

l'administration de l'acivicine, par voie intraveineuse chez des rats Wistar augmente la demi-vie du GSNO de 5 fois et prolonge l'effet hypotenseur du GSNO (Kashiba *et al.*, 1999). Ces résultats montrent que la GGT circulante est impliquée dans la dégradation du GSNO au niveau de la circulation sanguine. Récemment, sur anneau d'aorte isolé de rat, il a été montré que l'inhibition de la GGT par l'acivicine provoque une diminution de la quantité de RSNO intracellulaire de  $60,0 \pm 3,7$  % et une augmentation de la valeur de CE50 du GSNO de  $15,0 \pm 2,6$  % (Heikal *et al.*, 2011). Donc, la GGT joue un rôle important dans la libération de  $\text{NO}$  à partir de GSNO, dans la nitrosation des protéines au niveau intracellulaire et elle participe aux effets vasorelaxants induits par le GSNO (Heikal *et al.*, 2011).

En biologie clinique, depuis longtemps, la mesure de l'activité de la GGT plasmatique est utilisée comme un biomarqueur de pathologies hépatiques et d'intoxication alcoolique (Lum et Gambino, 1972, Rollason *et al.*, 1972, Papoz *et al.*, 1981). Beaucoup d'études épidémiologiques ont montré que l'activité de la GGT plasmatique est augmentée dans le diabète (Lee *et al.*, 2003) et dans différentes maladies vasculaires comme l'hypertension (Ermis *et al.*, 2012) et l'athérosclérose (Franzini *et al.*, 2009). Cependant, très peu d'études ont évalué le rôle de la GGT au niveau tissulaire. Récemment, les travaux de Franzini *et al.* (2009) ont montré chez des patients atteints d'athérosclérose que l'augmentation de l'activité GGT plasmatique était associée à une augmentation de l'activité enzymatique au niveau de la plaque d'athérome. Donc, on peut supposer que la GGT tissulaire influence les effets du GSNO dans des situations pathologiques. Cet axe de recherche est encore peu exploré dans la littérature.

#### - Le système L de transport des acides aminés

Le système L de transport des acides aminés (L-AT) est un transporteur hétérodimérique exprimé dans les érythrocytes, les cellules musculaires lisses vasculaires et endothéliales (Sandmann *et al.*, 2005, Broniowska *et al.*, 2006, Granillo *et al.*, 2008, Riego *et al.*, 2009). Ce transporteur possède deux chaînes peptidiques, une lourde et une légère. Elles sont attachées entre elles par un pont disulfure nécessaire à la stabilité des deux sous-unités. Certains RSNO de faible masse moléculaire comme la *S*-nitrosohomocystéine, la CysGlyNO et la CysNO sont importés directement à l'intérieur de la cellule grâce au transporteur L-AT qui contrôle le niveau intracellulaire des protéines *S*-nitrosées (Zhang et Hogg, 2004). Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence le rôle de L-AT dans le transport de  $\text{NO}$  au niveau intracellulaire et dans sa participation aux effets vasorelaxants induits par GSNO. En effet, l'inhibition de la L-

AT par l'acide 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylique, provoque une diminution de la quantité de S-NO intracellulaire de  $65,0 \pm 3,9$  % et une augmentation de la valeur de CE50 du GSNO de  $40,0 \pm 2,1$  % (Heikal *et al.*, 2011).

#### - La GSNO réductase

La GSNOR (EC 1.2.1.1), appelée aussi formaldéhyde déshydrogénase GSH-dépendante, est une enzyme ubiquitaire NADH-dépendante exprimée chez les levures, les plantes et les mammifères (Jensen *et al.*, 1998, Staab *et al.*, 2009). Elle est capable d'oxyder les alcools à chaîne moyenne, les dérivés du GSH comme le *S*-hydroxyméthylglutathion et le GSNO (Jensen *et al.*, 1998). La GSNOR, en utilisant le NADH comme cofacteur, joue le rôle d'une enzyme intracellulaire terminale dans le métabolisme du GSNO. Elle catalyse spécifiquement la dégradation du GSNO en un intermédiaire le GS(NHOH) qui à son tour réagit avec le GSH pour produire GSSG et NH<sub>2</sub>OH, ou bien qui s'hydrolyse spontanément et produit GSO<sub>2</sub>H et de l'ammoniac (Jensen *et al.*, 1998). Donc, à l'inverse d'autres enzymes métabolisant le GSNO comme la GGT, le produit final de la réaction catalysée par le GSNOR n'est pas le \*NO. Par conséquent, l'action de la GSNOR retire le \*NO du pool total disponible dans la cellule. Donc, contrairement aux autres enzymes étudiées, elle diminue la biodisponibilité de \*NO, d'où l'intérêt du développement d'inhibiteurs de cette enzyme.

Des études récentes ont mis en évidence dans des conditions physiologiques le rôle de la GSNOR dans le maintien du tonus vasculaire. En effet, l'inhibition de la GSNOR entraîne une vasorelaxation de l'anneau d'aorte isolé de rat (Chen *et al.*, 2013). Par ailleurs, des souris déficientes en GSNOR présentent un tonus vasculaire périphérique réduit et une diminution de la contractilité cardiaque stimulée par un agoniste  $\beta$ -adrénergique (Beigi *et al.*, 2012). Ces observations suggèrent une implication de l'enzyme dans l'homéostasie cardiovasculaire.

Il a été également montré que chez des rats hypertendus, l'administration orale de l'inhibiteur de GSNOR (N6338) pendant 14 j réduit la pression artérielle ( $170,0 \pm 5,3$  mmHg *vs.*  $203,8 \pm 1,9$  mmHg pour le contrôle) et restaure la dilatation flux-dépendante ( $7,4 \pm 1,7$  % *vs.*  $13,0 \pm 3,1$  % pour le contrôle) (Chen *et al.*, 2013).

Le rôle de GSNOR dans la diminution de la biodisponibilité du \*NO au cours de maladies pulmonaires a été davantage caractérisé dans le contexte de l'asthme et des inhibiteurs de GSNOR sont actuellement en développement (Henderson et Gaston, 2005, Sun *et al.*, 2011).

### - La carbonyle réductase 1

La carbonyle réductase 1 (EC 1.1.1.184) est impliquée dans le métabolisme du GSNO (Bateman *et al.*, 2008). C'est une enzyme cytosolique distribuée dans de nombreuses cellules notamment dans les cellules gliales et les cellules musculaires lisses (Oppermann, 2007). Classiquement, la carbonyle réductase 1 est connue pour participer à la réduction d'une large gamme de substrats contenant un groupement carbonyle mais également différentes molécules exogènes dont les prostaglandines et les stéroïdes. Elle métabolise le GSNO avec un mécanisme semblable à celui de la GSNOR en produisant un intermédiaire GS(NHOH) qui réagit avec le GSH pour produire NH<sub>2</sub>OH et GSSG (Broniowska *et al.*, 2013). Il n'y a donc pas de production de <sup>•</sup>NO. Une comparaison de la cinétique du catabolisme du GSNO entre la GSNOR et la carbonyle réductase 1 à partir de GSNO montre que la GSNOR est plus efficace dans le catabolisme spécifique du GSNO (Staab *et al.*, 2011).

### - Les rédoxines : la thiorédoxine et la protéine disulfure isomérase

Les rédoxines sont des protéines ubiquitaires présentes dans les procaryotes et les eucaryotes. Elles possèdent des caractéristiques structurales et/ou fonctionnelles communes. Cette famille regroupe entre autres les Trx, les glutarédoxines, les PDI, les thiol-peroxydases, les Dsb procaryotiques, les glutathion-S-transférases et les méthionine sulfoxyde réductases (Pan et Bardwell, 2006). Les rédoxines constituent une famille de protéines possédant des activités d'oxydase, de réductase et d'isomérase (Holmgren, 1989, Collet et Messens, 2010). La caractéristique des membres de cette famille est la présence de deux résidus cystéine généralement conservés d'un membre à un autre séparés par deux acides aminés variables (CXXC) (Holmgren 1989, Holmgren 1995). La première cystéine en position N-terminale (cystéine catalytique) est susceptible de réaliser des attaques nucléophiles. En outre, la seconde cystéine en position C-terminale est appelée cystéine de recyclage et se trouve en position plus enfouie dans la protéine (Noiva et Lennarz, 1992, Holmgren, 1995).

Les rédoxines sont impliquées dans des nombreuses fonctions cellulaires : la réparation des protéines, la régulation de l'apoptose, la prévention du stress oxydant et la signalisation de <sup>•</sup>NO *via* des réactions de dénitrosation (Holmgren et Lu, 2010). Parmi les rédoxines, les Trx et les PDI sont les plus étudiées pour comprendre les mécanismes de dénitrosation des RSNO (Ramachandran *et al.*, 2001, Sengupta *et al.*, 2007, Sengupta et Holmgren, 2012).

Concernant la Trx, il existe trois isoformes humaines. La thiorédoxine-1 (Trx-1), la plus étudiée dans les mécanismes de dénitrosation des RSNO (tableau 3), existe principalement dans le cytosol, mais elle se retrouve également dans le noyau et le plasma. Les deux autres

isoformes sont la thiorédoxine-2 (Trx-2), également connue comme la Trx mitochondriale, et la SpTrx, une isoforme exprimée dans les spermatozoïdes (Miranda-Vizuite *et al.*, 1998). Les Trx peuvent être réduites en présence de NADPH par une flavoenzyme, la thiorédoxine réductase (TrxR), qui appartient à la famille des pyridine disulfure oxydoréductases.

Par ailleurs, il y a actuellement 19 membres identifiés dans la famille PDI humaine (Appenzeller-Herzog *et al.*, 2008) : PDI, PDIp, Erp18, Erp27, Erp28/29, Erp44, Erp46 (ou EndoPDI), Erp57, Erp72, P5, PDIr, TMX (Thioredoxin-Related Transmembrane Protein), TMX2, TMX3, TMX4, Hag2 et Hag3, Erdj5, et PDILT. Ils sont homologues à la Trx et chacun d'eux contient deux résidus cystéine au niveau du site actif CXXC (Appenzeller-Herzog et Ellgaard, 2008). Leur localisation est principalement le réticulum endoplasmique, mais ces enzymes sont également sécrétées par certaines cellules comme les cellules endothéliales, à la surface desquelles elles restent associées par des interactions électrostatiques (Zai *et al.*, 1999).

**Tableau 3** : Principales caractéristiques des rédoxines à forte activité dénitrosante : la thiorédoxine et la protéine disulfure isomérase.

	<b>Thiorédoxine-1 (Trx-1)</b>	<b>Protéine disulfure isomérase (PDI)</b>
<b>Masse moléculaire</b>	12 kDa	57 kDa
<b>Site actif (n)</b>	Cys-Gly-Pro-Cys (1)	Cys-Gly-His-Cys (2)
<b>pKa (SH)</b>	7,5	6,7; 9,9
<b>Localisation Intracellulaire</b>	Cytosol, noyau, plasma, mitochondrie	Membrane plasmique, réticulum endoplasmique
<b>Potentiel rédox</b>	- 270 mV	- 127 mV

Il a été démontré que la Trx-1 est capable de dénitroser les RSNO de faible masse moléculaire comme le GSNO et la CysNO, et de masse moléculaire élevée comme l'AlbSNO (Stoyanovsky *et al.*, 2005, Sengupta *et al.*, 2007, Sengupta *et al.*, 2013).

De même que la Trx-1, la PDI participe au métabolisme des RSNO (Sliskovic *et al.*, 2005). Il a été démontré qu'une inhibition de l'activité de la PDI présente à la surface des plaquettes empêche la dénitrosation du GSNO (Root *et al.*, 2004). Au niveau d'aortes isolées de rat, une étude récente a prouvé que la PDI joue un rôle dans la libération de <sup>•</sup>NO, sa diffusion à travers

la membrane cytoplasmique et les effets vasorelaxants induits par le GSNO (Heikal *et al.*, 2011). En effet, l'inhibition de la PDI par la bacitracine provoque une diminution de la quantité de S-NO intracellulaire de  $39,0 \pm 3,9$  % et une augmentation de la valeur de CE50 de GSNO de  $19,0 \pm 1,9$  %.

Bien que les rédoxines soient reconnues depuis longtemps comme des acteurs de la dénitrosation des RSNO, une littérature émergente a identifié que les rédoxines participent aussi aux réactions de transnitrosation. La revue présentée ci-après (Gaucher *et al.*, 2013), dans sa première partie, explore le rôle des deux enzymes, la Trx et la PDI, dans les réactions de dénitrosation et de transnitrosation dans des conditions physiologiques et pathologiques.

Les RSNO présentent un grand potentiel thérapeutique. Comme nous l'avons décrit précédemment, de nombreux facteurs biologiques peuvent dégrader les RSNO tant au niveau plasmatique que cellulaire. C'est pourquoi, il paraît nécessaire de stabiliser la liaison S-NO afin d'augmenter les quantités de RSNO atteignant les cellules cibles. La deuxième partie de la revue est donc consacrée aux différentes stratégies pour améliorer la stabilité de ces composés, d'une part par des modifications de leur structure chimique et d'autre part par leur incorporation dans des formes galéniques appropriées. Ces stratégies doivent permettre de protéger les RSNO de l'action des systèmes enzymatiques de transnitrosation / dénitrosation tout en assurant leur libération contrôlée, de façon à mimer la libération physiologique de  $^*NO$ .

**2.3.3.3. Article 1.** C. Gaucher, A. Boudier, F. Dahboul, M. Parent, P. Leroy. *S*-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of *S*-nitrosothiols. *Curr. Pharm. Des.* 2013;19(3):458-72.

## S-nitrosation/Denitrosation in Cardiovascular Pathologies: Facts and Concepts for the Rational Design of S-nitrosothiols

Caroline Gaucher, Ariane Boudier, Fatima Dahboul, Marianne Parent and Pierre Leroy\*

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

**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 reactions. S-nitrosation was recently defined as a post-translational modification of proteins for cellular signalling, 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 has been shown to denitrosate S-nitrosoproteins depending on its 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 signalling 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 stabilisation of the S-NO bond and protection against enzymatically active proteins such as PDI/Trx are major points for the design of stable compounds. S-nitrosothiols entrapment in innovative formulations (films, gels, microparticles, nanoparticles) is an emerging field in order to stabilise and protect them, and to deliver \*NO under a sustained release at the targeted site.

**Keywords:** Thioredoxin, protein disulfide isomerase, nitric oxide, nitrosation, S-nitrosothiol, \*NO donors, innovative formulation.

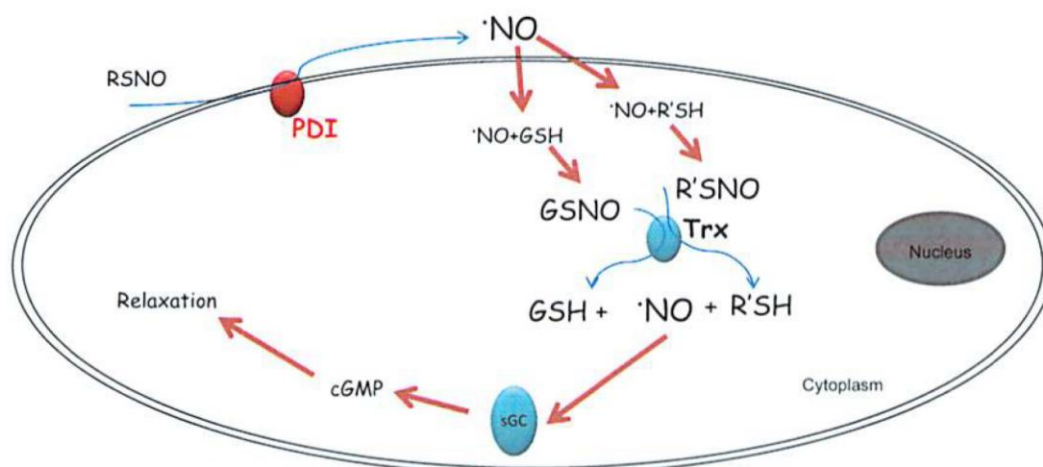
### INTRODUCTION

The biochemical actions of nitric oxide (\*NO) are not easily compatible with its chemical properties. Indeed, from the chemical point of view, \*NO is highly reactive with a short half-life and has selective signalling biochemical actions. An intriguing question is "how \*NO can exist and move inside the cell without being instantaneously sequestered by other molecules". Possible answer is to consider the implication of peptides and proteins in \*NO transport, storage and propagation of the biochemical signalling of \*NO. NO-bonomic is the novel metabonomics approach for the global profiling of \*NO metabolism and *in vivo* signalling. It has been defined by Janero *et al.*, as the "global NO metabolic profiling which would encompass the quantitative *in vivo* mapping of NO-related metabolites of either endogenous or exogenous (*i.e.*, extragenomic) origin and how they are affected by disease, drug exposure, or other (patho)physiological influences. The set of NO-related metabolites and any products of their interaction identified under the prevailing conditions of the organism would constitute a NObonome" [1]. Moreover, S-nitrosation and nitrosylation of proteins implicated in cellular functional regulation are part of the NO-bonomic. Protein S-nitrosation, which is the addition of \*NO to a cysteine residue (RSH), forming S-nitrosothiols (RSNO), constitutes a post-translational modification of proteins for cellular signalling. This modification is as important as glycosylation and phosphorylation. Nitrosylation is the addition of the radical \*NO to the metallic center (mostly iron) of metalloproteins like soluble guanylate cyclase (sGC) and cytochrome P450 regulating their enzymatic activities. \*NO is synthesized *in vivo* from L-arginine through catalytic action of three NO synthases (NOS) isoenzymes, including neuronal (nNOS), inducible (iNOS), and endothelial NOS (eNOS). eNOS is expressed in endothelial cells (EC) as a constitutive enzyme and produces picomolar to nanomolar concentrations of \*NO for short periods in response to receptor stimulation (acetylcholine, bradykinin) or shear stress [2,3]. \*NO through its vasodilator activity is

crucial for the maintenance of vascular homeostasis. Indeed, \*NO diffuses from EC to smooth muscle cells where it activates sGC through nitrosylation to produce cyclic guanosine monophosphate (cGMP), activating a signalling pathway inducing vasorelaxation (Fig. (1)).

According to a pharmaceutical point of view, \*NO donors are prescribed into cardiovascular diseases. Since \*NO is characterised by an extremely short half-life *in vivo* (*ca.* 5 s), it is administered as a prodrug. Nonetheless, classical \*NO donors have shown some limitations as a fast release of \*NO, a relatively poor distribution to the targeted site (the vascular smooth muscle), an oxidative stress induction, and a tolerance phenomenon generation [4]. A way to solve these problems consists in the development of \*NO donors based either on physiological S-nitrosothiols (RSNO), such as S-nitrosoglutathione (GSNO) and S-nitrosoalbumin (AlbNO), or exogenous ones, such as S-nitroso-N-acetylcysteine (NACNO) and S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP). Endogenous high molecular weight RSNO such as AlbNO, S-nitrosohemoglobin and low molecular weight ones (e.g. GSNO), are a physiological reservoir of \*NO, thus they can become potential \*NO donors for cardiovascular disease treatments. As albumin is the most abundant protein in plasma (35-50 g/L), it is not surprising that the major circulating plasma S-nitrosoprotein is AlbNO [5], which has been proposed to act as a reservoir of \*NO within the circulation, transporting and releasing \*NO inside the vascular beds. A major subset of S-nitrosated proteins including circulating AlbNO are in equilibrium through spontaneous transnitrosation reactions with reduced glutathione (GSH), leading to a low molecular weight RSNO, *i.e.* GSNO, which acts as a second messenger to transduce \*NO bioactivity [6,7]. Indeed, some studies clearly showed that RSNO denitrosation takes place nonenzymatically by rapid transnitrosation reactions in whole blood between GSNO and albumin or in intact cells between albumin and GSH [8,9]. However, some differences in the denitrosation rate of individual RSNO have been noted, suggesting the existence of additional structural factors [9]. The transfer can also be spontaneous implicating the thiols at the cell membrane [10]. However, the relatively unfavorable kinetics of transnitrosation reactions [11] suggest that enzyme-mediated systems are required for the process to happen in a sufficient fast way to medi-

\*Address correspondence to this author at the CITHEFOR – EA 3452, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France; Tel: +33 (0) 3.83.68.23.77; Fax: +33 (0) 3.83.68.23.01; E-mail: pierre.leroy@pharma.uhp-nancy.fr



**Fig. (1).** Transfer and release of  $\cdot\text{NO}$  by thiol disulfide oxidoreductase enzymes such as protein disulfide isomerase (PDI) and thioredoxin (Trx). Only the PDI at the plasma membrane of the cell is represented here because it is involved in the RSNO influx. Inside smooth muscle cells,  $\cdot\text{NO}$  induces vasorelaxation through the activation of the soluble guanylate cyclase (sGC) pathway. cGMP: cyclic guanosine monophosphate; GSNO: S-nitrosoglutathione; GSH: reduced glutathione; RSNO: S-nitrosothiol.

ate signalling events. These systems include disulfide forming/isomerizing enzymes, which are the main enzymes acting to trans/denitrosate RSNO and finally to deliver  $\cdot\text{NO}$ . The two major enzyme families forming this class are the thioredoxin (Trx) and the protein disulfide isomerase (PDI), both of which have been shown to be involved into transnitrosation and denitrosation processes.

Consequently, endogenous RSNO that include  $\cdot\text{NO}$ -traffic proteins (high molecular weight) or peptides (low molecular weight) can be used as reliable and safe  $\cdot\text{NO}$  donors [12]. A  $\cdot\text{NO}$ -traffic protein is a protein with high efficiency of S-nitrosation, high stability of the S-nitroso group in the blood stream and high efficiency in transnitrosation inside the cells [13]. They protect  $\cdot\text{NO}$  from degradation (mostly oxidation and radical reactions) and can deliver it to the appropriate site of action (tissues and cells). So, this kind of  $\cdot\text{NO}$  donors will trigger physiological dynamics to deliver  $\cdot\text{NO}$  to its cellular target. Considering the lability of the S-NO bond (under exposure to light, metals, reducing agents, enzymes), a rational drug design of  $\cdot\text{NO}$  donors is required to obtain a prolonged and controlled release of  $\cdot\text{NO}$ . In this way, the chemical stabilisation of the S-NO bond is the key to increase  $\cdot\text{NO}$  donors half-life. Indeed, the alpha or beta substitutions on the carbon atom (C $\beta$ -C $\alpha$ -S-NO), with an electrodonor group and a positive charge respectively, are of great importance to promote RSNO stability [14,15]. Furthermore, RSNO formulation into nanoparticles (NP), making a physical barrier between RSNO and the environment, will help to increase its half-life in the blood stream. Otherwise, physiological RSNO like GSNO are hydrophilic, thus further modifications of RSNO increasing their lipophilicity will ensure a long time  $\cdot\text{NO}$  delivering formulation.

This review will focus on the process of RSNO denitrosation and transnitrosation *via* disulfide forming/isomerizing enzymes such as Trx and PDI. In addition, we will review the relationship between disulfide forming/isomerizing enzymes and pathology. Finally through the overview of the specificity of the sites and motifs of S-nitrosation, we will give some keys to identify potential candidates for new  $\cdot\text{NO}$  delivery drugs development and their rational design.

#### TRANSNITROSATION/DENITROSATION

It is widely assumed that the biological effects of RSNO are attributed to the homolytic cleavage of the S-NO bond with release of  $\cdot\text{NO}$  [16,17]. The rate of  $\cdot\text{NO}$  release from RSNO is dependent

upon many factors, such as pH, partial pressure of  $\text{O}_2$ , light, metal ion concentration, presence of reducing and chelating agents, excess of thiols and enzymes [18,19]. However, Arnelle *et al.* demonstrated that  $\text{NO}^-$  (*via* nitrosyl transfer),  $\cdot\text{NO}$ , and  $\text{NO}^\cdot$  (nitroxyl anion) are released from RSNO at physiological pH [18]. Furthermore, the rate of  $\cdot\text{NO}$  group transfer (transnitrosation) from a RSNO to myoglobin is more rapid than rates of  $\cdot\text{NO}$  release by a RSNO alone [18]. These results suggest that heterolytic mechanisms of decomposition constitute significant pathways in RSNO metabolism.

S-nitrosothiols can undergo spontaneous [20] or assisted transnitrosation from one thiol to another one. The spontaneous transnitrosation from high to low molecular weight RSNO depends on the pKa of the thiol group. Indeed, transnitrosation occurs as the nitroso-nitrogen atom is attacked by the nucleophilic thiolate anion. So, the reaction rate is dependent on the reactivity of the thiol, which is correlated with the pKa of the sulfhydryl group. Besides, Wang *et al.* showed that transnitrosation rate constant increases in a linear relationship with the pKa of the thiol group [20].

Inside the cell cytoplasm,  $\cdot\text{NO}$  can react with GSH to form GSNO, an intracellular pool of  $\cdot\text{NO}$ . Transnitrosation can be catalyzed by disulfide forming/isomerizing enzymes such as Trx and PDI. This class of proteins commonly known as thiol disulfide oxidoreductases catalyzes thiol disulfide exchange *in vivo* reactions [21]. The activity of these enzymes depends on a common motif with one pair of cysteine (Cys) residues arranged in a Cys-X-X-Cys motif (X is any amino acid). This motif is usually integrated in a domain sharing structural homology with Trx. The Cys-X-X-Cys motif has become the hallmark of proteins that are involved in forming or breaking disulfide bonds.

#### Thioredoxin

The thioredoxin system consists of Trx, NADPH and thioredoxin reductase [22]. It is essential for the regulation of cellular redox state and plays an important role in reducing the disulfide bonds of proteins through an interaction with the redox-active site center of Trx. Human Trx contains five Cys residues, including two, Cys32 and Cys35 in its evolutionary conserved -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys- catalytic center. In their reduced thiol form (rTrx), Cys32 and Cys35 can catalytically reduce specific protein disulfide bonds and can serve as a denitrosase toward specific S-nitrosated proteins [23-25], resulting in the formation of a disulfide bond be-



tween Cys 32 and Cys 35 (Fig. (2)). There are multiple forms of Trx encoded by different genes. Thioredoxin-1 (Trx-1), the most extensively studied, exists primarily in the cytosol, but is also found in the nucleus and blood plasma [22]. The two other isoforms are thioredoxin-2 (Trx-2) also known as a mitochondrial Trx, and SpTrx, an isoform expressed in spermatozoa [26].

In this review, we will focus on cytosolic and circulating Trx-1, which are the most important location for RSNO (as  $\cdot\text{NO}$  donor) catabolism. It has been shown that Trx is able to denitrosate low molecular weight peptides (23 to 30 kDa) like GSNO or *S*-nitrosocysteine (CysNO), or high molecular weight proteins like AlbNO, *S*-nitrosometallothionein and *S*-nitrosocaspases 3 and 8 [23,27,28]. Human Trx-1 is a 12 kDa oxidoreductase enzyme containing a dithiol-disulfide active site. It is a ubiquitous protein induced by oxidative stress that is found in the cytosol and in the mitochondria of cells. Some reports also showed that Trx accumulates in the lipid raft fraction of the plasmic membrane of EC that may be involved in the adherence of leukocytes [29]. *In vitro* experiments showed that Trx is able to reduce nitrosated substrates to thiols in a variety of proteins and peptides like the transcription factor AP-1, caspase-3, metallothionein, and GSNO [27,30,31].

Haendeler *et al.* showed that Trx is constitutively *S*-nitrosated in EC at a single allosteric Cys residue (Cys69), which is located outside of the active site (which contains Cys32 and Cys35) [32]. Furthermore, *S*-nitrosation of Cys69 is the main facilitating determinant of the oxidoreductase capacity in EC. Indeed, Trx can denitrosate and thereby activate auto-*S*-nitrosated NOS, which is consistent with the finding that active Trx helps to maintain cellular SNO content. It has also been shown that auto-*S*-nitrosation of eNOS inhibits its activity [33,34].

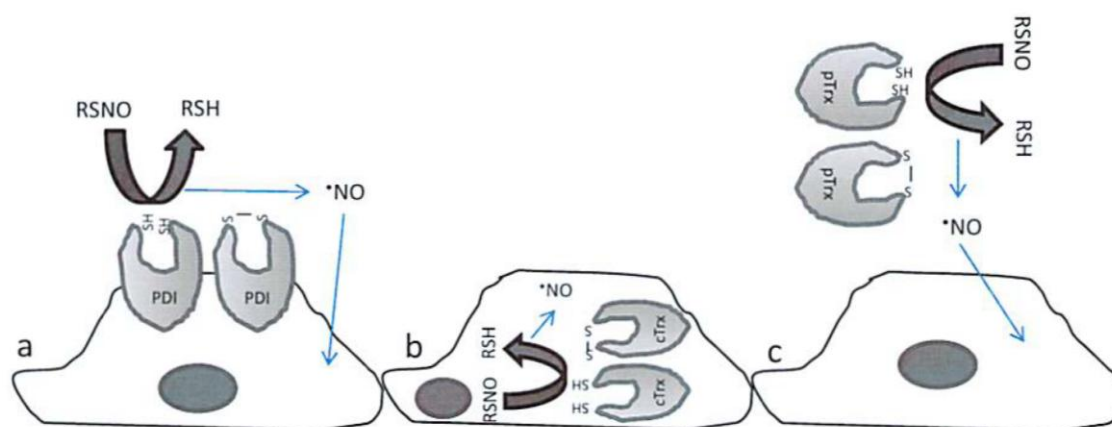
Trx also binds and inactivates the apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1). ASK1 acts as a mitogen-activated protein kinase (MAPK), which activates the Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK pathways and is required for TNF $\alpha$ -induced apoptosis. The analysis of Haendeler *et al.* indicated that *S*-nitrosation of Trx at Cys69 is necessary for its basal anti-apoptotic function in EC [32]. However, it has also been reported that treatment with GSNO can induce *S*-nitrosation of Trx in intact cells and dissociate ASK1 [35], possibly by targeting active-site Cys32 and/or Cys35. Accordingly, whereas basal *S*-nitrosation of Cys69 will facilitate oxidoreductase and anti-apoptotic functions, *S*-nitrosation of active-site Cys (which might be induced by nitrosative stress) might exert an apoptotic effect. This would occur through the release of ASK1 and the inhi-

bition of oxidoreductase function (including ROS scavenging), which would result from active-site thiol modification.

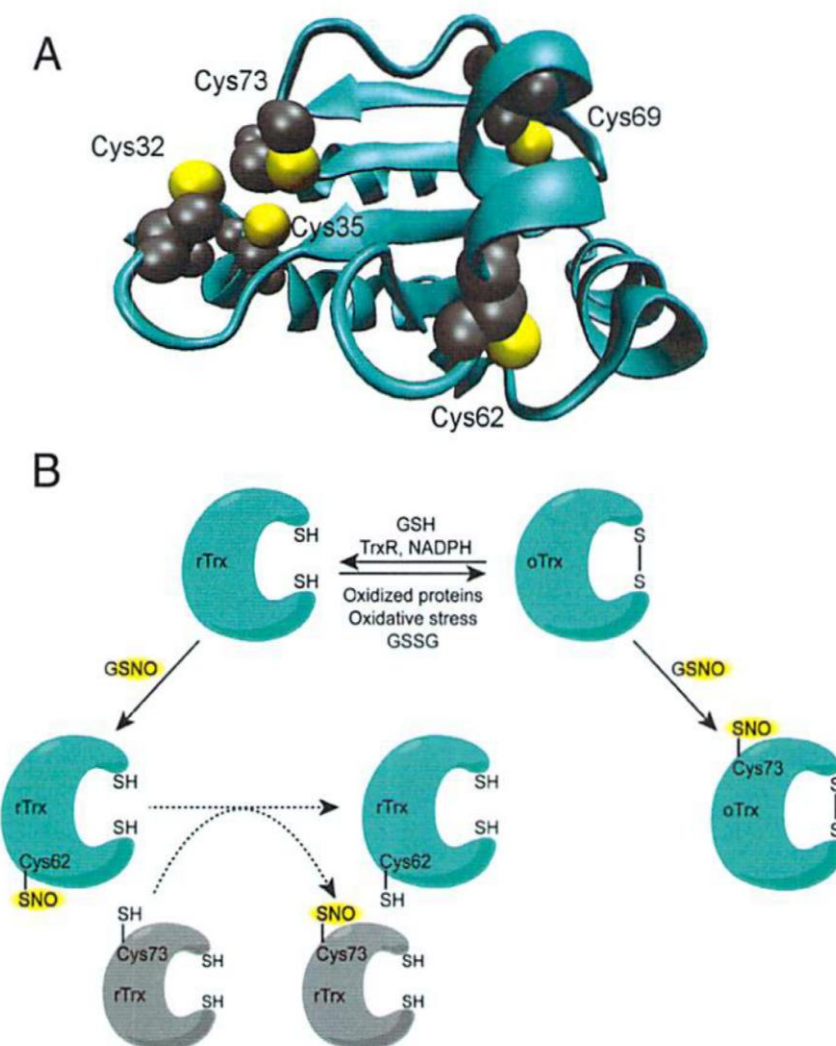
Human Trx contains five Cys (Cys32, Cys35, Cys62, Cys69, and Cys73) that can be readily *S*-nitrosated both *in vitro* and *in vivo* [32,35,36,37]. There are inconsistent results pertaining to the specificity of GSNO-dependent nitrosation of Trx. Nitrosation has been reported on all three of the non-active-site Cys, Cys62 [38,39], Cys69 [32,40,41] and Cys73 [37,40,42,43,44]. More recently, Barglow *et al.* showed that the differences in Cys selectivity for nitrosation between the reduced (rTrx) and oxidized (oTrx) forms of Trx may represent a redox-dependent "switch" for signal transduction via cascading transnitrosation reactions (Fig. (3)) [45]. Because Cys73 and Cys62 are on opposite faces of the protein, it is possible that oTrx-SNO and rTrx-SNO have different binding partners and thus different downstream transnitrosation targets such as caspase-3 under oxidative stress. This would provide an alternate mechanism of signal transduction during periods of nitrosative or oxidative stress.

From all of these considerations on nitrosation of Cys belonging to the active site or the three other Cys residues, arose ideas on the distinction between transnitrosation and denitrosation activities of Trx. Indeed, it is known that oTrx can be nitrosated on Cys73 and can still act as a transnitrosating agent [37,44]. When Cys32 and Cys35 are reduced, Trx can act as a denitrosylase or as a reductase. Clear evidences have been provided that Trx can denitrosate some proteins and transnitrosate other ones. Indeed, Benhar *et al.* demonstrated that Trx is unable to denitrosate the key antioxidant enzyme peroxiredoxin 1 [24] whereas Wu *et al.* found that peroxiredoxin 1 is transnitrosated by SNO-Trx [44]. Furthermore, a recent study investigated the distinction between Trx transnitrosation and denitrosation activities and target proteins [25]. For example, both  $\alpha$ -tubulin and GAPDH are sensitive to both SNO-Trx transnitrosation and rTrx denitrosation, while peroxiredoxin 1, peptidyl-propyl cis-trans isomerase A and  $\alpha$ -enolase are only SNO-Trx transnitrosating targets and not Trx denitrosating targets [25].

Thioredoxin is a key oxidoreductase enzyme that has firstly been shown to be implicated in the denitrosation of *S*-nitroso-proteins. Multiple studies presently cited, have clearly demonstrated that Trx can undergo post-translational modifications through *S*-nitrosation of two Cys not included in its active site. These post-translational modifications lead to the transnitrosating activity of Trx. However, Trx is not the only oxidoreductase enzyme present in eukaryotic cells. PDI must have also its own role in  $\cdot\text{NO}$  transfer.



**Fig. (2).** The different locations of thiol disulfide oxidoreductase enzymes such as protein disulfide isomerase (PDI) and thioredoxin (Trx) implicated into the transfer of  $\cdot\text{NO}$  from the blood circulation to the cytoplasm of cells. The *S*-NO bond is catabolized by the reduced Cys of thiol disulfide oxidoreductase enzymes releasing  $\cdot\text{NO}$  and oxidizing the enzyme into its disulfide form. a) Protein disulfide isomerase (PDI); b) Cytoplasmic thioredoxin (cTrx); c) Plasmatic Thioredoxin (pTrx). RSNO: *S*-nitrosothiol; RSH: thiol.



**Fig. (3).** Model of nitrosation selectivity for oxidized and reduced thioredoxin (oTrx and rTrx). (A) rTrx structure (based on PDB ID code 1ERT) showing the location of the 5 Cys. (B) Proposed model for interconversion and nitrosation of rTrx and oTrx. From [45]; copyright authorized by PNAS.

### Protein Disulfide Isomerase

PDI was the first thiol disulfide oxidoreductase identified about 40 years ago [46]. Seventeen human PDI-family members have now been identified in the endoplasmic reticulum (ER), with a wide range of domain architectures and active-site chemistries [47]. PDI is a versatile enzyme. Indeed, depending on the redox environment and the characteristics of the protein substrates, PDI can catalyze the formation, the reduction or the isomerization of disulfide bonds. Although large levels of PDI are found in the ER, it can also be secreted from cells and associates electrostatically with cell surface, for instance in endothelial, smooth muscle cells and platelets [48-50]. This enzyme family shows little specificity among its protein substrates and it acts on a wide variety of proteins ranging from small, single-domain proteins to large oligomers with multiple domains.

An additional novel activity of PDI is its ability to denitrosate RSNO. PDI is a candidate for specific reactivity toward  $^{\bullet}\text{NO}$  on the cell surface (Fig. (2)). Indeed, some studies have shown evidence for the involvement of PDI expressed on the cell plasma membrane in the RSNO influx (e.g.  $^{\bullet}\text{NO}$  donors based on RSNO) [10,49,51,52]. Furthermore, the active site of PDI includes two Cys residues, one of which has a low  $\text{pK}_a$  (4.5) [53], allowing the result-

ing thiolate anion available for reaction with the nitrosonium ion ( $\text{NO}^+$ ) or facilitating the nucleophilic attack of the S-NO bond. Finally, PDI is involved in thiol-disulfide exchange reactions, which are mechanistically similar to RSH-RSNO exchange reactions.

PDI has been shown to denitrosate GSNO [54] and it is postulated that the  $^{\bullet}\text{NO}$  released through this reaction combines with dioxygen in the hydrophobic environment of either the cell membrane or the PDI protein itself, to form  $\text{N}_2\text{O}_3$ . In that way, PDI becomes a  $^{\bullet}\text{NO}$  carrier via  $\text{N}_2\text{O}_3$  mediated auto-S-nitrosation of its thiol active sites.

PDI and Trx are two disulfide forming/isomerizing enzymes involved in the transfer of  $^{\bullet}\text{NO}$  from a protein to another one. However, this transfer has to satisfy nitrosation specificities in term of Cys environment.

### SPECIFICITY OF S-NITROSATION, SNO SITES AND MOTIFS

The identification of SNO proteins was initially an analytical challenge. In fact, the first techniques available to detect SNO proteins were limited to mercury ( $\text{Hg}^{2+}$ ) reaction coupled with photolysis/chemiluminescence or spectrophotometry. However, these techniques were unable to identify neither the SNO proteins nor the

modified Cys within the proteins. The development of the biotin switch technique by Jaffrey *et al.* made the identification of SNO-proteins possible [55]. Furthermore, the biotin switch technique enables the identification of the modified Cys within the protein when coupled to mass spectrometry.

Among the multiple Cys residues in a protein, only specific ones are modified and are responsible for altering protein functions [56-58].

It has been proposed that nitrosable Cys residues are flanked within 6 Å by basic (Lys, Arg, His) and acidic (Asp, Glu) residues. These residues could regulate S-nitrosation and denitrosation by altering thiol nucleophilicity [59]. Recently, Greco *et al.* identified specific proteins and motifs of S-nitrosation in human vascular smooth muscle cells [60]. In smooth muscle cells incubated with Cys-NO, a <sup>•</sup>NO donor, up to 18 S-nitrosocysteine-containing peptides belonging to 16 proteins such as cytoskeletal proteins (myosin heavy chain 9, vinculin), chaperones, and calcium binding proteins were identified. Sequence alignment of these 18 S-nitrosocysteine-containing peptides revealed a higher occurrence (50% and 40%) of acidic residues (Asp and Glu, respectively) at positions -3 and -4 relative to the Cys residue. The highest occurrence of basic (Lys, Arg, His) residues was 30% at position 2. There was an occurrence of 10% for acidic residues at position 2 and no occurrence for basic residues at positions 3 and 4. Although primary sequences analyses are useful to determine structural features for specific posttranslational modifications, they do not reveal motifs that result from three dimensional protein structures. *In silico* analyses based on 55 crystallized proteins that have been shown to be nitrosated by <sup>•</sup>NO donors were recently performed by Marino *et al.* [61]. They tested first parameters well-known to play a role in post-translational Cys modifications such as pK<sub>a</sub>, and the residue exposure. They found that the pK<sub>a</sub> values of the Cys residues targeted for S-nitrosation are higher (9.1) than those of redox and non-redox catalytic Cys (5.5). Furthermore, 65% of the Cys-NO sites were exposed. S-nitrosation seems to be favored by hydrophobic regions around the target Cys increasing thiol nucleophilicity [62] and concentrating nitrosating agents like albumin in the plasma [63]. Indeed, Rafikova *et al.* showed that in the presence of a physiological concentration of <sup>•</sup>NO, albumin becomes saturated with <sup>•</sup>NO and accelerates the formation of low-molecular-weight RSNO, *in vitro* and *in vivo*. This mechanism is due to micellar catalysis of <sup>•</sup>NO oxidation in the hydrophobic core of albumin. The hydrophobic region within the modified Cys seems also to be of great importance since Sun *et al.*, showed that the ryanodine receptor was nitrosated on only one Cys (cys3635) out of about 50 [62] and located in a hydrophobic pocket.

#### RELATIONSHIP BETWEEN THIOREDOXIN AND NITRIC OXIDE DONORS IN CARDIOVASCULAR DISEASES

Cardiovascular diseases like hypertension, atherosclerosis, thrombosis and cerebrovascular diseases are often associated with oxidative stress. Under oxidative stress (for example exposure of cells to sublethal amounts of hydrogen peroxide) [64], Trx-1 is released from cells, and it appears as a good marker of oxidative stress in plasma [65]: 15-30 ng/mL for healthy volunteers, rising to 40-140 ng/mL in patients suffering from diseases related to oxidative stress [66]. Trx-1 has a protective role in different cardiovascular diseases [67]. Indeed, data indicated that serum Trx-1 levels were found to be significantly increased in patients with acute coronary syndromes and dilated cardiomyopathy [68].

As mentioned in the section concerning Trx, this enzyme has been shown to be S-nitrosated at Cys-69 in EC [32]. Interestingly, Tao *et al.* documented that the intraperitoneal administration of S-nitrosated human Trx in a mouse myocardial ischemia model after 30 min of ischemia and 10 min prior to reperfusion, potentiated the cardioprotective effects of human Trx [36]. These results suggested a possible association between Trx-1 secretion and cardiovascular diseases. Literature data on interactions between RSNO and Trx, as

stated in the section concerning Trx, have focused on GSNO, which is the most abundant low molecular weight RSNO inside the cells [27]. In contrast, data on denitrosation of CysNO, S-nitrosohomocysteine (HCysSNO), and SNAP by Trx are rather limited. The V<sub>max</sub> values for CysSNO, HCysSNO, and SNAP were 1.2, 0.3, and 0.1 nmol of substrate (nmol of Trx)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, respectively [23].

Reduced <sup>•</sup>NO bioavailability, due to either endothelial dysfunction or eNOS deficiency, seems to be involved into the onset and the development of pathologies cited above [69]. Due to its short half-life (few seconds), <sup>•</sup>NO is not administrated *per se* (as a gas) to induce prolonged effect but as <sup>•</sup>NO donor such as sodium nitroprusside or organic nitrates. The indications, which are validated worldwide by the Health Regulatory Authorities, concern angina pectoris, chronic cardiac failure and hypertension in emergency cases. Although, a wide panel of beneficial pharmacological properties is attributed to this radical [70] and a reduced level of <sup>•</sup>NO has been implicated into the onset and the progression of various diseases, the therapeutic indications of <sup>•</sup>NO donors still remain limited. Moreover, RSNO cerebrovascular beneficial effects have already been described. One of the RSNO, i.e. GSNO, was studied in rat under various diseases such as subarachnoid hemorrhage [71], traumatic brain injury [72], and cerebral ischemia [73]. The reported beneficial effects were as follows: increase of cerebral blood flow and improvement of blood perfusion as a consequence of capillaries relaxation; decrease of inflammatory environment; protection *versus* traumatic penumbra in the specific case of the traumatic brain injury; improvement of the overall structure of the tissue with the conservation of the blood brain barrier and the reduction of the post-accident neurological deficit. From a mechanistic point of view, <sup>•</sup>NO provided by GSNO was deemed to suppress iNOS induction but also to enhance at the same time eNOS expression, thus explaining the therapeutic effect of the molecule [74].

The therapeutic use of RSNO is relevant based on their unique capacity to deliver <sup>•</sup>NO and beneficial effects, particularly in the cerebrovascular system. At this time, only GSNO and NACNO have been involved in several clinical trials (Table 1) demonstrating therapeutic interest. Nevertheless, GSNO is quite unstable in the bloodstream (50 min) [75], one of the reasons being its specific breakdown occurring through catalytic reaction with  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase (GGT) [76]. GGT is a central enzyme involved in the degradation of GSH through its specificity for the  $\gamma$ -Glu amino acid [77]. Furthermore, the structure of RSNO has to be modulated to obtain a greater stabilisation and/or protection *versus* environmental attacks through catalytic action of Trx and PDI, to increase the duration of <sup>•</sup>NO delivery in the bloodstream. Thus the potential applications of RSNO require appropriate chemical modification and/or formulation.

#### RATIONAL DESIGN OF S-NITROSTHIOLS FOR A SUSTAINED RELEASE

Due to the lability of <sup>•</sup>NO and its limited diffusion from 40 to 200  $\mu$ m [92], this drug cannot be administered *per se* to reach constant systemic effects, thus it has to be carried by a prodrug. Various kinds of carriers have been designed for this purpose; some of them were based on molecular concepts. Indeed, to delay the interaction with environmental factors as well as proteins such as disulfide forming/isomerizing enzymes, the moiety wearing -NO has to confer a high stability to the final molecule. Moreover, macromolecular as well as macroassembly approaches and lastly drug delivery systems were designed in order to increase either the grafting of -NO moieties *per molecule* or the time of drug release (ensuring a good protection of -NO) or both. As it will be later explained, this can guarantee a good protection of the sensitive -NO part. Besides, the biological effect of the drug is also strongly related to the delivered concentration therefore, its sustained release at the targeted site remains a crucial challenge.

**Table 1. Main characteristics of clinical trials based on administration of S-nitrosoglutathione (GSNO) and S-nitroso-N-acetylcysteine (NACNO) reported in the literature. In all these studies, a research ethics committee was consulted**

Main aim of the study Targeted application	Main conclusion	Number of In- cluded patients	References
<b>Reduction of cerebral embolization</b>			
Carotid angioplasty carotid endarterectomy and/or recurrent stroke and/or systemic embolization	Highly significant reductions in the number of Doppler cerebral embolic signals in GSNO groups	42	[78]
	GSNO resulted in a rapid reduction in the frequency of cerebral embolic signals of 95% at 0 to 3 h and 100% at 6 h	16	[79]
		20	[80]
	Significant reduction of cerebral embolic signals in the GSNO group	24	[81]
<b>Inhibition of platelet activation and/or vasodilatation and/or effect on blood flow</b>			
Percutaneous transluminal coronary angioplasty	Significant inhibition of the increase in platelet surface expression of P-selectin and glycoprotein IIb/IIIa without altering blood pressure	13	[82]
Anti-thrombotic effect	GSNO is a relevant drug for anti-thrombotic effect	10	[83]
Coronary artery saphenous vein grafts	GSNO significantly inhibited platelets activation	24	[84]
Severe Preeclampsia	Reduction of maternal mean arterial pressure, platelet activation and uterine artery resistance without further compromising foetal Doppler indices.	10	[85]
Systemic vasodilatation	Intravenous application of GSNO has similar hemodynamic effect as compared to inhaled NO	10	[86]
Dermal wound dressings and local vasodilation in ischemic tissues	Release of GSNO from films induced local vasodilatation relevant for dermal wound dressings or for promoting local vasodilation in ischemic tissues	7	[87]
Wound healing	Increase of blood flow parallel with NO delivery after application of GSNO or NACNO hydrogel skin application	4	[88]
Female sexual disorder	Increase of clitoral blood flow	40	[89]
<b>Replenishment of GSNO pool</b>			
Effect on left ventricular function	Positive effects on left ventricular function	12	[90]
Effect on cystic fibrosis	Modest improvement of general oxygenation	20	[91]

#### Molecular \*NO Carriers: S-nitrosothiols

The \*NO donors class can be divided into organic nitrates (R-O-NO<sub>2</sub>), for instance glyceryl trinitrate (GTN), nitrites (R-O-NO) and X-nitroso- derivatives (R-X-NO). Moreover, research is cur-

rently focusing on hybrid or dual molecules able to deliver \*NO associated with various drugs (for example, in the non-steroidal anti-inflammatory drug class, both aspirin modified as an organic nitrate derivative, and diclofenac bearing an S-nitroso-moiety were studied; the antihypertensive drug captopril was modified on its

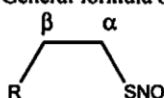
RSH group with the grafting of NO [93,94]. The strategy developed in these cases will not be detailed here.

Among the *X*-nitroso-compounds, -NO can be linked either to metal ligands (named nitrosyl derivative such as sodium nitroprusside) or to carbon, nitrogen and sulfur atoms. As compared to classical <sup>\*</sup>NO donors, RSNO induce neither oxidative stress nor tolerance phenomenon [95]. Moreover, some RSNO are physiological *i.e.* CysNO, GSNO, and AlbNO and they are considered as an important means of <sup>\*</sup>NO storage in the organism [96]. Due to RSNO unique properties that can be associated to a minimal toxicity, they are nowadays extensively studied. Different clinical trials were also led with GSNO and NACNO as already mentioned (Table 1). Therefore, in this review, only the RSNO family will be described, taking into account the main parameters to stabilise the sulfur-nitrogen bond against environmental attacks (for the other <sup>\*</sup>NO donors, see [97]).

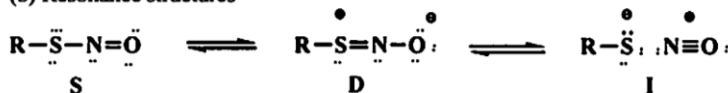
*S*-nitrosothiols are sensitive to the environment conditions, which may be explained by the weak sulfur-nitrogen bond characterised by a homolytic dissociation energy value of 126 kJ/mol. As a consequence, degradation occurs following a treatment by external factors such as light, temperature and internal factors including cationic ions (Cu<sup>2+</sup> *via* Cu<sup>+</sup>), other sulfur containing compounds such as the gaseous messenger H<sub>2</sub>S, ascorbate, and proteins like disulfide forming/isomerizing enzymes. These stress conditions are frequently used to study the stability of newly synthesized products [98]. In order to confer a great stability to the sulfur-nitrogen bond, four main parameters have to be highlighted. Three of them are deeply linked to the three resonance structures described for RSNO (Fig. (4)) [99].

The dominant form S (70 to 80 %) is the usual structure characterised by a single bond between sulfur and nitrogen. In the D form (15 to 25 %) the S-N bond is strengthened since a double bond is

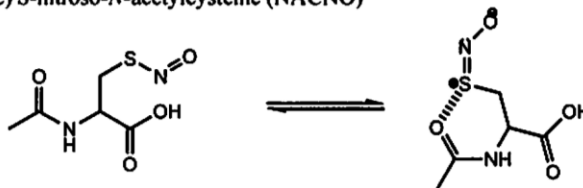
(a) General formula of *S*-nitrosothiol (RSNO)



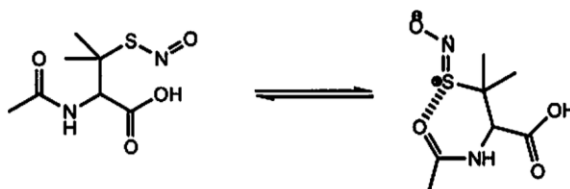
(b) Resonance structures



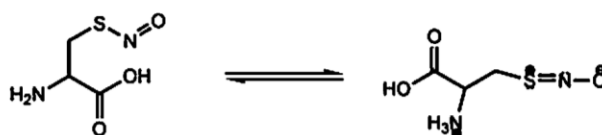
(c) *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO)



(d) *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP)



(e) *S*-nitrosocysteine (CysNO)



(f) *S*-nitrosogluthathione (GSNO)

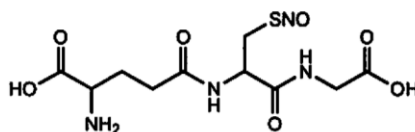


Fig. (4). Structures of low molecular weight *S*-nitrosothiols.

created between these atoms. In contrast, in the ionic form **I** (5 to 10 %) the S-N bond is weak. As a result, each modification that favors the **D** structure will increase the stability and decrease the homolytic cleavage probability. This stable form can be generated by (i) the well-controlled synthesis of S-nitrosocompounds, (ii) the chemical substitution of carbon atoms located either at the alpha position of -SNO group or at its beta position. The last parameter that may induce a better stability *versus* metallic cation attack relies upon the increase of the molecule lipophilicity or its steric hindrance.

A summary of the two physico-chemical as well as vasorelaxant properties of molecules that will be exposed below is proposed in Fig. (5).

Measuring vasorelaxation of isolated and precontracted rat aortic ring [110,111] is now recognized as the most frequently used *ex vivo* model to test efficiency of \*NO donors. The high standardisation level of the assay gives rise to less and less variations between research teams, facilitating data comparison. Another *in vitro* cellular model used to evaluate efficiency of \*NO donors consists in the measurement of cGMP produced by an enzymatic reaction catalysed by sGC; however, most of cultured cell lines derived from muscular cells express low levels and/or inactive sGC to set the assay in a reliable way [112].

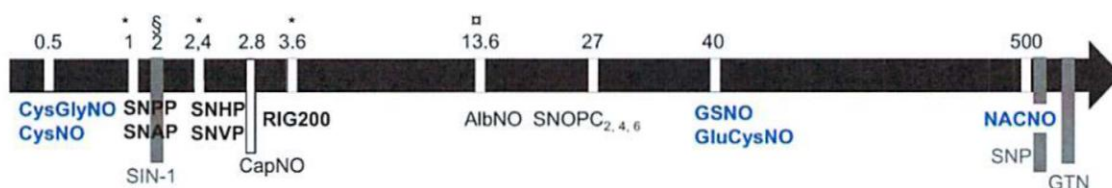
Several chemical procedures have been usually described to synthesize RSNO. In aqueous medium, nitrosation of a thiol is

usually provoked using sodium nitrite in acidic medium, by mixing \*NO/O<sub>2</sub> gas or transnitrosation with another RSNO. Nevertheless, in non-stoichiometric conditions between nitrating reagent and thiol, S-nitroderivatives, RSNO<sub>2</sub>, can be produced [113,114]. Such products show the same UV-visible spectrum; as a consequence, another methodology have to be operated (e.g. HPLC [113,114]) to facilitate their identification. But this reaction is described not to favor the stability of the product because the **D** structure formation does not tend to occur. Indeed, Balazy *et al.* estimated the half-life of GSNO<sub>2</sub> (generated with a five-fold excess of nitrating agent) at *ca.* 30 min in the absence of other destabilising stimuli [113]. The same result was observed in our laboratory not only on the cited product but also after the formation of S-nitro-N-acetylcysteine NACNO<sub>2</sub> (generated by the same excess of nitrite reagent) and was also characterised by a half-life of less than 30 min. Therefore, the operating conditions to obtain RSNO have to be well-defined.

The two carbon atoms located at the alpha and beta positions of the -SNO group (Fig. (4)) are of major importance to design stable RSNO. Firstly, regarding the alpha position, the -SNO stabilisation was reported to be increased with the substitution degree of this carbon atom [14,15]. Nevertheless, the theory was not in accordance with all experimentations, since NACNO (rate of \*NO release = 0.025 nmol.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> in phosphate buffer) was described as more stable than its tertiary substituted derivative, SNAP (0.046 nmol.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> in phosphate buffer pH 7.4) (Fig. (4) and Fig. (5)) [108]. Recent computational work on these molecules (undergoing

### 1. Stability (t<sub>1/2</sub> (h))

Experimental conditions: T = 37 °C, pH 7.4, concentration = 0.1 - 0.5 mM except \* (24°C) § (20°C) and ¶ (in a 1 % bovine serum albumine phosphate buffer)



### 2. Partition coefficient (Log P)

All Log P were calculated using ChemDraw 8.0 soft except when § (experimental data)



### 3. Vasorelaxant efficiency (EC<sub>50</sub> (µM))

Vessels from Male Wistar rats, 37 °C, pH 7.4, 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> + endothelium



**Fig. (5).** Classification of main physico-chemical and physiological properties of various \*NO donors according to literature data [100-109]: *in vitro* stability, partition coefficient (log P) and vasorelaxant efficiency (corresponding to the half maximal effective concentration EC<sub>50</sub> obtained in vasorelaxation measurement of isolated and precontracted rat aortic ring). AlbNO: S-nitrosoalbumin, CapNO: S-nitrosocaptopril, CysNO: S-nitrosocysteine, CysGlyNO: S-nitrosocysteinylglycine, GluCysNO: S-nitroso-γ-glutamylcysteine, GSNO: S-nitrosoglutathione, GTN: Glyceryl trinitrate, NACNO: S-nitroso-N-acetylcysteine, RIG200: N-(S-nitroso-N-acetylpenicillamine)-2-amino-2-deoxy-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranose, SIN-1: Linsidomine, SNAP: S-nitroso-N-acetylpenicillamine, SNHP: S-nitroso-N-heptanoyl-D,L-penicillamine, SNOPC<sub>2</sub>: S-nitrosophytochelatins-2, SNOPC<sub>4</sub>: S-nitrosophytochelatins-4, SNOPC<sub>6</sub>: S-nitrosophytochelatins-6, SNP: Sodium nitroprusside, SNPP: S-nitroso-N-propanoyl-D,L-penicillamine, SNVP: S-nitroso-N-valeryl-D,L-penicillamine.

hydrolysis in acidic medium) [114] proved that the sulfur protonation of SNAP is favored by the presence of the two methyl groups and as a consequence, the equilibrium of the resonance is modified towards the I (51 %) and S (49 %) forms which may ease the nucleophilic attack of -NO moiety [115].

Secondly, as far as the beta position is concerned, the role of this carbon atom as a stabiliser was highlighted when comparing S-nitrosocysteine (CysNO) and NACNO (half-lives of 0.54 h and > 500 h in phosphate buffer, respectively [107]) (Fig. (4) and Fig. (5)). The substitution by a quaternary ammonium functional group, as seen in CysNO, dramatically decreases the stability of the S-NO bond. On the contrary, the presence of a hydroxyl or an acetamido group such as in the second molecule has the opposite effect. Indeed, in the case of CysNO, the positively charged ammonium group leads to an electrostatic repulsion with the sulfur of the S-NO bond. On the opposite, the acetamido substituent of NACNO has a stabilizing effect by the formation of a 6-membered cycle between the carbonyl function of the acetamido and the sulfur of S-NO bond which lacks electrons (Fig. (4)). As a conclusion, the proportion of the D resonance form is highly increased in the case of NACNO and decreased for CysNO [14]. This also gives an explanation to the high stability of GSNO (Fig. (4) and Fig. (5)) versus its active metabolite S-nitrosocysteinylglycine (CysGlyNO) (half-lives of 41 h and 0.5 h in phosphate buffer respectively [107]) after GGT activity or S-nitroso- $\gamma$ -glutamylcysteine (GluCysNO) (half-life of 42 h in phosphate buffer [107]).

Lastly, other chemical modifications of RSNO were directed in order to increase the drug lipophilicity or steric hindrance to improve the drug stability versus metallic ion attack. Two main strategies were undertaken, both being performed on SNAP as the core. On the one hand, a chemical modification was performed with the grafting of a tetra-*O*-acetylglucosamine moiety on the carboxylic function to obtain *N*-(S-nitroso-*N*-acetylpenicillamine)-2-amino-2-deoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -*D*-glucopyranose (RIG200) to modify steric hindrance [104]. On the other hand, a carbon chain was added to the amido group of the molecule: with either a C1 to C4 via a grafted glycine upstream [116] or directly a C3 (S-nitroso-*N*-propionylpenicillamine, SNPP), a C5 (S-nitroso-*N*-valerylpenicillamine, SNVP) to C7 (S-nitroso-*N*-heptanoylpenicillamine, SNHP) [106,117]. The last cited modification led to the establishment of a correlation between measured partition coefficient (log P) and the carbon chain length, from log P = 1.5 for the C3 to 3.5 for C7 versus nearly 1 for SNAP, which is much higher than GSNO (calculated log P = -2.7) or NACNO (calculated log P = -0.46) (Fig. (5)). In each study, the new derivatives were more stable than the mother molecule versus catalytic decomposition by copper ions. Although, the efficient concentration 50 (EC<sub>50</sub>) was not improved (Fig. (5)), a sustained release of \*NO was demonstrated (> 1 h for SNHP compound [106] and > 4 h for the tetra-*O*-acetylglucosamine derivative, RIG200 [104] in presence of vessels). A linear correlation was observed between the lipophilic character of the compound (C3 to C7 RSNO) and the sustained vasorelaxation [106]. As a result, the mechanism of sustained vasodilation was hypothesised to be correlated to retention of the lipophilic RSNO derivatives into the lipid rich domains of the sub-endothelial layers of arteries. Indeed, the effect was obvious into endothelium-denuded vessels. The authors concluded to a selectivity of the compounds towards injured vessels [106].

According to these results, the physico-chemical data of *in vitro* stability and partition coefficient and the vasorelaxant efficiency are difficult to perfectly correlate, and therefore from Fig. (5), no general rule can be formulated. As a consequence, the design of the ideal RSNO appears as a real challenge. Although SNAP and its derivatives showed a delayed degradation through metallic ion attack but a vasorelaxant efficiency lower than GSNO, the sustained release of \*NO appears interesting from a therapeutic point of view. Nevertheless, the development of *N*-acetylpenicillamine

derivatives must include some immunological investigations since penicillamine is known to induce autoimmunity [118]. Moreover, the molecules based on a Cys core present a better vasorelaxant effect and for some of them a satisfying stability (GSNO and NACNO) nonetheless, a sustained delivery of \*NO has never been described from these derivatives to the best of our knowledge.

#### Macromolecular Concepts and Macroassemblies for \*NO Transport

The design of macromolecular \*NO donors is based not only on polypeptides, or proteins, or polymeric structures but also on mixed structures.

Taking the previous chemical data into account and because GluCysNO has a greater stability (half-life of 42 h in phosphate buffer), S-nitroso derivatives of GSH were synthesized [107]. In this way, phytochelatins, ( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)<sub>n</sub>-glycine (n = 2 to 6 for SNOPC<sub>2, 4, 6</sub>), were nitrosated and characterised [98,109]. The modified-glutathione derivatives showed a \*NO release with a half-life of ca. 27 h under *in vitro* conditions. Their efficiency to induce a vasorelaxant effect was in relationship with the number of grafted -NO moiety on the molecule with EC<sub>50</sub> of 0.14, 0.08 and 0.06  $\mu$ M for SNOPC<sub>2, 4, 6</sub>, respectively (Fig. (5)). These oligopeptides did not manage to produce a sustained release of the drug and the authors concluded to combine S-nitrosophytochelatin to drug delivery systems.

Among S-nitrosoproteins, the most studied ones remain AlbNO and its derivatives. As previously mentioned, AlbNO is the main nitrosated protein encountered in the blood [5]. Several procedures are described to obtain the modified protein. Different approaches are usually envisaged: either the simple nitrosation of albumin introducing one -NO moiety on the protein (involving the Cys34) [104,111], or more complex chemical modifications that aim at inserting more -NO groups on albumin via S-NO as well as N-NO bond formation (using an excess of nitrating agent) [119] or with the grafting of chemical groups to anchor more thiols into the protein structure that will then be nitrosated (i.e. Poly-SNO-BSA) [120,121]. Regarding the pharmacokinetic parameters, the half-lives of the nitrosated proteins were improved by the binding of a polyethylene glycol (PEG) group: 147 h for PEG-AlbNO versus 13.6 h for AlbNO in a buffer containing 1 % bovine serum [120] as compared to 5.5 h in human blood under *in vitro* conditions [104]. The chemical modification of albumin with the introduction of more than one -NO group leads to the highest content of -NO (up to 10 mol -NO/mol albumin [120]). Nevertheless, it also deeply modifies the physico-chemistry of albumin [119], its interaction with cells [121] and finally may induce some immunological properties conferred by the nitrosated as well as the denitrosated macromolecule [122].

Dendrimers which are tree-like polymers were used as a strategy to increase the loading of -NO onto a macromolecule. Thus, generation-4 polyamidoamine dendrimers were modified with RSNO, synthesized and characterised [123,124]. Sixty four units of either SNAP or NACNO were grafted onto the dendrimer skeleton. The *in vitro* half-lives in presence of copper (0.2 mM) of the as-synthesized polymers were evaluated at 2.3 min and 106 min for the derivatives of SNAP and NACNO in phosphate buffer, respectively [123]. Using the same concentrations, the dendrimer derivatives of SNAP showed a more pronounced efficiency to inhibit platelet aggregation compared to the unmodified RSNO. As a result, the authors concluded that these dendrimers appeared as a relevant strategy in ischemia-reperfusion injury.

A polypeptide/polymeric mixed macroassembly was also designed in order to control \*NO release. Either GSNO or SNOPC was covalently linked to a polymer (poly(vinyl methyl ether-co-maleic anhydride)) and then interpolymer complexes were created with a poly(vinyl pyrrolidone) thanks to hydrogen bonds between both polymers [125]. As concerns GSNO, a 50 % grafting yield was

reached. Moreover, a controlled release of \*NO was effective until day 10 under *in vitro* conditions for both RSNO. The complexes were applied to wound healing with interesting positive results.

Thus, the macromolecular structures cited here improved the loading of -NO and some of them induced a sustained release.

#### Innovative Drug Delivery Systems Applied to S-nitrosothiols

Various concepts were designed in order to enhance the RSNO stability towards the environment and also to ensure a sustained release of the drug. Studies describing RSNO delivery systems are summarised in (Table 2) and they are based on approaches related to particles, matrix or films or both.

S-nitrosothiol delivery systems manage to protect the molecule and to control the release of \*NO. A complete proof-of-concept with an increase of the vascular flow was provided [133]. \*NO delivery systems (including RSNO delivery systems) have already been extensively reviewed [92,134,135]. Nevertheless, some remarks have to be taken into consideration for further developments:

- The safety and biocompatibility of the formulations have to be fully demonstrated. This includes:
  - the stability of the drug delivery system tested in physiological conditions (temperature, ionic strength, pH) in order not to release some impurities;
  - a total absence of toxicity: since most of the delivery systems are characterised by a release half-life in the range of hours even days to develop a chronic treatment (for example 7 days of release half-life in *in vitro* conditions *i.e.* phosphate buffer [136]);
  - no activation of the immune system with respect of antigen presenting cell phenotype after administration of the formulations, not to induce an inflammatory phenomenon [137].
- Concerning the particle design with a vascular target aim, following points have to be considered:

**Table 2. S-nitrosothiol Delivery Systems Formulated as Particles, Matrix or Film, or Both**

Drug delivery system	S-nitrosothiol	Physicochemical characterisation	Main conclusions	References
<b>Particle-based systems</b>				
Particles prepared by ionic gelation with alginate/chitosan	GSNO	Diameter > 300 nm	Decrease of GSNO decomposition rate when entrapped into NP especially in the first hours.	[126]
Liposomes	NACNO associated with a photosensitizer	Liposomes (made of dipalmitoyl-phosphatidylcholine) filtered through a 0.45 µm membrane	Photodynamic therapy is possible using such particles.	[127]
Mercaptosilane-based silica	Nitrosation of the mercapto-moieties after NP preparation	Diameters tunable from 240 to 720 nm -SH content from 0.5 to 20 % wt/wt and 55 to 100 % nitrosation efficiency	*NO release from the NP exceeded 48 h.	[128]
<b>Particles entrapped into matrices</b>				
S-nitrosothiol-derivatized fumed silica polymer filler particles	CysNO, SNAP, NACNO	Diameters from 7 to 10 nm Total -NO loading from 21 to 138 nmol/mg NP	SNAP derived NP showed the highest -NO loading. Polymeric films containing the NP were prepared and released *NO upon photoexcitation	[129]
Liposomes entrapped into a porous silica matrix	SNAP	Liposomes (made of dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine, cholesterol and dihexadecyl hydrogen sulphate) diameters of 150 nm Loading equivalent to 35 nM into the final material	Release of *NO is controlled by photoexcitation with a rate comparable to a biological active one.	[130]
<b>Matrix and films</b>				
Polyethylene glycol matrix	NACNO	-	Stability enhanced into the PEG matrix. Storage possible for 10 weeks at -20°C	[131]
Polymeric films	GSNO	20.4 wt % into a film made of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone	Release of *NO and GSNO from the films with a half-life of 35.5 min.	[132]
Polymeric films	GSNO	5 to 30 % of GSNO with a loading efficiency of 30 to 70 %	Increase of vaginal blood flow during 210 min with the loaded films compared to 20 min for unformulated GSNO	[133]



- to improve the blood circulation half-life, addition of PEG onto the particle to ensure its stealthness from the mononuclear phagocytic system may be required [138];
- the size of particle is one major point since particles with a diameter/dimension in the range 100 to 200 nm were shown to be able to accumulate into the inner layers of the arteries [139].

Development of a drug delivery system dedicated to the transport and protection of a \*NO donor is one way to avoid the interaction with degrading factors such as proteins. It was already mentioned that an increase of Trx concentration in the blood can be associated to diseases linked with oxidative stress such as cardiovascular pathologies. In these cases, in which a \*NO donor can be a relevant therapeutic strategy, a particulate system that on the one hand limits Trx \*NO release and on the other hand allows a controlled delivery at the targeted site should be interesting. Moreover, it is noteworthy that drug delivery systems can be internalized by cells. Regarding particles, two major kinds of cells have to be distinguished: antigen presenting cells which are professional phagocytes (since they are the first line of defence and have to screen the entire organism to fight the non-self) and the others for which the phagocytic activity is not the main one. Three main pathways of internalisation are nowadays well described: phagocytosis, endocytosis (including clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis, clathrin and caveolae independent endocytosis and macropinocytosis) [140] and the fusion with cell membrane. The last one is observed in the case of some liposomes or some vesicles [141], and it allows the release of the particle content directly into the cytosol, whereas the other processes may confine the particle inside an organelle (for example endolysosomes). Therefore, using the appropriate drug delivery system, the interaction with proteins can be limited (for example circulating Trx and membrane PDI) to deliver \*NO and/or to nitrosate protein inside the cell. In summary, the assembly of a stable RSNO and a carrier appears the best way to deliver \*NO under a controlled pathway.

#### GENERAL CONCLUSION

The present review points out the emerging role of RSNO as a new therapeutic class fighting vascular dysfunctions and permitting to overcome drawbacks of actual \*NO donors. This is demonstrated by:

- the actual intense investigation on RSNO interaction with proteins leading to *S*-nitrosation, a translational pathway of main importance in cell signalling leading to physiological action such as vasorelaxation,
- and also by many clinical trials based on administration of GSNO, a physiological RSNO.

As GSNO bioavailability has to be improved, it is necessary to define which parameters should be taken in consideration in order to increase the half-life of new designed RSNO. Structural properties of the molecular skeleton bearing the pharmacophore group SNO as well as the molecule lipophilicity appear interesting to improve their stability and to facilitate their (nano)formulation, respectively, even if no exact relationship between these physico-chemical properties and *in vivo* efficiency has been established at this time. Another real perspective in RSNO design is also to consider their interaction with enzymatically active proteins such as PDI/Trx presently reviewed.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Université de Lorraine (UHP\_2010\_BMS\_EA3452\_0047 and UHP\_2011\_EA3452\_BMS\_0062),

Région Lorraine, and the National Agency for Research (France) (NANOSNO, 2010) for their financial support. They are also grateful to Pr J.-F. Collet (de Duve Institute, Université Catholique de Louvain; Guest Professor at Université de Lorraine) for helpful discussion and advices on the present manuscript.

#### ABBREVIATIONS

AlbNO	=	<i>S</i> -nitrosoalbumin
ASK1	=	Apoptosis-regulating kinase-1
CapNO	=	<i>S</i> -nitrosocaptopril
cGMP	=	Cyclic guanosine monophosphate
Cys	=	Cysteine
CysGlyNO	=	<i>S</i> -nitrosocysteinylglycine
CysNO	=	<i>S</i> -nitrosocysteine
EC	=	Endothelial cells
ER	=	Endoplasmic reticulum
GAPDH	=	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
sGC	=	Soluble guanylate cyclase
GGT	=	$\gamma$ -glutamyltranspeptidase
GluCysNO	=	<i>S</i> -nitroso- $\gamma$ -glutamylcysteine
GSH	=	Reduced glutathione
GSNO	=	<i>S</i> -nitrosoglutathione
GTN	=	Glyceryl trinitrate
HcysNO	=	<i>S</i> -nitrosohomocysteine
JNK	=	Jun N-terminal kinase
Lys	=	Lysine
MAPK	=	Mitogen-activated protein kinase
NP	=	Nanoparticles
NACNO	=	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acetylcysteine
NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NOS	=	Nitric oxide synthases
eNOS	=	Endothelial nitric oxide synthase
iNOS	=	Inducible nitric oxide synthase
nNOS	=	Neuronal nitric oxide synthase
NP	=	Nanoparticles
PDI	=	Protein disulfide isomerase
PEG	=	Polyethyleneglycol
Pro	=	Proline
RIG200	=	<i>N</i> -( <i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acetylpenicillamine)-2-amino-2-deoxy-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranose
RSH	=	Thiol
RSNO	=	<i>S</i> -nitrosothiol
SIN-1	=	Linsidomine
SNAP	=	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acetylpenicillamine
SNHP	=	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -heptanoyl- <i>D,L</i> -penicillamine
SNOPC <sub>2</sub>	=	<i>S</i> -nitrosophytochelatin-2
SNOPC <sub>4</sub>	=	<i>S</i> -nitrosophytochelatin-4
SNOPC <sub>6</sub>	=	<i>S</i> -nitrosophytochelatin-6
SNP	=	Sodium nitroprusside
SNPP	=	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -propanoyl- <i>D,L</i> -penicillamine
SNVP	=	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -valeryl- <i>D,L</i> -penicillamine
TNF $\alpha$	=	Tumor necrosis factor alpha
Trp	=	Tryptophan

Trx	=	Thioredoxin
oTrx	=	Oxidized thioredoxin
rTrx	=	Reduced thioredoxin

## REFERENCES

- Janero DR, Bryan NS, Saijo F, Dhawan V, Schwalb DJ, Warren MC, Feelisch M. Differential nitrosylation of blood and tissue constituents during glyceryl trinitrate biotransformation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:16958-16963.
- Gaucher C, Devaux C, Boura C, Lacolley P, Stoltz JF, Menu P. *In vitro* impact of physiological shear stress on endothelial cells gene expression profile. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007; 37: 99-107.
- Gaucher-Di Stasio C, Paternotte E, Prin-Mathieu C, *et al*. The importance of the effect of shear stress on endothelial cells in determining the performance of hemoglobin based oxygen carriers. *Biomaterials* 2009; 30: 445-51.
- Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res* 2002; 90: 21-8.
- 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 USA*. 1992; 89:7674-7677.
- Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9: 160-8.
- Gaston B, Reilly J, Drazen J M., *et al*. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10957-61.
- Jourd'heuil D, Hallén K, Feelisch M, Grisham MB. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 409-17.
- Romero JM, Bizzozero OA. Intracellular glutathione mediates the denitrosylation of protein nitrosothiols in the rat spinal cord. *J Neurosci Res* 2009; 87: 701-9.
- Shah CM, Bell SE, Locke IC, Chowdrey HS, Gordge MP. Interactions between cell surface protein disulphide isomerase and S-nitrosoglutathione during nitric oxide delivery. *Nitric Oxide* 2007; 16: 135-42.
- Hogg N. The kinetics of S-transnitrosation--a reversible second-order reaction. *Anal Biochem* 1999; 272: 257-62.
- Ishima Y, Akaie T, Kragh-Hansen U, *et al*. S-nitrosylated human serum albumin-mediated cytoprotective activity is enhanced by fatty acid binding. *J Biol Chem* 2008; 283: 34966-75.
- Zhang Y, Hogg N. Formation and stability of S-nitrosothiols in RAW 264.7 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L467-74.
- Roy B, du Moulimet d'Hardemare A, Fontecave M. New thionitrites: synthesis, stability, and nitric oxide generation. *J Org Chem* 1994; 59: 7019-26.
- Al Sa'doni HH, Ferro A. S-nitrosothiols as nitric oxide-donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications. *Curr Med Chem* 2004; 11: 2679-90.
- Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154: 236-44.
- Butler AR, Williams DLH. The physiological role of nitric oxide. *Chem Soc Rev* 1993; 22: 233-41.
- Armelle DR, Stamler JS. NO<sup>+</sup>, NO, and NO<sup>-</sup> donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318: 279-85.
- Marozkina NV, Gaston B. S-Nitrosylation signalling regulates cellular protein interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820:722-9.
- Wang K, Wen Z, Zhang W, Xian M, Cheng JP, Wang PG. Equilibrium and kinetics studies of transnitrosation between S-nitrosothiols and thiols. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 433-6.
- Sevier CS, Kaiser CA. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 836-47.
- Collet JF, Messens J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13: 1205-16.
- Sengupta R, Ryter SW, Zuckerbraun BS, Tzeng E, Billiar TR, Stoyanovsky DA. Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. *Biochemistry* 2007; 46: 8472-83.
- Benhar M, Thompson JW, Moseley MA, Stamler JS. Identification of S-nitrosylated targets of thioredoxin using a quantitative proteomic approach. *Biochemistry* 2010; 49: 6963-9.
- Wu C, Parrott AM, Liu T, *et al*. Distinction of thioredoxin transnitrosylation and denitrosylation target proteins by the ICAT quantitative approach. *J Proteomics* 2011; 74: 2498-509.
- Miranda-Vizcete A, Gustafsson JA, Spyrou G. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a human thioredoxin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 284-8.
- 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: 15815-23.
- Sengupta R, Billiar TR, Kagan VE, Stoyanovsky DA. Nitric oxide and thioredoxin type 1 modulate the activity of caspase 8 in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1127-30.
- Hara T, Kondo N, Nakamura H, *et al*. Cell-surface thioredoxin-1: possible involvement in thiol-mediated leukocyte-endothelial cell interaction through lipid rafts. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1427-37.
- 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: 19180-85.
- Nikitovic D, Holmgren A, Spyrou G. Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242: 109-12.
- Haendeler J, Haendeler J, Hoffmann J, *et al*. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nature Cell Biol* 2002; 4: 743-49.
- Ravi K, Brennan LA, Levic S, Ross PA, Black SM. S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2619-24.
- Erwin PA, Mitchell DA, Sartoretto J, Marletta MA, Michel T. Subcellular targeting and differential S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2006; 281: 151-7.
- Sumbayev VV. S-nitrosylation of thioredoxin mediates activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Arch Biochem Biophys* 2003; 415: 133-6.
- Tao L, Gao E, Bryan N.S, *et al*. Cardioprotective effects of thioredoxin in myocardial ischemia and reperfusion: role of S-nitrosation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 11471-6.
- Mitchell DA, Marletta MA. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nat Chem Biol* 2005; 1: 154-8.
- Weichsel A, Brailey JL, Montfort WR. Buried S-nitrosocysteine revealed in crystal structures of human thioredoxin. *Biochemistry* 2007; 46: 1219-27.
- Weichsel A, Kem M, Montfort WR. Crystal structure of human thioredoxin revealing an unraveled helix and exposed S-nitrosation site. *Protein Sci* 2010; 19: 1801-6.
- Hashemy SI, Holmgren A. Regulation of the catalytic activity and structure of human thioredoxin 1 via oxidation and S-nitrosylation of cysteine residues. *J Biol Chem* 2008; 283: 21890-8.
- Bao R, Zhang Y, Zhou CZ, Chen Y. Structural and mechanistic analyses of yeast mitochondrial thioredoxin Trx3 reveal putative function of its additional cysteine residues. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794: 716-21.
- Mitchell DA, Morton SU, Fernhoff NB, Marletta MA. Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 11609-14.
- Wang Y, Liu T, Wu C, Li H. A strategy for direct identification of protein S-nitrosylation sites by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008; 19: 1353-60.
- Wu C, Liu T, Chen W, *et al*. Redox regulatory mechanism of transnitrosylation by thioredoxin. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 2262-75.
- Barglow KT, Knutson CG, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Marletta MA. Site-specific and redox-controlled S-nitrosation of thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: E600-6.
- 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: 628-35.

- [47] Ellgaard L, Ruddock LW. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 2005; 6:28-32.
- [48] 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: 478-88.
- [49] Zai A, Rudd MA, Scribner AW, Loscalzo J. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J Clin Invest* 1999; 103: 393-9.
- [50] Xiao F, Gordge MP. Cell surface thiol isomerases may explain the platelet-selective action of S-nitrosoglutathione. *Nitric Oxide* 2011; 25: 303-8.
- [51] Jiang XM, Fitzgerald M, Grant CM, Hogg PJ. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 1999; 274: 2416-23.
- [52] Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9539-44.
- [53] 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: 14503-11.
- [54] Sliskovic I, Raturi A, Mutus B. Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 2005; 280: 8733-41.
- [55] Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 193-7.
- [56] Leclerc PC, Lanctot PM, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R, Guillemette G. S-nitrosylation of cysteine 289 of the ATI receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 306-13.
- [57] Selvakumar B, Haganir RL, Snyder SH. S-nitrosylation of stargazin regulates surface expression of AMPA-glutamate neurotransmitter receptors. *Proc Natl Acad Sci SA* 2009; 106: 16440-5.
- [58] Rahman MA, Senga T, Ito S, Hyodo T, Hasegawa H, Hamaguchi M. S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion. *J Biol Chem* 2010; 285: 3806-14.
- [59] Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 150-66.
- [60] Greco TM, Hodara R, Parastatidis I, *et al.* Identification of S-nitrosylation motifs by site-specific mapping of the S-nitrosocysteine proteome in human vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 7420-5.
- [61] Marino SM, Gladyshev VN. Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation. *J Mol Biol* 2010; 395: 844-59.
- [62] Sun J, Xin C, Eu JP, Stamler JS, Meissner G. Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 11158-62.
- [63] Rafikova O, Rafikov R, Nudler E. Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:5913-18.
- [64] Kondo N, Ishii Y, Kwon YW, *et al.* Redox-sensing release of human thioredoxin from T lymphocytes with negative feedback loops. *J Immunol* 2004; 172: 442-8.
- [65] Ebrahimi T, Touyz RM. Thioredoxin in vascular biology: role in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1127-36.
- [66] Nakamura H, Hoshino Y, Okuyama H, Matsuo Y, Yodoi J. Thioredoxin I delivery as new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61:303-9.
- [67] Ahsan K, Nakamura H, Yodoi J. *Methods in Redox Signalling*. Mary Ann Libart, Inc. 2010.
- [68] Yamawaki H, Haendeler J, Berk BC. Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ Res* 2003; 93: 1029-33.
- [69] Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 1103-8.
- [70] Jacob C, Winyard PG. *Redox signalling and regulation in biology and medicine*. Wiley-Vch, 2009, pp 481.
- [71] Sehba FA, Friedrich V Jr, Makonnen G, Bederson JB. Acute cerebral vascular injury after subarachnoid hemorrhage and its prevention by administration of a nitric oxide donor. *J Neurosurg* 2007; 106: 321-9.
- [72] Khan M, Im YB, 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.
- [73] Khan M, Sekhon B, Giri S, *et al.* S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25:177-92.
- [74] Kuo YR, Wang FS, Jeng SF, Lutz BS, Huang HC, Yang KD. Nitrosoglutathione improves blood perfusion and flap survival by suppressing iNOS but protecting eNOS expression in the flap vessels after ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 2004; 135:437-46.
- [75] Kashiba M, Kasahara E, Chien KC, Inoue M. Fates and vascular action of S-nitrosoglutathione and related compounds in the circulation. *Arch Biochem Biophys* 1999; 363:213-8.
- [76] Bramanti E, Angeli V, Franzini M, Vecoli C, Baldassini R, Paolicchi A, Barsacchi R, Pompella A. Exogenous vs. endogenous gamma-glutamyltransferase activity: Implications for the specific determination of S-nitrosoglutathione in biological samples. *Arch Biochem Biophys* 2009; 487:146-52.
- [77] Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1499-503.
- [78] Kaposzta Z, Baskerville PA, Madge D, Fraser S, Martin JF, Markus HS. L-arginine and S-nitrosoglutathione reduce embolization in humans. *Circulation* 2001; 103: 2371-5.
- [79] Kaposzta Z, Clifton A, Molloy J, Martin JF, Markus HS. S-nitrosoglutathione reduces asymptomatic embolization after carotid angioplasty. *Circulation* 2002; 106:3057-62.
- [80] Kaposzta Z, Martin JF, Markus HS. Switching off embolization from symptomatic carotid plaque using S-nitrosoglutathione. *Circulation* 2002b; 105: 1480-84.
- [81] Molloy J, Martin JF, Baskerville PA, Fraser SC, Markus HS. S-nitrosoglutathione reduces the rate of embolization in humans. *Circulation* 1998; 98: 1372-5.
- [82] Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ, *et al.* Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet* 1994; 344: 1458-60.
- [83] Ramsay B, Radomski M, De Belder A, Martin JF, Lopez-Jaramillo P. Systemic effects of S-nitroso-glutathione in the human following intravenous infusion. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1995; 40: 101-2.
- [84] Salas E, Langford EJ, Marrinan MT, Martin JF, Moncada S, De Belder AJ. S-nitrosoglutathione inhibits platelet activation and deposition in coronary artery saphenous vein grafts *in vitro* and *in vivo*. *Heart* 1998; 80: 146-50.
- [85] 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: 14-9.
- [86] 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: 470-7.
- [87] Simões MM, De Oliveira MG. Poly(vinyl alcohol) films for topical delivery of S-nitrosoglutathione: effect of freezing-thawing on the diffusion properties. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2010; 93: 416-24.
- [88] Seabra AB, Fitzpatrick A, Paul J, De Oliveira MG, Weller R. Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. *Br. J. Dermatol.* 2004; 151: 977-83.
- [89] Souto S, Palma P, Fregonesi A, Palma T, Reis LO. Vascular modifications of the clitoris induced by topic nitric oxide donor gel—preliminary study. *J. Sex. Med.* 2011; 8: 484-8.
- [90] Rassaf T, Poll LW, Brouzos P, *et al.* Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur Heart J* 2006; 27: 1699-705.
- [91] Snyder AH, McPherson ME, Hunt JE, Johnson M, Stamler JS, Gaston B. Acute effects of aerosolized S-nitrosoglutathione in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 922-6.
- [92] Sortino S. Light-controlled nitric oxide delivering molecular assemblies. *Chem Soc Rev* 2010; 39: 2903-13.
- [93] Loscalzo J, Smick D, Andon N, Cooke J. S-Nitrosocaptopril. I. Molecular characterization and effects on the vasculature and on platelets. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 249: 726-9.

- [94] Megson IL, Webb DJ. Nitric oxide donor drugs: current status and future trends. *Exp Op Invest Drugs*, 2002; 11: 587-601.
- [95] Miller MR, Roseberry MJ, Mazzei FA, Butler AR, Webb DJ, Megson IL. Novel S-nitrosothiols do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryltrinitrate-tolerant rat femoral arteries. *Eur J Pharmacol* 2000; 408: 335-343.
- [96] Giustarini D, Milzani A, Aldini G, Carini M, Rossi R, Dalle-Donne I. S-nitrosation versus S-glutathionylation of protein sulfhydryl groups by S-nitrosoglutathione. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 930-9.
- [97] Wang PG, Xian M, Tang X, *et al*. Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. *Chem Rev* 2002;102: 1091-134.
- [98] Heikal L, Martin GP, Dailey LA. Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of analogues: S-nitrosophytochelates. *Nitric Oxide* 2009; 20: 157-65.
- [99] Timerghazin QK, Peslherbe GH, English AM. Resonance description of S-nitrosothiols: insights into reactivity. *Org Lett* 2001; 9: 3049-52.
- [100] Giustarini D, Tsikas D, Rossi R. Study of the effect of thiol on the vasodilatory potency of S-nitrosothiol by using a modified aortic ring assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 256: 95-102.
- [101] Resende AC, Tabellion A, Nadaud S, *et al*. Incubation of rat aortic rings produces a specific reduction in agonist-evoked contraction: effect of age of donor. *Life Sci* 2004; 76: 9-20.
- [102] Browner NC, Dey NB, Bloch KD, Lincoln TM. Regulation of cGMP-dependent protein kinase expression by soluble guanylyl cyclase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2004 ; 279: 46631-6.
- [103] Noack E, Feelisch M. Molecular aspects underlying the vasodilator action of molsidomine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 14: S1-5.
- [104] Megson IL, Greig IR, Gray GA, Webb DJ, Butler AR. Prolonged effect of a novel S-nitrosated glycol-amino acid in endothelium-denuded rat femoral arteries: potential as a slow release nitric oxide donor drug. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1617-24.
- [105] Feelisch M, Kotsonis P, Siebe J, Clement B, Schmidt HHHW. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Molec Pharmacol* 1999; 56: 243-53.
- [106] Megson IL, Morton S, Greig, *et al*. N-substituted analogues of S-nitroso-N-acetylpenicillamine: chemical stability and prolonged nitric oxide mediated vasodilatation in isolated rat femoral arteries. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 639-48.
- [107] Tsikas D, Sandmann J, Rossa S, Gutzki FM, Frölich JC. Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography-mass spectrometry 1. Preparation, purification, isolation, characterisation and metabolism of S-[<sup>15</sup>N]nitrosoalbumin in human blood *in vitro*. *J Chromatogr B* 1999; 726: 1-2.
- [108] Tseng CML, Tabrizi-Fard MA, Fung HL. Differential sensitivity among nitric oxide donors toward ODQ-mediated inhibition of vascular relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 737-42.
- [109] Ceron IB, Cremonez DC, Bendhack LM, Tedesco AC. The relaxation induced by S-nitroso-glutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine in rat aorta is not related to nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 686-94.
- [110] Tullett JM, Rees DD, Shuker DEG, Gescher A. Lack of stability between the observed stability and pharmacological properties of S-nitroso derivatives of glutathione and cysteine-related peptides *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 1239-47.
- [111] 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: 152-9.
- [112] Heikal L, Aaronson PI, Ferro A, Nandi M, Martin GP, Dailey LA. S-Nitrosophytochelates: Investigation of the Bioactivity of an Oligopeptide Nitric Oxide Delivery System. *Biomacromolecules* 2011; 12: 2103-13.
- [113] Balazy M, Kaminski PM, Mao K, Tan J, Wolin MS. S-nitrosoglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide. *J Biol Chem* 1998; 273: 32009-15.
- [114] Tsikas D, Denker K, Frölich JC. Artifact-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* 2011; 915: 107-16.
- [115] Moran EE, Timerghazin QK, Kwong E, English AM. Kinetics and mechanism of S-Nitrosothiol acid-catalyzed hydrolysis: sulphur activation promotes facile NO' release. *J Phys Chem B* 2011; 115: 3112-26.
- [116] Al Sa'doni HH, Khan IY, Poston L, Fisher I, Ferro A. A novel family of S-nitrosothiols: chemical synthesis and biological actions. *Nitric Oxide* 2000; 4: 550-60.
- [117] Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 305-21.
- [118] Li J, Mannargudi B, Uetrecht JP. Covalent binding to macrophages: Implication for penicillamine-induced autoimmunity. *Chem Res Toxicol* 2009; 22: 1277-84.
- [119] Katsumi H, Nishikawa M, Ma SF, Yamashita F, Hashida M. Physicochemical, tissue distribution, and vasodilatation characteristics of nitrosated serum albumin: delivery of nitric oxide *in vivo*. *J Pharm Sci* 2004; 93: 2343-52.
- [120] Katsumi H, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. Development of polyethylene glycol-conjugated poly-S-nitrosated serum albumin, a novel S-nitrosothiol for prolonged delivery of nitric oxide in the blood circulation *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 1117-24.
- [121] Ishima Y, Yoshida F, Kragh-Hansen U, *et al*. Cellular uptake mechanisms and responses to NO transferred from mono- and poly-S-nitrosated human serum albumin. *Free Radic Res* 2011; 45: 1196-206.
- [122] Tsikas D. Comment on the article "Nitrosylated human serum albumin (SNO-HSA) induces apoptosis in tumor cells" (*Nitric Oxide* 22 (2010) 259-265). *Nitric Oxide* 2011; 24: 123-4.
- [123] Stasko NA, Fischer TH, Schoenfisch MH. S-nitrosothiol-modified dendrimers as nitric oxide delivery vehicles. *Biomacromolecules* 2008; 9: 834-41.
- [124] Johnson TA, Stasko NA, Matthews JL, *et al*. Reduced ischemia/reperfusion injury via glutathione-initiated nitric oxide-releasing dendrimers. *Nitric Oxide* 2010; 22: 30-6.
- [125] Li Y, Lee PJ. Controlled nitric oxide delivery platform based on S-nitrosothiol conjugated interpolymer complexes for diabetic wound healing. *Molec Pharm* 2010; 7: 254-66.
- [126] Marcato PD, Adami LF, Melo PS, de Paula LB, Durán N, Seabra AB. Glutathione and S-nitrosoglutathione in alginate/chitosan nanoparticles: cytotoxicity. *J Phys Conf Ser* 2011; 304: 012045.
- [127] Rotta JCG, Lunardi CN, Tedesco AC. Nitric oxide release from the S-nitrosothiol zinc phthalocyanine complex by flash photolysis. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 587-94.
- [128] Riccio DA, Nugent JL, Schoenfisch MH. Stöber synthesis of nitric oxide-releasing S-nitrosothiol-modified silica particles. *Chem Mater* 2011; 23: 1727-35.
- [129] Frost MC, Meyerhoff ME. Synthesis, characterisation, and controlled nitric oxide release from S-nitrosothiol-derivatized fumed silica polymer filler particles. *J Biomed Mater Res Part A* 2005; 72A: 409-19.
- [130] Koehler JJ, Zhao J, Jedlicka SS, Porterfield DM, Rickus JL. Compartmentalized nanocomposite for dynamic nitric oxide release. *J Phys Chem B* 2008; 112: 15086-93.
- [131] Shishido SM, de Oliveira MG. Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine. *Photochem Photobiol* 2000; 71: 273-80.
- [132] Barozzi Seabra A, Da Rocha LL, Eberlin MN, de Oliveira MG. Solid films of blended poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl pyrrolidone) for topical S-nitrosoglutathione and nitric oxide release. *J Pharm Sci* 2005; 95: 994-1003.
- [133] Yoo JW, Acharya G, Lee CH. *In vivo* evaluation of vaginal films for mucosal delivery of nitric oxide. *Biomaterials* 2009; 30: 3978-85.
- [134] Friedman A, Friedman J. New biomaterials for the sustained release of nitric oxide: past, present and future. *Exp Op Drug Del* 2009; 6: 1-10.
- [135] Seabra AB, Durán N. Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications. *J Mater Chem* 2010; 20: 1624-37.
- [136] Jo YS, van der Vlies AJ, Gantz J, *et al*. Micelles for delivery of nitric oxide. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 14413-8.
- [137] Boudier A, Aubert-Pouëssel A, Louis-Plence P, *et al*. The control of dendritic cell maturation by pH-sensitive polyion complex micelles. *Biomaterials* 2009; 30: 233-41.

- [138] Owens III DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 2006; 307: 93-102.
- [139] Westedt U, Barbu-Tudoran L, Schaper AK, Kalinowski M, Alfke H, Kissel T. Deposition of nanoparticles in the arterial vessel by porous balloon catheters: localization by confocal laser scanning microscopy and transmission electron microscopy. *AAPS Pharm Sci* 2002; 4: 1-6.
- [140] Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2873-96.
- [141] Boudier A, Castagnos P, Soussan *et al.* Polyvalent cationic vesicles: Exploring the drug delivery mechanism. *Int J Pharm* 2011; 403: 230-6.

---

Received: July 25, 2012

Accepted: August 15, 2012

## **Chapitre II.**

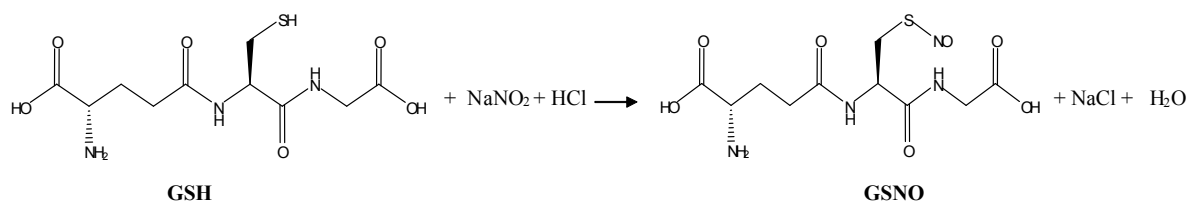
# **Les *S*-nitrosothiols : synthèse, caractérisation physico-chimique et étude de stabilité**

## 1. Introduction

Le premier objectif de notre travail de thèse concerne la synthèse de RSNO suivie de leur caractérisation physico-chimique (identification, pureté et stabilité) avant l'étude de leurs propriétés biologiques. Deux RSNO ont été synthétisés :

- le GSNO, RSNO endogène de référence usuel dans la littérature et utile à nos études en relation avec la GGT,
- la BUC(NO)<sub>2</sub>, nouveau dinitrosothiol non encore décrit dans la littérature, comportant dans sa structure deux mononitrosothiols connus, la NACNO et le SNAP.

En ce qui concerne le GSNO, nous avons réalisé une synthèse selon la réaction de nitrosation du groupement thiol du GSH par les ions nitrite en milieu acide suivie ou non d'une précipitation à l'acétone et d'une purification (Hart, 1985). Le schéma réactionnel est le suivant :



Nous avons caractérisé de façon approfondie la structure des deux produits obtenus (tableau 4) puis nous avons déterminé leur pureté, identifié et quantifié les impuretés présentes.

La structure globale de la molécule obtenue a été vérifiée par :

- SM : la masse moléculaire attendue du GSNO égale à 336,07 u.m.a. est bien retrouvée, par ailleurs la fragmentation concourt également à identifier le produit,
- résonance magnétique nucléaire du proton (<sup>1</sup>H RMN) : le signal du groupement méthylène en α du groupement thiol a été déplacé de 3,01-2,90 à 4,09 ppm,
- analyse élémentaire : les pourcentages en masse expérimentaux de chaque élément de la molécule GSNO ont été identiques aux pourcentages théoriques.

La présence de la liaison S-NO a été déterminée par :

- spectrométrie UV-visible : absence de maxima d'absorbance à des longueurs d'onde supérieures à 220 nm pour le GSH et apparition de deux maxima à 334 et 545 nm pour GSNO,

- dichroïsme circulaire : deux maxima apparaissent dans la molécule de GSNO, à 334 nm avec une ellipticité molaire  $[\theta] = - 935^{\circ} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$  et à 545 nm avec  $[\theta] = 915^{\circ} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ,
- spectroscopie IR à transformation de Fourier (FT-IR) : disparition de la vibration d'étirement du thiol (à  $2525 \text{ cm}^{-1}$ ) et apparition d'une vibration azote-oxygène (à  $1520 \text{ cm}^{-1}$ ),
- analyse thermique par DSC : le premier événement endothermique est simultanément à une perte de masse de 8,85 % (valeur correspond à la masse molaire de \*NO ( $m/z = 30 \text{ u.m.a.}$ )). Le point de fusion de GSH, correspondant au deuxième événement endothermique de l'analyse de GSNO, a été retrouvé à sa valeur attendue soit  $195^{\circ}\text{C}$ .

Toutes ces analyses indiquent la présence de GSNO comme principal produit résultant de la synthèse.

Le contrôle qualité de la molécule obtenue a été réalisé à la fois par mesure de l'absorbance molaire à 334 nm, par la méthode spectrophotométrique de Saville-Griess et par une technique originale de chromatographie liquide haute performance (CLHP) inspirée de celle décrite par Tsikas *et al.* (2001). Cette dernière repose sur un processus séparatif de partage à polarité de phases inversée avec appariement d'ions en mode isocratique, dont l'intérêt est de permettre l'analyse simultanée d'impuretés inorganiques très polaires (ions chlorure, nitrite, et nitrate) et des différentes formes du glutathion : GSH, GSSG et GSNO.

Nous avons montré que le GSNO obtenu de façon synthétique et isolé par précipitation, possède une pureté élevée, mesurée selon deux méthodes différentes et calculée à l'aide d'un produit commercial de référence (moyenne de deux lots de synthèse de GSNO) :

- CLHP = 102,5 % (m/m)
- méthode de Saville-Griess = 97,0 % (m/m).

La teneur en impuretés présentes dans le produit synthétisé a été déterminée par CLHP : 0,21 % (m/m) d'ions nitrite, 0,18 % (m/m) d'ions nitrate, et 1,83 % (m/m) de GSSG (valeurs moyennes obtenues sur deux lots de synthèse de GSNO) ; les valeurs sont comparables à celles trouvées pour le produit commercial de référence et s'avèrent en adéquation avec les exigences habituellement édictées par les autorités de santé pour les médicaments. Par ailleurs, nous avons montré que la teneur en impuretés était légèrement supérieure (*3 fois plus*) dans le milieu réactionnel de synthèse du GSNO utilisé pour les expériences biologiques sans isolement de celui-ci (pratique la plus répandue dans la littérature). Cependant, la teneur en GSNO dans le milieu réactionnel de synthèse déterminée par CLHP et par la méthode de



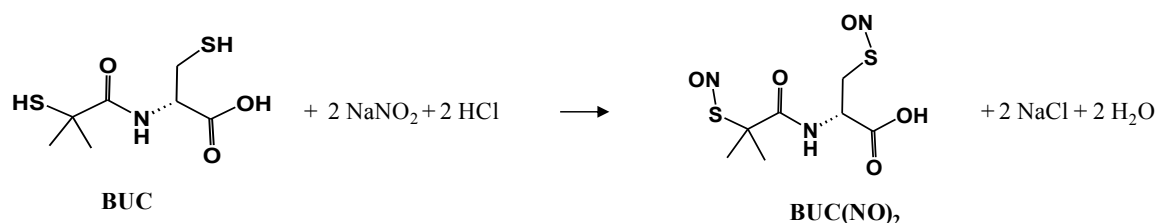
Saville-Griess, et calculée par rapport au produit commercial de référence (moyenne de deux lots de synthèse de GSNO) est élevée : 105,1 % et 97,5 %, respectivement.

L'étude physico-chimique complète du GSNO a atteint son objectif en autorisant pour les expérimentations biochimiques et pharmacologiques indifféremment l'emploi de la forme solide du GSNO ou du milieu réactionnel de synthèse. Cette démarche a été étendue aux autres RSNO synthétisés dans le laboratoire et plus particulièrement à la BUC(NO)<sub>2</sub>.

**Tableau 4 :** Propriétés physicochimiques des *S*-nitrosothiols (GSNO et BUC(NO)<sub>2</sub>).

Méthode	GSH	GSNO	BUC(SH) <sub>2</sub>	BUC(NO) <sub>2</sub>
UV-visible	Pas de maxima > à 220 nm	Maxima à 334 et 545 nm	Pas de maxima > à 220 nm	Maxima à 334 et 545 nm
IR	Vibration d'étirement du thiol à 2525 cm <sup>-1</sup>	Disparition de la vibration d'étirement du thiol à 2525 cm <sup>-1</sup> Apparition d'une vibration azote-oxygène à 1520 cm <sup>-1</sup>	Vibration d'étirement du thiol à 846 cm <sup>-1</sup>	Disparition de la vibration d'étirement du thiol à 846 cm <sup>-1</sup>
<sup>1</sup> H NMR δ (ppm)	4,59 (t, J = 5,8 Hz, 1H) 4,00 (s, 2H) 3,85 (t, J = 7,4 Hz, 1H) 3,01-2,90 (m, 2H) 2,58-2,57 (td, 3J = 7,4 Hz, 4J = 3,0 Hz, 2H) 2,19 (td, 2J = 3J = 7,4 Hz, 2H)	4,69 (dd, 3J = 3J' = 4,6 Hz, 1H) 4,09 (dd, 2J = 14,8 Hz, 3J = 4,6 Hz, 2H) 3,97 (s, 2H) 3,82 (t, J = 6,3 Hz, 1H) 2,47 (t, J = 7,4 Hz, 2H) 2,23-2,10 (m, 2H)	4,60 (dd, J = 5,1, 1,8 Hz, 1H, CH) 3,17-2,99 (m, 2H, CH <sub>2</sub> SH) 1,64 (s, 6H, 2 CH <sub>3</sub> )	8,45 (brd, 1H, NH) 4,40 (brdd, 1H, CH) 3,97-3,82 (m, 2H, CH <sub>2</sub> SNO) 1,57 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ) 1,05 (s, 3H, CH <sub>3</sub> )
DSC	Point de fusion à 194,9 °C	Décomposition à 150,3 °C avec une perte de masse de 8,85 %, ce qui correspond à m/z = 30 Point de fusion à 195,3 °C	Point de fusion à 139,8 °C	Point de fusion à 197,9 °C
Analyse élémentaire	Masse expérimentale (%) ( <i>masse théoriques (%)</i> ) Carbone 38,9 % (39,1 %) Hydrogène 5,6 % (5,6 %) Azote 13,6 % (13,7 %) Soufre 9,6 % (9,5 %) Oxygène 31,7 % (31,2 %)	Masse expérimentale (%) et ( <i>masse théorique (%)</i> ) 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 %)	<i>Non déterminé</i>	<i>Non déterminé</i>

La synthèse de la BUC(NO)<sub>2</sub> a été réalisée selon la même approche que celle décrite pour le GSNO en mélangeant en milieu acide le dithiol, BUC(SH)<sub>2</sub>, avec deux fois plus de nitrite de sodium pour s'adapter à la stœchiométrie du produit attendu. Le schéma réactionnel est le suivant :



Cette approche a également été décrite pour la nitrosation de polythiols comme les phytochélatines (Heikal *et al.*, 2011). Les phytochélatines sont des oligopeptides dérivés du GSH (formule générale : (γ-Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly, n = 2 à 6).

Cependant, contrairement au GSNO, il ne nous a pas été possible de précipiter le produit par ajout d'acétone et un autre protocole de synthèse décrit dans la littérature pour le SNAP a été appliqué (Al-Sa'doni *et al.*, 2000) ; il consiste à utiliser un mélange eau-méthanol (32 : 68 v/v) comme milieu réactionnel. Un produit « huileux » a été obtenu avec une pureté de 87 % (vérifié par la méthode Saville-Griess et calculée à l'aide d'un produit commercial de référence (SNAP)). Différents solvants organiques (acétone, acétonitrile, dichlorométhane, éther diéthylique ou éther de pétrole) ont été ajoutés au milieu réactionnel dans un rapport 1 : 1 (v/v) avec la phase aqueuse ; mais aucun d'entre eux n'a conduit à la précipitation du produit. Seul l'éther diéthylique a permis l'extraction efficace du produit ; l'évaporation à sec de la phase étherée résultant de l'extraction n'a pas abouti à l'obtention d'un produit pur (une décomposition importante (de 70 %) survient au cours du processus).

De ce fait, l'utilisation de la BUC(NO)<sub>2</sub> sans isolement du milieu réactionnel reste le seul outil disponible pour étudier les effets pharmacologiques de ce nouveau composé. La plupart des effets des RSNO décrits dans la littérature, notamment ceux de la NACNO, du GSNO, de la CysNO ou encore des S-nitrosophytochélatines (SNOPC) ont été évalués en utilisant les produits correspondants non isolés (Megson *et al.*, 1997, Kashiba *et al.*, 1999, Alencar *et al.*, 2003, Heikal *et al.*, 2010).

Par conséquent, la caractérisation physico-chimique de BUC(NO)<sub>2</sub> a essentiellement été réalisée sur le produit en solution (UV-visible, CLHP-SM, CLHP, Saville-Griess) et quelques analyses ont été effectuées sur le produit huileux (analyse thermique, <sup>1</sup>H RMN, FT-IR).

Dans un premier temps, la structure globale et la présence de la liaison S-NO de la molécule synthétique a été vérifiée par :

- CHLP-SM : la masse moléculaire attendue du BUC(NO)<sub>2</sub> égale à 281,00 u.m.a est donc bien retrouvée
- <sup>1</sup>H RMN: le signal du groupement méthylène localisé en position α du groupement thiol du noyau cystéine a été décalé de 3,17 - 2,99 à 3,97 - 3,82 ppm après nitrosation. De plus, le signal des deux groupements méthyle liés à l'atome de carbone en position α du groupement thiol du noyau pénicillamine a été déplacé de 1,64 à 1,57 et 1,05 ppm après nitrosation.
- spectrométrie UV-visible : absence de maxima d'absorbance à des longueurs d'onde supérieures à 220 nm pour la BUC(SH)<sub>2</sub> et apparition de deux maxima à 334 et 545 nm pour BUC(NO)<sub>2</sub>,
- spectroscopie FT-IR : disparition complète de la vibration d'étirement du thiol (à 846 cm<sup>-1</sup>),
- analyse thermique (DSC) : une différence a été observée entre le point de fusion de BUC(SH)<sub>2</sub> (139,8 °C) et de BUC(NO)<sub>2</sub> (197,9 °C).

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec le GSNO et nous ont permis de confirmer la présence de BUC(NO)<sub>2</sub> comme principal produit obtenu après synthèse.

Ensuite, nous avons développé une méthode de CLHP originale adaptée à la BUC(NO)<sub>2</sub> qui nous a permis de montrer que la synthèse du BUC(NO)<sub>2</sub> permettait d'obtenir un produit de grande pureté (99,9 ± 0,1 %) ; n = 4) comparable aux résultats obtenus par la méthode de Saville-Griess (99,5 ± 0,1 %). Le taux global d'impuretés est inférieur à 0,6 % (soit 0,30 ± 0,05, 0,19 ± 0,01 et 0,10 ± 0,02 % pour les ions nitrite, la BUC(SH)<sub>2</sub> et la BUC(NO)<sub>1</sub> respectivement). La solution de ce composé est donc utilisable pour les études biologiques ultérieures.

Par ailleurs, nous avons étudié la stabilité de GSNO, de BUC(NO)<sub>2</sub> et des deux mononitrosothiols, SNAP et NACNO, en suivant la variation de la concentration en RSNO par spectrophotométrie à 334 nm.

Le GSNO sous forme solide se conserve sous atmosphère inerte (argon ou azote), à - 20 °C et à l'abri de la lumière pendant 6 mois. Les études menées sur les RSNO en solution dans

différentes conditions (pH, température, lumière, présence d'ions métalliques, oxygénation) ont permis de :

1) vérifier que les RSNO étaient stables dans les conditions d'études *ex vivo* des propriétés vasorelaxantes (solution de Krebs, pH 7,4, oxygénation de 95 % O<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub> et 37 °C) pendant les 15 premières min d'incubation ; délai nécessaire pour atteindre le plateau de l'effet vasorelaxant des RSNO étudiés.

2) déterminer les conditions idéales de conservation entre synthèse et utilisation :

- les solutions de GSNO et de NACNO sont conservées à pH 7,4 à 4 °C et à l'abri de la lumière pendant 4 j au maximum,

- les solutions de BUC(NO)<sub>2</sub> et de SNAP sont conservées à pH < 0,5 à 4 °C et à l'abri de la lumière pendant 4 j au maximum.

Durant les travaux réalisés, le contrôle de la solution mère de RSNO a été effectué avant chaque utilisation par spectrophotométrie à 334 nm (mesure de l'absorbance molaire) et une concentration de RSNO supérieure à 95 % de la valeur nominale a été fixée pour un usage expérimental.

L'utilisation de réactifs de qualité analytique et d'eau ultra-pure (> 18,2 MΩ.cm) est nécessaire pour assurer la meilleure stabilité des RSNO en solution, démontrant ainsi qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser de chélateurs de métaux comme l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) pour conserver les solutions de RSNO. Ceci est d'importance car la présence d'agents chélateurs peut avoir des effets parasites dans les études pharmacologiques (par exemple au niveau des flux calciques nécessaires au maintien du tonus vasculaire des artères).

De plus, nous avons examiné les produits de dégradation. D'une part, l'analyse CLHP d'une solution de GSNO stockée pendant 10 j à pH 7,4 et à 4 °C révèle la présence d'ions nitrite et de GSSG en quantités importantes (2,9 % et 25,2 %), respectivement) et une faible quantité de nitrate (0,4 %). D'autre part, l'analyse CLHP d'une solution de BUC(NO)<sub>2</sub> stockée pendant 4 j à pH 7,4, 4 °C révèle la présence d'ions nitrite en quantités importantes (30,5 ± 5,5 %). Des tentatives ont été réalisées afin d'identifier le produit d'oxydation (BUC(ox)) en faisant réagir le dithiol BUC(SH)<sub>2</sub> avec différents agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'iode (I<sub>2</sub>) (en se basant sur le protocole de Woycechowsky *et al.*, 1999), et le ferricyanure (en se basant sur le protocole de Cleland, 1964) mais les profils chromatographiques n'ont pas permis d'identifier un produit principal issu de ces réactions.

Enfin, nous avons déterminé *in vitro* l'effet de la complexation des RSNO avec des cyclodextrines (CD), molécules-cages d'origine naturelle connues pour leurs propriétés complexantes vis-à-vis de molécules variées, sur :

- (i) la stabilité des RSNO (GSNO, NACNO, SNAP et BUC(NO)<sub>2</sub>),
- (ii) la protection des RSNO contre la dégradation enzymatique par la GGT et la Trx-1.

Nous avons montré que l'emploi de CD entraîne :

- uniquement une amélioration de la stabilité de la BUC(NO)<sub>2</sub>,
- une protection du GSNO contre la dégradation par la GGT,
- une absence de protection de tous les RSNO contre la dégradation catalysée par la Trx-1.

La majorité de ces travaux a fait l'objet de deux publications : la première publiée dans *Curr. Pharm. Anal.*, la seconde actuellement soumise à *Eur. J. Pharmacol.*

**2. Article 2.** M. Parent, F. Dahboul, R. Schneider, I. Clarot, P. Maincent, P. Leroy, A. Boudier. A Complete Physicochemical Identity Card of S-nitrosoglutathione. *Curr. Pharm. Anal.* 2013;9(1)31-42.

**3. Article 3.** F. Dahboul, C. Perrin-Sarrado, A. Boudier, I. Lartaud, R. Schneider, P. Leroy. *S,S'*-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other *S*-nitrosothiols, soumise à *Eur. J. Pharmacol.*

Les résultats concernant (i) les études de stabilité de SNAP et de NACNO *in vitro*, (ii) les études de stabilité des RSNO dans le modèle d'étude *ex vivo* et (iii) l'impact de l'emploi d'une CD sur la stabilité et la dégradation enzymatique des RSNO sont présentés après ces articles sous forme de résultats complémentaires.

## A Complete Physicochemical Identity Card of *S*-nitrosogluthathione

Marianne Parent<sup>a</sup>, Fatima Dahboul<sup>a</sup>, Raphaël Schneider<sup>b</sup>, Igor Clarot<sup>c</sup>, Philippe Maincent<sup>a</sup>, Pierre Leroy<sup>a</sup> and Ariane Boudier<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Université de Lorraine, CITHÉFOR, EA 3452, Faculty of Pharmacy, BP 80403, F-54001 Nancy Cedex, France;

<sup>b</sup>Université de Lorraine, CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR 3349, BP 20451, F-54001 Nancy Cedex, France; <sup>c</sup>Université de Lorraine, CNRS, Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, UMR 7565, Faculty of Pharmacy, BP 80403, F-54001 Nancy Cedex, France

**Abstract:** *S*-nitrosogluthathione (GSNO) is one of low molecular weight *S*-nitrosothiols occurring in humans. Nowadays, it is widely used as a nitric oxide donor for *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experiments related to the investigation of its pathophysiological role as well as in clinical trials, aimed at its potential therapeutic use. Despite numerous reports on this physiological molecule, its quality control does not match the criteria required by competent pharmaceutical authorities. Hereby, an extensive physicochemical characterisation of synthesised and purified GSNO is provided for the first time. Indeed, structural identification including spectrometric, thermal and elemental analyses was consistent with the 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 coming from synthesis process and/or storage conditions, at 220 nm. The as-synthesised product showed a content of 102.5 %, with respect to a commercially available standard. The identified impurities, *i.e.* chloride, nitrite, nitrate, reduced glutathione and glutathione disulfide, were also quantified basing on pharmaceutical requirements. Main products released during various storage conditions (pH, temperature, dioxygen, ...) were disulfide glutathione and nitrite ion. Recommendations are given for the safe use of GSNO in biological and pharmacological experiments.

**Keywords:** Content, ICH guidelines, Impurities, Ion-pairing reversed phase HPLC, *S*-nitrosogluthathione synthesis, Stability, structural identification.

### 1. INTRODUCTION

Nitric oxide (nitrogen monoxide, NO radical, NO<sup>•</sup>) plays an important role in many physiological processes, especially in vascular tone homeostasis. The decrease of its concentration can lead to numerous pathophysiological events; therefore, it is of considerable importance to find and characterise suitable NO<sup>•</sup>-donors that may be used for the treatment of arterial hypertension and cardio-vascular failure.

Nitric oxide exhibits a very short half-life, *i.e.* less than 1 s in blood [1] and must be delivered as a pro-drug such as an organic nitrate (*e.g.* nitroglycerin, isosorbide dinitrate or mononitrate) [2]. These common drugs are known to provide a fast NO<sup>•</sup> release concomitant with the induction of oxidative stress and frequently tolerance. To limit such side effects, research is now focused on innovative NO<sup>•</sup> donors such as *S*-nitrosothiols (RSNO), especially *S*-nitrosogluthathione, GSNO, (*N*-(*N*-*L*- $\gamma$ -glutamyl-*S*-nitroso-*L*-cysteinyl)-glycine, CAS number: [57564-91-7]) (Fig. 1). This latter is an endogenous NO<sup>•</sup> donor, which is found in human plasma at concentration values in the range of 90 to 270 nM [3]. Due to its safety (since NO<sup>•</sup> release is

accompanied by glutathione production), GSNO appears as a leader molecule both as a tool to investigate biochemical or pharmacological mechanisms of NO<sup>•</sup> action and for therapeutic applications. As a result, GSNO is actually the most studied RSNO, using various *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models [4-7]. GSNO has also been included in clinical trials (Table 1). In these studies, GSNO was administered *via* parenteral or topical routes. Up to now, only dozens of people were included into each study and a good tolerance of the drug was observed (few side effects on few patients were reported like headache, palpitation and hypotension). All these arguments lead to the conclusion that GSNO may be a drug in the making, or at least a tool to investigate physiological mechanisms.

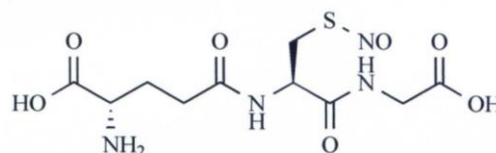


Fig. (1). *S*-nitrosogluthathione structure.

This molecule is commercially available but it can also be easily synthesised according to three main synthetic pathways. The most commonly one uses nitrite ion and reduced glutathione (GSH) in a 1:1 stoichiometric ratio under acidic conditions as follows (1):

\*Address correspondence to this author at the Université de Lorraine, CITHÉFOR, EA 3452, Faculty of Pharmacy, BP 80403, F-54001 Nancy Cedex, France; Tel: +33 3 83 68 23 76; Fax: +33 3 83 68 23 01; E-mail: [ariane.boudier@univ-lorraine.fr](mailto:ariane.boudier@univ-lorraine.fr)



Nonetheless, GSNO can also be produced using either a gas mix containing NO• (2) [22, 23]:



or by a transnitrosation reaction with another RSNO (3) [24, 25]:



The yield of the synthesis is commonly provided by a unique physico-chemical test based on the molar absorbance at 334 nm of  $922 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , first defined by Hart [26].

S-nitrosoglutathione preparations used in *in vitro/ex vivo* and *in vivo* studies are very frequently not completely characterised and mostly as a non-purified product in home-made solutions without any accurately defined content. Moreover, a discrepancy is noted in the literature concerning the possible pharmacological effect of GSNO impurities, *i.e.* nitrite and nitrate ions [16, 27, 28]. Besides, some clinical studies (Table 1) are now clarifying the role of NO• in

parallel with RSNOs in the vascular and cardiac systems. Therefore, as GSNO is on the way to go from bench to bedside, there is a great need to introduce a complete physicochemical control of the drug, based on classical pharmaceutical requirements (International Conference on Harmonisation (ICH) [29, 30] and European Pharmacopoeia 7<sup>th</sup> ed [31]) to ensure the quality of the administered product.

In this study, an extensive physicochemical characterisation of GSNO is described including structural evaluation, content and both identification and quantification of impurities which may result from synthesis and storage conditions [32]. To the best of our knowledge, it is the first time when numerous experimental data have been gathered, permitting a full characterisation of GSNO for further biological and pharmacological studies, focusing on its content and impurities. Special emphasis is also paid to the impurities fingerprint in order to highlight how important is the purification step. Finally, this work brings some key recommendations to use GSNO as a well-characterised and safe product.

**Table 1. Summary of clinical trials described in the literature with administration of GSNO. (In all studies, a research ethics committee was consulted.)**

Targeted application	Administered dosage	Number of included Patients	References
<b>Reduction of cerebral embolisation</b>			
Carotid angioplasty, carotid endarterectomy and/or recurrent stroke and/or systemic embolisation	Intravenous infusion at a rate of 2.2 nmol/kg.min and if tolerated, increased to a rate of 4.4 nmol/kg.min after 10 min for 90 min	24	[8]
		28	[9]
		20	[10]
		16	[11]
<b>Inhibition of platelet activation and/or vasodilatation and/or effect on blood flow</b>			
Percutaneous transluminal coronary angioplasty	Intracoronary infusion of 40 nmol/min 10 min before surgery and continued for 10 min after	13	[12]
Anti-thrombotic effect	Intravenous infusion 50 µg/min and increased by 50 µg/min every 5 min to a maximum of 250 µg/min after 20 min. The dosage was maintained for 10 min	10	[13]
Coronary artery saphenous vein grafts	Intravenous infusion of 40 nmol/min	24	[14]
Severe preeclampsia	60 - 90 min intravenous infusion of 50 – 250 µg/min	10	[15]
Systemic vasodilatation	1 – 4 µmol <i>via</i> intravenous route	31	[16]
Dermal wound dressings and local vasodilatation in ischemic tissues	22.5 - 42 µmol loaded into polymer films applied on skin	7	[17]
Wound healing	0.3 mol GSNO/g polymer hydrogel applied on skin	8	[18]
Female sexual disorder	100 µM of a GSNO gel applied on clitoris	40	[19]
<b>Replenishment of GSNO pool</b>			
Effect on left ventricular function	Intravenous bolus of 0.5 µmol	12	[20]
Effect on cystic fibrosis	0.05 ml/kg of a 10 mM GSNO solution aerosolised	20	[21]



## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Chemicals and standards

All solvents and chemicals were of high purity (> 99%). Tetrabutylammonium hydrogen sulfate (TBAHS) and GSNO (when used as a standard) were obtained from Sigma-Aldrich (France). Ultrapure deionised water (> 18.2 M $\Omega$  cm) was used to prepare all solutions.

### 2.2. *S*-nitrosoglutathione synthesis

*S*-nitrosoglutathione was obtained by synthetic pathways either without further purification (i) or as purified product (ii), as follows:

(i) A 10 mM NaNO<sub>2</sub> solution was prepared in deoxygenated water using ultrasound bath. 62 mg of GSH were weighed in a 10.0 mL volumetric flask and dissolved in *ca.* 7 mL of deoxygenated 0.5 M HCl. Then, 1.0 mL of the NaNO<sub>2</sub> solution was added, and the volume was filled up to 10.0 mL with 0.5 M HCl. The resulting mixture was kept in the dark at 4 °C for 1 h. Afterwards, 0.45 mL of a 40 % (w/v) NaOH solution was added and the volume was finally completed to 20.0 mL with phosphate buffer (pH 7.4; 0.5 M). The solution was stored at 4 °C for a maximum period of 7 days.

(ii) 3.1 mmol (960 mg) of GSH were dissolved in 5.0 mL of 0.626 M HCl cooled to 4°C under nitrogen flow. Then 3.1 mmol (215 mg) of NaNO<sub>2</sub> were added and the mixture was stirred at 4 °C for 40 min in the dark. 5 mL of cold acetone were then added to precipitate GSNO. The purification step was performed by filtration of the pink product which was then successively washed with acetone-water (80/20, v/v) (10 mL), acetone (2 × 10 mL), and diethylether (3 × 10 mL). The product was then dried under vacuum (15 mm Hg) for 30 min at room temperature (22 ± 2 °C) and immediately stored at -20 °C under inert argon atmosphere. The nitrosation yield was about 70 %.

### 2.3. Griess and Saville-Griess methods

Nitrite and GSNO concentrations were determined by using Griess and Saville-Griess methods, respectively [1]. Briefly, samples were diluted with acetoacetic buffer (pH 2.5; 1.75 M) in order to obtain a final volume of 1 mL. Calibration curves were performed in the range 1 - 10  $\mu$ M, using NaNO<sub>2</sub> and GSNO as standards for Griess and for Saville-Griess assays, respectively. What concerns the Griess assay, 200  $\mu$ L of sulfanilamide solution (0.6 % (w/v) prepared in 0.4 M HCl) were added to the previously diluted sample. After a 3 min incubation in the dark at room temperature (22 ± 2 °C), 50  $\mu$ L of *N*-1-(naphthyl)ethylenediamine solution (0.6 % (w/v) prepared in 0.4 M HCl) were added. After a 5 min incubation, absorbance was read at 540 nm. The same operating conditions were used for the Saville-Griess method, but the sulfanilamide solution was added with HgCl<sub>2</sub> (0.2 % w/v).

### 2.4. Instrumentation

UV-visible spectra were carried out on a double-beam spectrophotometer (UV 1700 model, Shimadzu, France).

Circular dichroism spectrum (solution of GSNO at 10 mM in water) was recorded in a CD6 dichrograph equipped with a CDMax software (Jobin Yvon, Longjumeau, France). Specific optical rotations were determined in a PolAAR 20 polarimeter (Particular Sciences, Ireland). Angles of rotation  $\alpha$  of GSH (9.5 mM in water) and GSNO (9.5 mM, in 0.5 M phosphate buffer pH 7.4) were measured at 20 °C with a 1.9009 dm length polarimeter tube. Infrared analysis was realised on a Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) spectrophotometer (Vector 22 model, Bruker, Germany) equipped with an ATR system (MIRacle Single Reflection Horizontal ATR, Pike Technologies, France), mass spectrum by using electrospray ionisation (Waters Platform, Canada) and <sup>1</sup>H NMR spectra using D<sub>2</sub>O as solvent, on an Avance 300 spectrometer (Bruker, Germany). Multiplicities are reported as follows: s singlet, d doublet, t triplet, and m multiplet. Elemental analysis was performed on a Thermo Finnigan EA 1112 (Thermo Fisher Scientific, USA). Differential scanning calorimetry/thermogravimetry (DSC/TG) analyses coupled with mass spectrometer (MS) were conducted using a STA 409C equipment (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Germany). A Karl Fischer coulometer (756 KF coulometer Metrohm, France) was used for titration of water content in purified GSNO (25 mg). A Clark electrode equipped with the Atelier Scientific software (Jeulin, France), was used to evaluate the dioxygen content of solutions. The theoretical dipole moment of GSNO was calculated with the Chemdraw software (CambridgeSoft, Perkin-Elmer, USA) using the MOPAC application.

### 2.5. HPLC system and operating conditions

The HPLC system consisted of an isocratic pump (L-6000 model, Hitachi-Merck, Germany), an injection valve equipped with a 20- $\mu$ L loop (7725i model, Rheodyne, IDEX, USA), a column oven (Croco-Cil, Cluzeau, France), a UV detector (LKB Bromma, Sweden), and a data processing software (Azur<sup>®</sup>, Datalys, France). The columns (250 × 4 mm I.D) were prepacked with two different stationary phases (5- $\mu$ m particle size): LiChrospher<sup>®</sup> RP-18e (Merck, Germany) or Nucleosil<sup>®</sup> 100 C18 HD (Macherey Nagel, Germany). The mobile phase consisted of a mixture of methanol and phosphate buffer (10/90, v/v); the phosphate buffer was prepared as follows: 1 mM TBAHS and 0.1 mM EDTA were added to 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and the pH was adjusted to 6.8. Column temperature was 40 °C and flow rate was 0.8 mL/min (resulting back pressure was *ca.* 120 bars). UV detection was operated at either 220 or 334 nm.

GSNO solutions for HPLC analysis were prepared as follows: for the GSNO standard and the as-synthesised product, a 10 mM stock solution was obtained by dissolving the powder in phosphate buffer (pH 7.2; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.1 mM EDTA). For the non-purified GSNO, the solutions obtained after synthesis (*ca.* 10 mM) were considered as stock solutions. Dilutions were performed with mobile phase before injection into the HPLC system. All solutions were protected from light, stored at 4 °C and used within 12 h for the content assay and/or the determination of impurities profile.

## 2.6. Calculation of GSNO constants

The specific optical rotation, the solubility of GSNO as well as the HPLC parameters were calculated according to the European Pharmacopoeia [31]. The molar ellipticity  $[\theta]$  was calculated from delta absorbance ( $\Delta A$ ) given by the software with  $[\theta] = 3300 \frac{\Delta A}{lc}$  where  $c$  is the concentration of the solution (M) and  $l$  is the length the cuvette (cm);  $[\theta]$  is given in  $^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$ . The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were expressed according to the ICH [29] using the slope and intercept of the linear regression of each calibration curve.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The full characterisation including identification, determination of the exact content as well as the impurities fingerprint, is always a question that arises when pharmacological or clinical trials using a new product are performed. Therefore, the present study is presenting all these data for GSNO.

## 3.1. Properties of purified S-nitrosoglutathione

Isolated GSNO is a fine pink powder, sparingly soluble in water, practically insoluble in ethanol, acetone, diethylether and methylene chloride. The solubilities of GSNO in tested solvents are in accordance with its calculated dipole moment, *i.e.* 3.9 D.

## 3.2. Structural identification of purified S-nitrosoglutathione

The structural identification of purified GSNO and the characterisation of the sulphur-nitrogen bond were performed using classical physicochemical methods (Table 2 and (Fig. 2)). The molecular structure was fully assessed, first by using mass spectroscopy (MS). The protonated and deprotonated molecular ions of GSNO (calculated Mr = 336.3) were observed at either  $m/z = 337.0$  or  $334.9$ , using detection in positive and negative modes, respectively. Signals corresponding to GSNO adducts with  $\text{H}^+$  and  $\text{Na}^+$  and the pattern of molecule degradation appeared as previously described [33]. Secondly, both elemental analysis and  $^1\text{H}$  NMR spectrum were consistent with the expected structure (Table 2 and Fig. 2).

Table 2. Physicochemical properties of GSNO compared to GSH, using spectroscopic, thermal and elementary analyses

Method	GSNO	GSH
UV-visible	Maxima at 334 and 545 nm $\left(\frac{\epsilon_{334}}{\epsilon_{545}} = 61.3\right)$	No maximum at $\lambda > 220$ nm
Fourier-Transform InfraRed (FT-IR)	Disappearance of the thiol stretching vibration ( $2525\text{ cm}^{-1}$ ); N-O stretching vibration ( $1520\text{ cm}^{-1}$ )	Thiol stretching vibration ( $2525\text{ cm}^{-1}$ )
$^1\text{H}$ NMR	4.69 (dd, $^3J = ^3J' = 4.6\text{ Hz}$ , 1H) 4.09 (dd, $^2J = 14.8\text{ Hz}$ , $^3J = 4.6\text{ Hz}$ , 2H) 3.97 (s, 2H) 3.82 (t, $J = 6.3\text{ Hz}$ , 1H) 2.47 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$ , 2H) 2.23-2.10 (m, 2H)	4.59 (t, $J = 5.8\text{ Hz}$ , 1H) 4.00 (s, 2H) 3.85 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$ , 1H) 3.01-2.90 (m, 2H) 2.58 and 2.57 (td, $^3J = 7.4\text{ Hz}$ , $^4J = 3.0\text{ Hz}$ , 2H) 2.19 (td, $^2J = ^3J = 7.4\text{ Hz}$ , 2H)
Thermal analysis DSC/TG-MS (onset temperature)	Two endothermic events: decomposition at $150.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a loss of 8.85 % of initial mass corresponding to a fragment with a $m/z = 30$ melting point at $195.3\text{ }^{\circ}\text{C}$	One endothermic event: melting point at $194.9\text{ }^{\circ}\text{C}$
Elemental analysis	Analysis (mean of two independent batches of synthesis) (Theoretical percentages)	Analysis (mean of two independent batches) (Theoretical percentages)
Carbon	34.9 % (35.7 %)	38.9 % (39.1 %)
Hydrogen	4.8 % (4.8 %)	5.6 % (5.6 %)
Nitrogen	15.8 % (16.7 %)	13.6 % (13.7 %)
Sulfur	9.6 % (9.5 %)	10.0 % (10.4 %)
Oxygen	32.4 % (33.3 %)	31.7 % (31.2 %)

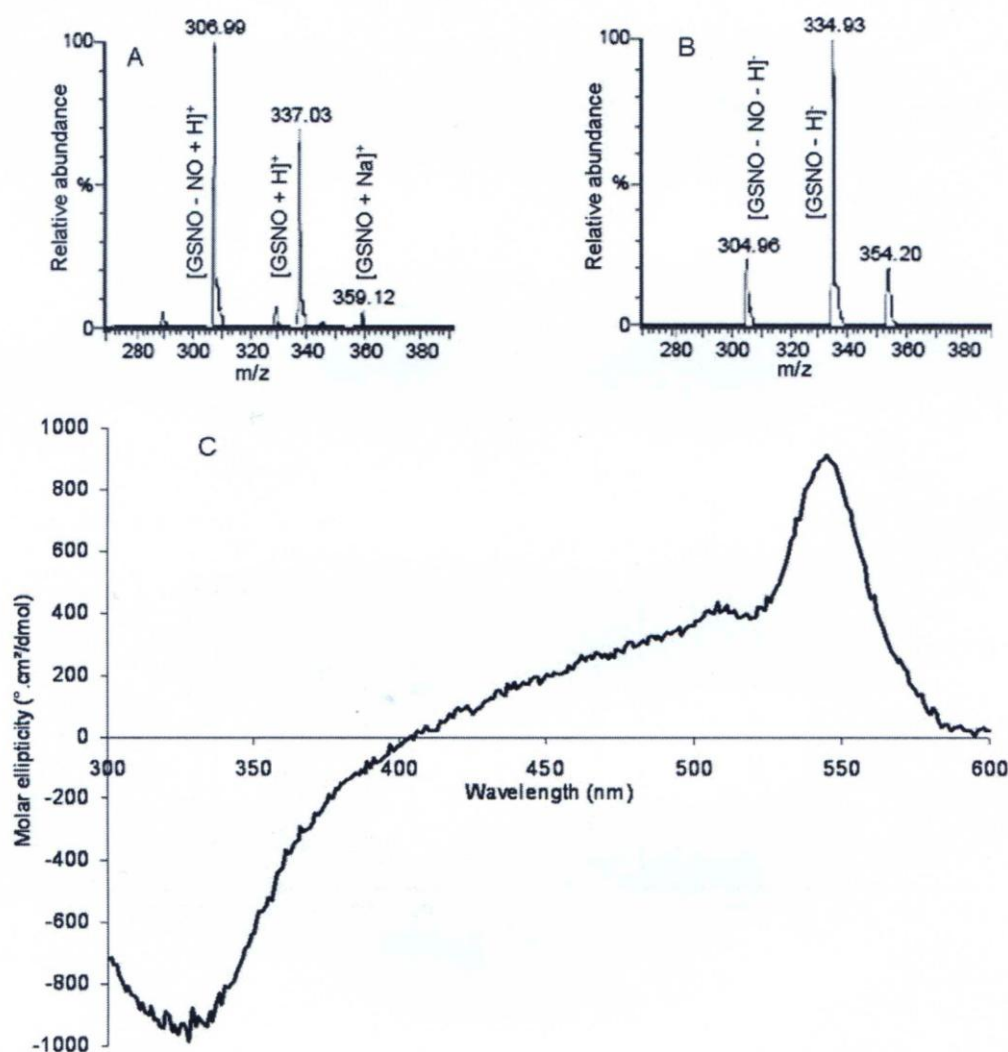


Fig. (2). Mass spectra using (A) positive and (B) negative ionisation modes and (C) circular dichroism spectra of the purified GSNO.

In the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, the methylene group linked to the thiol function was shifted from 3.01 - 2.90 ppm in GSH to 4.09 ppm after nitrosation. Then, the sulphur-nitrogen bond was considered by UV-visible, circular dichroism and FTIR spectroscopy, as well as thermal analysis. The *S*-nitroso-modification of glutathione was signed by maxima at 334 and 545 nm in the UV-visible spectrum due to  $\pi \rightarrow \pi^*$  and  $n_{\text{N}} \rightarrow \pi^*$  transitions, respectively [26]. The circular dichroism spectrum of the molecule (Fig. 2) was in accordance with such a modification since two maxima appeared: one negative at 334 nm with a molar ellipticity,  $[\theta] = -935 \text{ } ^\circ\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$  and one positive at 545 nm with  $[\theta] = 915 \text{ } ^\circ\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ . This latter result was in accordance with the optical rotation evaluated at  $63 \text{ } ^\circ\cdot\text{mL}\cdot\text{dm}^{-1}\cdot\text{q}^{-1}$  at 589.3 nm, suggesting again a molecule different than GSH ( $15 \text{ } ^\circ\cdot\text{mL}\cdot\text{dm}^{-1}\cdot\text{q}^{-1}$ ). FT-IR analysis showed on one hand the disappearance of the thiol stretching vibration (at  $2525 \text{ cm}^{-1}$ ) and on the other hand, the appearance of the nitrogen-oxygen vibration at  $1520 \text{ cm}^{-1}$ . Finally, thermal analyses were performed with DSC and TG coupled with MS. The results

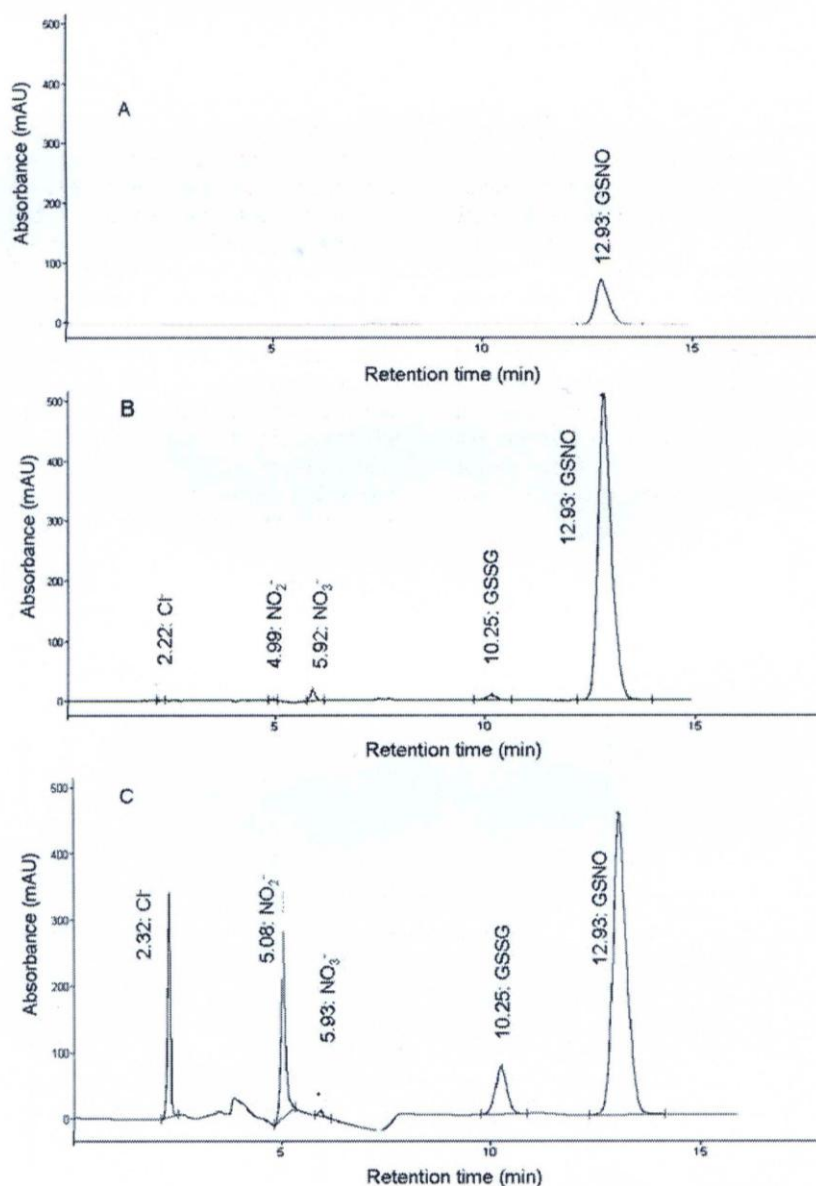
confirmed the grafting of one nitroso group onto GSH, since the first endothermic event at  $150.3 \text{ } ^\circ\text{C}$  was parallel with a mass loss of 8.85 %, corresponding to NO molar mass, *i.e.*  $m/z = 30$ . The melting point of GSH, corresponding to the second endothermic event in GSNO analysis, was recovered at *ca.*  $195 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Altogether, the different analyses were consistent with the structure of GSNO as the main product resulting from synthesis.

### 3.3. Development of the HPLC method and its suitability test

Liquid chromatographic methods devoted to RSNO have already been reported [3, 4, 6, 34, 35]. Most of them depend on the use of reversed-phase columns eluted with acidic, neutral or slightly alkaline mobile phases and they are mainly aimed at separating various RSNO, especially metabolites of GSNO [6]. An ion-pairing reversed phase HPLC (IP-RP-HPLC) system using a cationic detergent, *i.e.* TBAHS, has already been proposed [35]. In our hands, only this latter system permits to obtain baseline separation of

very polar impurities resulting from GSNO synthesis and degradation, especially inorganic species such as chloride, nitrite and nitrate ions. Indeed, as we were expecting to find these by-products, we made some trials with a commercially available ion chromatographic system but the highly alkaline mobile phase used with the anion column induces GSNO precipitation. Therefore, the method described by Tsikas *et al.* [35] was used with the following modifications: the use of methanol instead of acetonitrile and ten-times lower concentrations of TBAHS and EDTA; a slightly acidic mobile phase (pH value equal to 6.8) was retained in order to preserve integrity of the silica-based stationary phase and the analyte. Although the presently reported HPLC system needs a long equilibration period (about 3 h) to obtain stable and reproducible retention times (corresponding to the maximum

adsorption of TBA on the stationary phase), it seems to be a good compromise as a method to determine both GSNO content and its impurities profile at the same time (using a diode array detector for example). As a matter of fact, it is worthwhile to use a unique separative system from a practical and financial point-of-view to operate both content assay and impurities profile. Two different C18 columns were tested and they gave rise to very similar data concerning the chromatographic behaviour of considered analytes. Detection was operated at 334 nm to evaluate the product content, and at 220 nm to detect impurities. Indeed, the wavelength value of 334 nm corresponds to a specific absorption band exhibited by all RSNO due to the S-N bond (see 3.2). Typical chromatograms are shown in (Fig. 3).



**Fig. (3).** Typical chromatograms corresponding to either the as-synthesised and purified GSNO with detection wavelength at 334 nm (A), and 220 nm (B), or the extemporaneously obtained product without any purification (C) at 220 nm. Each product was injected at a concentration of 1 mM. Chromatograms were recorded using Nucleosil® 100 C18 HD (similar results were obtained on LiChrospher® RP-18e).

The suitability test was built on three main parameters which appear and play an important role in the method robustness: first, GSNO retention time and column efficiency expressed as number of theoretical plates (N) calculated for GSNO peak, second, resolution factor ( $R_s$ ) between the impurities characterised by the closest elution times, and third, the relative standard deviation (RSD) of GSNO peak area calculated with triplicate injection. It is well known that use of tensioactive agents as counter-ions in mobile phase leads to a loss of hydrophobic capping on the stationary phase resulting in a decrease of analytes retention. Despite using slightly acidic pH and ten times less counter-ion than Tsikas *et al.* [35], we observed this phenomenon relatively rapidly (over a 150-h period) when using the two different stationary phases, thus it becomes obvious that performances should be daily checked. The suitability test agreement needs: (i) a GSNO retention time higher than 9.5 min (retention factor, k, higher than 2.6) and N higher than 7000, (ii) resolution between peaks corresponding to nitrite and nitrate ions higher than 2.8 (injecting a solution of nitrite and nitrate ions at a concentration of 0.1 mM and operating detection at 220 nm), and (iii) a relative standard deviation (RSD) value for GSNO peak area (injecting GSNO at a concentration of 1 mM and operating detection at 334 nm) lower than 1.2 % (n = 3).

### 3.4. Content determination

This study proposed to assess GSNO content by using the HPLC method with UV detection at 334 nm. A calibration curve was performed using the standard (water content: 1.4 % (m/m) given by the supplier) and Saville-Griess method as a reference. On the one hand, the linearity of the HPLC method was checked in the range 0.50 - 5.00 mM, with corresponding equation of the regression line: A (peak area of GSNO, 334 nm) = 1 279 000 × [GSNO] (± 9 000) - 2.2 (± 18.7); coefficient of determination,  $r^2 = 0.999$  (6 points, n = 5). LOD and LOQ were calculated and the values found were 0.05 and 0.15 mM, respectively. Finally, repeatability, intermediate precision and accuracy of the HPLC method for GSNO measurement were evaluated. The values of RSD were equal to 1.8 % for repeatability (6 determinations at 100 % of the test concentration, *i.e.* 1 mM) and 2.6 % for intermediate precision (determined by 3 injections of the 100 % test solution over 2 days). Accuracy was evaluated at 100.34 ± 1.26 % (5 points, n = 5). On the other hand, the linearity of the colorimetric Saville-Griess method was tested in the range of 1.0 - 10.0 μM, with corresponding equation of the regression line:  $A_{540\text{ nm}} = 41400 \times [\text{GSNO}] (\pm 700) - 0.002 (\pm 0.002)$ ,  $r^2 = 0.998$  (6 points, n = 5). The values of LOD and LOQ were 0.2 and 0.5 μM, respectively.

The content of the isolated product evaluated by HPLC was equal to 102.5 % (mean of two synthesis batches of GSNO) as referred to the dry substance (water content: 1.5 %, m/m). Using Saville-Griess procedure, a content of 97.0 % was found. These results were in accordance with the usual requirements of health competent authorities.

### 3.5. Impurities profile

Using the HPLC method with detection at a low UV wavelength (220 nm), the qualitative and quantitative fingerprint of all GSNO impurities which could result from either synthesis or storage conditions was determined for the first time to the best of our knowledge. Indeed, the question of presence of potential impurities has arisen in the literature in order to prevent their possible influence on the biological or pharmacological results [16, 21, 27, 28, 36]. Based on the International Conference of Harmonisation guidelines for the registration of pharmaceuticals for human use [30] and on the hypothesis of a maximum daily dose of GSNO less than 2 g/day (which agrees with the first clinical studies, Table 1), the impurities were either reported or identified or qualified depending on the percentages found, *i.e.* 0.05, 0.10 and 0.15 %, respectively. Typical chromatograms corresponding to the profile of GSNO impurities are shown in (Fig. 3); the impurities were identified by adding a corresponding standard into a GSNO solution (Table 3). The results assessed the presence of chloride, nitrite, nitrate ions and glutathione disulfide (GSSG). These by-products were expected as they are brought by either the raw material of the synthesis or the possible degradation pattern of GSNO during the process [32, 37]. Finally, the residual level of the organic solvents used to isolate and purify GSNO (acetone and diethyl ether, which are class 3 residual solvents [31, 32]) was checked. In the specific case of diethyl ether, the solvent was mixed and shaken with the mobile phase until saturation before HPLC analysis. Relative retention time *vs.* GSNO was 0.56 for acetone and 1.93 for diethyl ether, and no interference with the other impurities was noted. In the purified batches, neither acetone nor diethyl ether were observed at a level higher than 0.15 %; this value was less than the authorised limit threshold (0.5 % [31]).

Quantification of impurities with abundance higher than 0.15 % was performed, which was the case of nitrite, nitrate ions and GSSG. Chloride was present in large quantities after synthesis but it was removed after isolation and purification of GSNO, leading to very low residual amount, lower than 0.15 %. Therefore, chloride was not quantified. Other impurities, *i.e.* nitrite, nitrate ions and GSSG, were quantified by HPLC using calibration curves and nitrite ion was additionally quantified using the colorimetric Griess method. Results are shown in Table 4. The nitrite ion content measured by Griess and HPLC method was as follows: 0.18 % (m/m) and 0.19 % (m/m), respectively, for the standard, 0.21 % (m/m) and 0.15 % (m/m), respectively, for the as-synthesised and purified GSNO. Besides, amounts of nitrate ion and GSSG were 0.69 % (m/m) and 2.36 % (m/m), respectively, for the standard and 0.18 % (m/m) and 1.83 % (m/m), respectively, for the as-synthesised and purified GSNO. The purification step of GSNO decreased the quantities of impurities found initially in the reaction medium by a factor of *ca.* 4 for nitrite ion and GSSG, and 1.6 for nitrate ion (giving for the unpurified product 0.57 % (m/m), 8.13 % (m/m) and 0.29 % (m/m), respectively). Since nitrite and nitrate ions can induce some vascular effects [16, 27, 28, 36], the importance of the purification step to avoid any pharmacological interference that may be generated by the impurities has to be highlighted.

**Table 3. Chromatographic parameters obtained for GSNO at 220 nm. Results (relative retention time (RRT), retention factor (k), resolution between vicinal peaks ( $R_s$ ) and percentage of area obtained by the sum of all peak areas) are the means of independent analyses of two different batches of GSNO.**

	RRT	k	$R_s$	Percentage of area	
				GSNO standard	Purified GSNO
Chloride	0.18	0	-	0.04	0.02
			17.09		
Nitrite	0.39	0.88	4.06	0.47	0.39
			6.03		
Nitrate	0.46	1.22	7.59	1.44	0.38
			5.23		
GSH	0.53	1.53	-	Not found	Not found
GSSG	0.79	2.82	-	0.69	0.56
GSNO	-	3.86	-	96.94	98.51

**Table 4. Calibration curves of nitrite and nitrate ions, and glutathione disulfide (GSSG), using HPLC and Griess method (nitrite ion). Data are expressed as mean  $\pm$  SD of five calibration curves.**

Impurity	Range ( $\mu$ M)	Slope	Intercept	$r^2$	LOD ( $\mu$ M)	LOQ ( $\mu$ M)
Nitrite (Griess)	1 to 10	39 000 $\pm$ 1 000	0.003 $\pm$ 0.002	0.9990	0.17	0.51
Nitrite (HPLC)	1 to 100	4 600 000 $\pm$ 200 000	-0.527 $\pm$ 1.277	0.9999	0.92	2.78
Nitrate (HPLC)	1 to 100	4 200 000 $\pm$ 350 000	-0.815 $\pm$ 3.460	0.9982	2.72	8.24
GSSG (HPLC)	1 to 100	4 300 000 $\pm$ 300 000	-0.875 $\pm$ 6.300	0.9997	4.84	14.5

### 3.6. Stability studies: determination of the optimal storage conditions

First, concerning GSNO storage as a solid, it should be stored under inert atmosphere (argon or nitrogen), at  $-20$  °C and in the dark. Under these conditions, GSNO integrity was preserved in our hands over a 6-months period.

Then, it is now well known that a common scheme related to new drug development includes the use of drastic operating conditions (strong acids and alkalis, intense heat and light exposure, ...) to form degradation products of the tested compound. In the case of GSNO, applying such conditions immediately induces full breakdown of this compound as a drug highly sensitive to environment. Indeed, the *in vitro* decomposition of RSNO has already been extensively studied (see for example [38, 39, 40]) and light, temperature, pH, metal ions were pointed out as the main parameters influencing their stability. However these studies were performed over a short term (48 h max., more often a

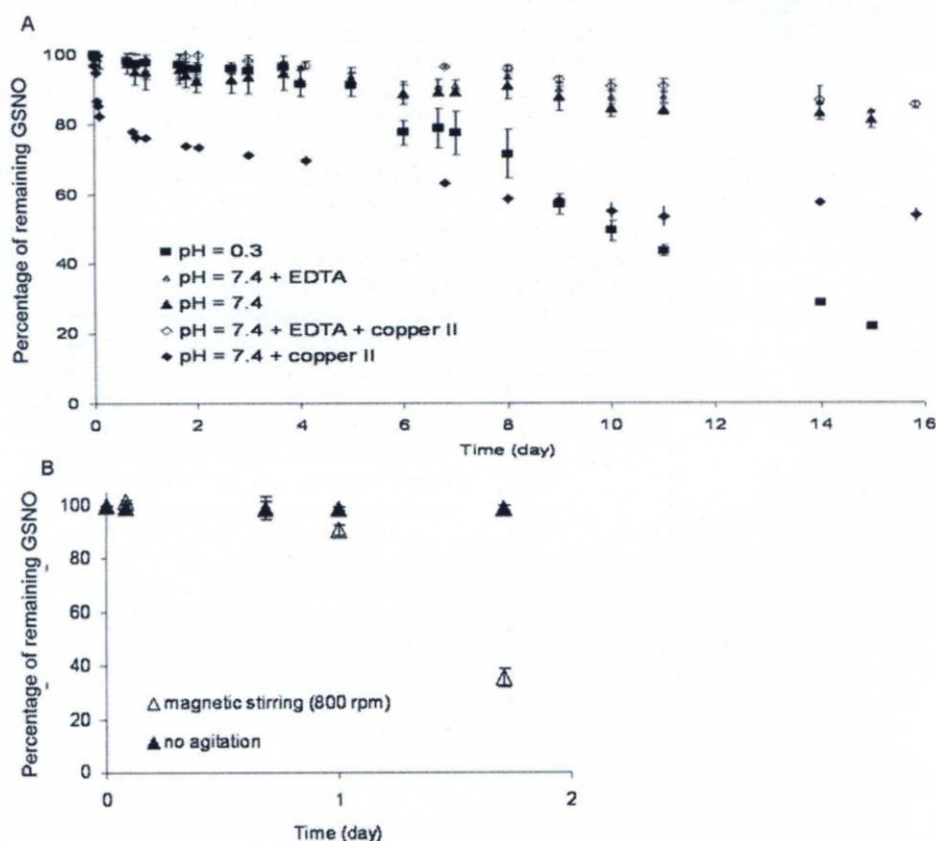
few hours) period of storage at room temperature. In order to determine the optimal storage conditions of GSNO, some additional investigations were presently made by studying similar parameters under longer storage periods (until 14 days at 4 °C) and considering other parameters, *i.e.* dioxygen tension and metal ions.

The stability of a 10 mM GSNO solution in phosphate buffer (pH 7.4; 0.5 M) in the dark, was monitored as a function of time by varying temperature. At room temperature ( $25 \pm 2$  °C), a loss of  $43.1 \pm 4.8$  % ( $n = 3$ ) was observed at day 7. This result is coherent with previous work [41]. The storage at  $-80$  °C showed no degradation ( $0.6 \pm 1.2$  %,  $n = 3$ ) as compared to  $-20$  °C ( $45.4 \pm 3.2$  % loss of GSNO,  $n = 3$ ) after one week. At 4 °C, the degradation rate of GSNO was very low (less than 4 % loss after 4 days) and reached *ca.* 10 % after 7 days ( $n = 3$ ). As a result, a temperature of 4 °C was chosen for the storage of GSNO solutions and for further experiments.

Additionally, the effect of pH was evaluated (Fig. 4A): synthesis was performed and  $10^{-2}$  M solution of GSNO was stored at 4 °C either maintaining at pH = 0.3 or after shifting the pH to the physiological value. The results showed that pH effect was not obvious until day 5, but later, the concentration of GSNO in acidic medium dramatically decreased. Therefore, acidic medium which is necessary to the nitrosation process ought to be shifted to pH 7.4 to ensure better storage conditions. Besides, low pH value (lower than 1 unit with respect to physiological one) is not convenient for cell or animal experiments. It has already been stated that there are possible resonance forms between  $RS-N=O$  (form S),  $RS^+=N-O^-$  (form D) and  $R-S^-N=O^+$  (form I). Form D is described as favourable to strengthen the S-N bond and to be more abundant at low pH values [42, 43]. We presently observed that acidic medium did not improve GSNO solution storage over a long period (longer than 5 days). Although most authors consider GSNO to be more stable in acidic conditions, they performed stability studies at temperature equal or higher than  $22 \pm 2$  °C, and often with low purity reagents or with addition of metallic ions. In this way, a previous study of pH effect on *S*-nitrosocysteine stability indicates that it is linked to the presence of metallic ions (traces in low-purity buffer and reagent, or intentionally added to high-purity buffer) [39]. The use of high-purity eliminated the instability of the preparation. Hence, the

influence of 10  $\mu$ M copper II added to GSNO solutions (10 mM in phosphate buffer pH = 7.4, 4 °C) was studied (Fig. 4A). In this experimentation, a dramatically high initial rate of degradation was observed during the first day (75 % of the initial concentration remaining), followed by a lower decrease rate. The latter could be attributed to the formation of a complex between  $Cu^{2+}$  (or  $Cu^+$  which is suggested to be the effective agent [44]) and the glutamate residues in the degradation product, GSSG [44]. The addition of the chelating agent EDTA (0.1 mM) inhibited the copper II catalysed degradation (Fig. 4A). In addition, GSNO alone at pH = 7.4 was as stable as the GSNO/EDTA or GSNO/ $Cu^{2+}$ /EDTA solutions (Fig. 4A), demonstrating that the use of EDTA was not mandatory to obtain satisfying stability of GSNO, probably because of the high purity of our reactants and water. Besides, it is noteworthy that the chelating agents can induce some side effects in cell biology and pharmacological experiments (*e.g.* calcium flux is necessary to maintain the vascular tone in arteries).

At last, the impact of magnetic stirring on the stability of a GSNO solution at pH 7.4 stored at 4 °C was evaluated (Fig. 4B). Vigorous stirring (800 rpm) induced on the one hand oxygenation of the medium (the measured  $P_{O_2}$  difference between stirred and unstirred solutions was equal to + 37 mm Hg) and on the other hand an increase of the diffusion of species present. With these synergetic effects,



**Fig. (4).** Stability studies under various conditions: (A) at different pH values (pH = 0.3 corresponds to the reaction medium after synthesis; pH = 7.4 was obtained by neutralising with NaOH and adding phosphate buffer pH 7.4) with or without adding EDTA or copper ions (10  $\mu$ M), at 4 °C and (B) at pH 7.4 and at 4 °C with or without stirring. Results are given as a percentage of remaining GSNO (initial concentration of 10 mM) as evaluated by spectrophotometry at 334 nm ( $n = 2$ ).

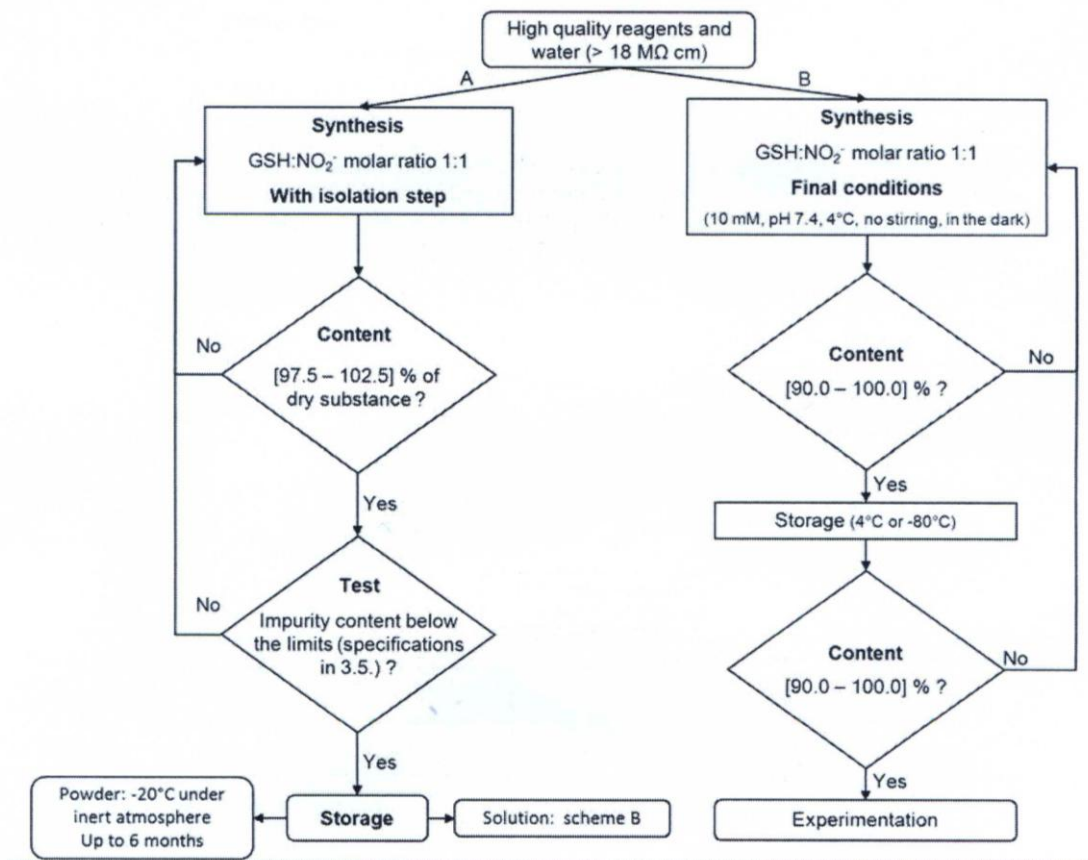


Fig. (5). Scheme summarizing the guidelines for GSNO synthesis with (A) or without the isolation step (B), relevant assays and storage.

GSNO was severely degraded: the phenomenon was observed since the second day of storage. The reaction between RSNO and dioxygen is already known [45]. Moreover, De Oliveira *et al.*, [46] showed that their decomposition, implied by an increase of Brownian motion, is influenced by the initial concentration of RSNO, but this effect was more pronounced for *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine and *S*-nitrosocysteine than for GSNO. Therefore, the storage conditions should avoid any handling that can increase the Brownian motion and/or introduce dioxygen into the medium.

After studying the effect of these parameters on GSNO stability, we examined the products of its degradation with the HPLC method. The analysis, performed on a 10-days-old GSNO solution stored at 4 °C in phosphate buffer, pH 7.4, revealed the presence of nitrite as well as GSSG in large quantities (2.9 % (m/m) and 25.2 % (m/m), respectively) and a small amount of nitrate (0.4 % (m/m)). Due to the presently found impurities, *i.e.* GSSG (which is the thermodynamically stable dimer [46]) and nitrite ions, a homolytic decomposition of S-NO bond is strongly hypothesized, followed by a dimerisation of the thiyl radical to form GSSG (4), as follows:



As a conclusion, the GSNO storage conditions are of main importance to avoid the presence of impurities in too high concentrations and to guarantee its unique

pharmacological effects: according to our results, GSNO solutions at pH 7.4 prepared with high purity water and reagents, carefully handled, can be stored in the dark, at 4 °C for 7 days. A summary reporting the critical points of the synthesis with or without the isolation and purification step, assays and storage is proposed in (Fig. 5).

## CONCLUSION

*S*-nitrosoglutathione is extensively studied due to its important role as a physiological NO<sup>•</sup> donor and a prospective drug. The present work has revisited different synthesis pathways and physico-chemical properties of GSNO in order to define its secured use for further *in vitro/ex vivo* or *in vivo* studies. It is the first time, to the best of our knowledge, that a HPLC method has been developed and validated to evaluate the content of the as-synthesised GSNO as well as to identify and qualify the impurities, based on pharmaceutical requirements. As demonstrated in this work, synthesis using NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and GSH in an 1:1 molar stoichiometric ratio, followed by GSNO isolation and purification, leads to a high product content and a very limited amount of impurities, as required by competent pharmaceutical authorities. The obtained product is also perfectly suited for biological experimentation.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.



## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support of Nancy-University (UHP\_2010\_BMS\_EA3452\_0047), the National Agency for Research, ANR (NanoSNO project) and the physico-chemical platform of the Faculty of Pharmacy of Nancy for making available FT-IR spectrophotometer. They also thank Pr G. Bartosz (Department of Molecular Biophysics, University of Lodz, Poland) for his support in the English reviewing of the manuscript.

## REFERENCES

- Bryan, N.S.; Grisham, M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.*, **2007**, *43*, 645-657.
- Thatcher, G.R.J. NO problem for nitroglycerin: organic nitrate chemistry and therapy. *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, *27*, 331-337.
- Bramanti, E.; Angeli, V.; Mester, Z.; Pompella, A.; Paolicchi, A.; D'Ulivo, A. Determination of S-nitrosoglutathione in plasma: comparison of two methods. *Talanta*, **2010**, *81*, 1295-1299.
- 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.
- Alencar, J.L.; Lobysheva, I.; Chalupsky, K.; Geffard, M.; Nepveu, F.; Stoclet, J.C.; Muller, B. S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, *307*, 152-159.
- Angeli, V.; Tacito, A.; Paolicchi, A.; Barsacchi, R.; Franzini, M.; Baldassini, R.; Vecoli, C.; Pompella, A.; Bramanti, E. A kinetic study of gamma-glutamyltransferase (GGT)-mediated S-nitrosoglutathione catabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2009**, *481*, 191-196.
- Khan, M.; Im, Y.B.; Shunmugavel, A.; Gilg, A.G.; Dhindsa, R.K.; Singh, A.K.; Singh, I. 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*, 1-12.
- Molloy, J.; Martin, J.F.; Baskerville, P.A.; Fraser, S.C.; Markus, H.S. S-nitrosoglutathione reduces the rate of embolization in humans. *Circulation*, **1998**, *98*, 1372-1375.
- Kaposzta, Z.; Baskerville, P.A.; Madge, D.; Fraser, S.; Martin, J.F.; Markus, H.S. L-arginine and S-nitrosoglutathione reduce embolization in humans. *Circulation*, **2001**, *103*, 2371-2375.
- Kaposzta, Z.; Martin, J.F.; Markus, H.S. Switching off embolization from symptomatic carotid plaque using S-nitrosoglutathione. *Circulation*, **2002**, *105*, 1480-1484.
- Kaposzta, Z.; Clifton, A.; Molloy, J.; Martin, J.F.; Markus, H.S. S-nitrosoglutathione reduces asymptomatic embolization after carotid angioplasty. *Circulation*, **2002**, *106*, 3057-3062.
- Langford, E.J.; Brown, A.S.; Wainwright, R.J.; De Belder, A.J.; Thomas, M.R.; Smith, R.E.; Radomski, M.W.; Martin, J.F.; Moncada, S. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet*, **1994**, *344*, 1458-1460.
- Ramsay, B.; Radomski, M.; De Belder, A.; Martin, J.F.; Lopez-Jaramillo, P. Systemic effects of S-nitroso-glutathione in the human following intravenous infusion. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1995**, *40*, 101-102.
- Salas, E.; Langford, E.J.; Marrinan, M.T.; Martin, J.F.; Moncada, S.; De Belder, A.J. S-nitrosoglutathione inhibits platelet activation and deposition in coronary artery saphenous vein grafts *in vitro* and *in vivo*. *Heart*, **1998**, *80*, 146-150.
- Lees, C.; Langford, E.; Brown, A.S.; De Belder, A.; Pickles, A.; Martin, J.F.; Campbell, S. The effects of S-nitrosoglutathione on platelet activation, hypertension, and uterine and fetal Doppler in severe preeclampsia. *Obstet. Gynecol.*, **1996**, *88*, 14-19.
- Rassaf, T.; Kleinbongard, P.; Preik, M.; Dejam, A.; Gharini, P.; Lauer, T.; Erckenbrecht, J.; Duschin, A.; Schulz, R.; Heusch, G.; Feelisch, M.; Kelm, M. 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.
- Simões, M.M.; De Oliveira, M.G. Poly(vinyl alcohol) films for topical delivery of S-nitrosoglutathione: effect of freezing-thawing on the diffusion properties. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **2010**, *93*, 416-424.
- Seabra, A.B.; Fitzpatrick, A.; Paul, J.; De Oliveira, M.G.; Weller, R. Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. *Br. J. Dermatol.*, **2004**, *151*, 977-983.
- Souto, S.; Palma, P.; Fregonesi, A.; Palma, T.; Reis, L.O. Vascular modifications of the clitoris induced by topic nitric oxide donor gel-preliminary study. *J. Sex. Med.*, **2011**, *8*, 484-488.
- Rassaf, T.; Poll, L.W.; Brouzos, P.; Lauer, T.; Totzeck, M.; Kleinbongard, P.; Gharini, P.; Andersen, K.; Schulz, R.; Heusch, G.; Mödder, U.; Kelm, M. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur. Heart J.*, **2006**, *27*, 1699-1705.
- Snyder, A.H.; McPherson, M.E.; Hunt, J.E.; Johnson, M.; Stamler, J.S.; Gaston, B. Acute effects of aerosolized S-nitrosoglutathione in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2002**, *165*, 922-926.
- Seabra, A.B.; De Oliveira, M.G. Poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) blended films for local nitric oxide release. *Biomaterials*, **2004**, *25*, 3773-3782.
- Seabra, A.B.; De Souza, G.F.; Da Rocha, L.L.; Eberlin, M.N.; De Oliveira, M.G. S-nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery. *Nitric Oxide*, **2004**, *11*, 263-272.
- Sonnenschein, K.; De Groot, H.; Kirsch, M. Formation of S-nitrosothiols from regiospecific reaction and thiols with N-nitrosotryptophan derivatives. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 45433-45440.
- Wang, K.; Wen, Z.; Zhang, W.; Xian, M.; Cheng, J.P.; Wang, P.G. Equilibrium and kinetics studies of transnitrosation between S-nitrosothiols and thiols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 433-436.
- Hart, T.W. Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 2013-2016.
- Murillo, D.; Kamga, C.; Mo, L.; Shiva, S. Nitrite as a mediator of ischemic preconditioning and cytoprotection. *Nitric Oxide*, **2011**, *25*, 70-80.
- Pinder, A.G.; Pittaway, E.; Morris, K.; James, P.E. Nitrite directly vasodilates hypoxic vasculature via nitric oxide-dependent and independent pathways. *Br. J. Pharmacol.*, **2009**, *157*, 1523-1530.
- International Conference on Harmonisation Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), **1995**.
- International Conference on Harmonisation Guideline on Impurities in new drug substances, Q3A(R2), **2006**.
- European Pharmacopoeia 7<sup>th</sup> Edition, Strasbourg, France, **2011**.
- Nagpal, S.; Karan; Upadhyay, A.; Bhardwaj, T.R.; Thakkar, A. A review on need and importance of impurity profiling. *Curr. Pharm. Anal.*, **2011**, *7*, 62-70.
- Giustarini, D.; Milzani, A.; Aldini, G.; Carini, M.; Rossi, R.; Dalle-Donne, I. S-nitrosation versus S-glutathionylation of protein sulfhydryl groups by S-nitrosoglutathione. *Antioxid. Redox Signal.*, **2005**, *7*, 930-939.
- Stoyanovsky, D.A.; Tyurina, Y.Y.; Tyurin, V.A.; Anand, D.; Mandavia, D.N.; Gius, D.; Ivanova, J.; Pitt, B.; Billiar, T.R.; Kagan, V.E. Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein S-nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15815-15823.
- Tsikak, D.; Denker, K.; Frölich, J.C. Artfactual-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.
- Kapil, V.; Milsom, A.B.; Okorie, M.; Maleki-Toyserkani, S.; Akram, F.; Rehman, F.; Arghandawi, S.; Pearl, V.; Benjamin, N.; Loukogeorgakis, S.; Macallister, R.; Hobbs, A. J.; Webb, A. J.; Ahluwalia, A. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension*, **2010**, *56*, 274-281.
- Al-Sa'doni, H.H.; Ferro, A. S-nitrosothiols as nitric oxide donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, *11*, 2679-2690.
- Heikal, L.; Martin, G.P.; Dailey, L.A. Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of

- analogues: *S*-nitrosophytochelatin. *Nitric Oxide*, **2009**, *20*, 157-165.
- [39] Gu, J.; Lewis, R.S. Effect of pH and metal ions on the decomposition rate of *S*-nitrosocysteine. *Ann. Biomed. Eng.*, **2007**, *35*, 1554-1560.
- [40] Noble, D.R.; Williams, D.L.H. Structure-reactivity studies of the Cu<sup>2+</sup>-catalyzed decomposition of four *S*-nitrosothiols based around the *S*-nitrosocysteine/*S*-nitrosoglutathione structures. *Nitric Oxide*, **2000**, *4*, 392-398.
- [41] Okado-Matsumoto, A.; Fridovich, I. Putative denitrosylase activity of Cu, Zn-superoxide dismutase. *Free Rad. Biol. Med.*, **2007**, *43*, 830-836.
- [42] Timerghazin, Q.K.; Peslherbe, G.H.; English, A.M. Resonance description of *S*-nitrosothiols: insights into reactivity. *Org. Lett.*, **2001**, *9*, 3049-3052.
- [43] Roy, B.; Du Moulinet d'Hardemare, A.; Fontecave, M. New thionitrites: synthesis, stability, and nitric oxide generation. *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 7019-7026.
- [44] Smith, J.N.; Dasgupta, T.P. 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.
- [45] Stamler, J.S.; Toone, E.J. The decomposition of thionitrites. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, *6*, 779-785.
- [46] De Oliveira, M.G.; Shishido, S.M.; Seabra, A.B.; Morgon, N.H. 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.

Received: May 15, 2012

Revised: September 04, 2012

Accepted: September 10, 2012

***S,S'*-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other *S*-nitrosothiols**

Fatima Dahboul<sup>a</sup>, Caroline Perrin-Sarrado<sup>a,\*</sup>, Ariane Boudier<sup>a,\*</sup>, Isabelle Lartaud<sup>a</sup>, Raphaël Schneider<sup>b</sup> and Pierre Leroy<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup>Université de Lorraine, CITHÉFOR – EA 3452, Faculté de Pharmacie, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France

<sup>b</sup>Université de Lorraine et CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274, BP 20451, 54001 Nancy Cedex, France

\*Equal contribution to the present work

\*\*Corresponding author:

e-mail: [pierre.leroy@univ-lorraine.fr](mailto:pierre.leroy@univ-lorraine.fr)

phone: + 33 3 83 68 23 77

fax: +33 3 83 68 23 01

Pr Pierre Leroy  
CITHEFOR EA 3452 "Cibles thérapeutiques, formulation et expertise préclinique du médicament"  
Faculté de Pharmacie  
5, rue Albert Lebrun  
BP 80403  
F-54001 NANCY Cedex FRANCE  
e-mail: [pierre.leroy@univ-lorraine.fr](mailto:pierre.leroy@univ-lorraine.fr);  
phone: + 33 3 83 68 23 77  
fax: +33 3 83 68 23 01

### To the Editor of European Journal of Pharmacology

Nancy, September

Dear Sir,

I would be very grateful if you consider for peer review, the manuscript by Dahboul *et al.*, entitled: **"S,S'-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other S-nitrosothiols"**.

This manuscript is an original contribution reporting the vasorelaxant properties of a new S-nitrosothiol offering higher advantages than previously reported ones, *i.e.* "S,S'-dinitrosobucillamine" (BUC(NO)<sub>2</sub>). This compound combines in its structure two S-mononitrosothiols: S-nitroso-N-acetylpenicillamine and S-nitroso-N-acetylcysteine. Our study indicates that BUC(NO)<sub>2</sub> releases a larger amount of nitric oxide into the aorta, partially through protein disulfide isomerase catalysis, and induces a more potent vasorelaxation, than other S-nitrosothiols previously reported.

All authors have read the present manuscript and approved its submission to *European Journal of Pharmacology*; the manuscript, or part of it, neither has been published (except in form of poster and oral communications) nor is currently under consideration for publication by any other journal.

We propose several potential reviewers, as required in your submission process:

1- Albert Ferro: Cardiovascular Clinical Pharmacology, School of Medicine (Cardiovascular Division), King's College London Building 150 Stamford Street London SE1 9NH, UK

Email address: [albert.ferro@kcl.ac.uk](mailto:albert.ferro@kcl.ac.uk)

2- Maria Franzini: Scuola Superiore Sant'Anna, c/o G. Monasterio Foundation, CNR- Regione Toscana, Via Giuseppe Moruzzi 1, 56124 Pisa, Italy

Email address: [m.franzini@sssup.it](mailto:m.franzini@sssup.it); [franzini@biomed.unipi.it](mailto:franzini@biomed.unipi.it)

3- Jean-Luc Décout: Université Joseph Fourier-Grenoble/CNRS, Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063, ICMG FR CNRS 2607, 38041 Grenoble, France

Email address: [Jean-Luc.Decout@ujf-grenoble.fr](mailto:Jean-Luc.Decout@ujf-grenoble.fr)

4- Catherine Vergely: University of Burgundy, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-Métaboliques (LPPCM), Faculties of Medicine and Pharmacy Inserm UMR866, Dijon, France

Email address: [cvergely@u-bourgogne.fr](mailto:cvergely@u-bourgogne.fr)

Waiting for reviewers' comments,

Regards,

Pr Pierre Leroy

## Abstract

*S*-nitrosothiols (RSNO) are considered as potential drugs for delivering nitric oxide ( $\cdot\text{NO}$ ) or related species in cardiovascular disorders associated with decrease in  $\cdot\text{NO}$  bioavailability. We have synthesized a new RSNO, *i.e.* *S,S'*-dinitrosobucillamine ( $\text{BUC}(\text{NO})_2$ ), which combines in its structure two *S*-mononitrosothiols, *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) and *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO). Synthesized  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  was structurally characterized using HPLC-MS,  $^1\text{H}$  NMR, IR spectroscopy, thermal analysis and UV-visible, and resulting data are consistent with the expected structure. The vasorelaxant effect of  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  was evaluated using isolated rat aortic rings and compared to SNAP, NACNO, and to an equimolar mixture of NACNO plus SNAP in order to mimic the number of  $\cdot\text{NO}$  contained in a  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  molecule.  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  ( $\text{pD}_2 = 7.8 \pm 0.1$ ) was more potent in vasorelaxation than NACNO ( $\text{pD}_2 = 6.4 \pm 0.2$ ), SNAP ( $\text{pD}_2 = 6.7 \pm 0.1$ ) and the mixture of SNAP plus NACNO ( $\text{pD}_2 = 6.7 \pm 0.2$ ). The release of  $\cdot\text{NO}$  from  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  was 6-fold that of basal value and significantly higher than the release of  $\cdot\text{NO}$  from the SNAP plus NACNO mixture (4-fold increase *versus* basal value). Finally, the role of protein disulfide isomerase (PDI) in  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  metabolism was investigated. Vasorelaxant effect ( $\text{pD}_2 = 6.8 \pm 0.2$ ) and  $\cdot\text{NO}$  release decreased in the presence of a PDI inhibitor (both  $p < 0.05$  *versus*  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ ). In conclusion,  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  releases a larger amount of  $\cdot\text{NO}$  into the aorta, partially through PDI activation, and induces vasorelaxation at lower concentrations than other RSNO previously reported.

## Key-words

*S,S'*-dinitrosobucillamine; physicochemical characterization; rat aorta ring; vasorelaxation; protein disulfide isomerase.

## List of abbreviations

AlbSNO: *S*-nitrosoalbumin; BUC(SH)<sub>2</sub>: bucillamine; BUC(NO)<sub>2</sub>: *S,S'*-dinitrosobucillamine; BUC(NO)<sub>1</sub>: mononitrosobucillamine; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; DAF-2: 4,5-diaminofluorescein; DAF-2 DA: 4,5-diaminofluorescein diacetate; DSC: differential scanning calorimetry; ESI: electrospray ionization; FT-IR: Fourier transform infrared; GSNO: *S*-nitrosoglutathione; HPLC: high-performance liquid chromatography; L-AT: L-amino acid transport; MS: mass spectrometry; NACNO: *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine; NMR: nuclear magnetic resonance; <sup>•</sup>NO: nitric oxide; ODQ: oxadiazolo [4,3-*a*] quinoxalin-1-one; PHE: phenylephrine; pD<sub>2</sub>: negative logarithmic of drug concentration inducing 50% of maximum effect; PDI: protein disulfide isomerase; RSNO: *S*-nitrosothiol; SNAP: *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine; SNOPC: *S*-nitrosophytochelatins; S.E.M.: standard error of mean; sGC: soluble guanylate cyclase.

## 1. Introduction

Nitric oxide ( $\text{NO}$ ) plays an important role in many physiological processes, especially in vascular tone homeostasis. In the vessel wall,  $\text{NO}$  released from endothelial cells diffuses to the smooth muscle cells layer and activates cytosolic soluble guanylate cyclase (sGC) to produce cyclic guanosine monophosphate (cGMP), which in turn mediates smooth muscle cells relaxation (Arnold *et al.*, 1977; Furchgott and Zawadzki, 1980). Decreased  $\text{NO}$  bioavailability has been described under ageing and numerous pathological conditions, particularly in cardiovascular diseases (Förstermann and Munzel, 2006).  $\text{NO}$  donors such as organic nitrates and sydnonimines are widely used as therapeutic agents (Thatcher, 1998). However, these treatments are known to provide a fast  $\text{NO}$  release concomitant with the induction of oxidative stress and frequently tolerance (Bauer and Fung, 1991; Parker and Gori, 2001). *S*-nitrosothiols (RSNO) have been proposed as  $\text{NO}$  donors because they do not present the drawbacks of organic nitrates. *S*-nitrosothiols are characterized by an *in vitro* half-life ranging from 10 to 38 h (Mancuso *et al.*, 2003). In vessels, RSNO induce vasorelaxation (Alencar *et al.*, 2003), prevent platelet aggregation (Furlong *et al.*, 1987), and are currently thought to play a major role in the endogenous storage and transport of  $\text{NO}$  (Al-Sa'doni and Ferro, 2004).

Most of RSNO previously synthesized are *S*-mononitrosothiols based on two different thiol moieties, either penicillamine or cysteine (Megson *et al.*, 1997; Al-Sa'doni and Ferro, 2004). Currently, research focuses on the development of di- or poly-*S*-nitrosothiols in order to increase the payload of compounds releasing  $\text{NO}$ , thus limiting the drug concentration.

We have presently selected the dithiol bucillamine ( $\text{BUC}(\text{SH})_2$ ) as an interesting  $\text{NO}$  carrier because it combines in its structure *N*-acetylcysteine and *N*-acetyl-*D,L*-penicillamine moieties at the same time (Fig. 1). Moreover,  $\text{BUC}(\text{SH})_2$  is a commercially available drug used in rheumatoid arthritis; it presents anti-inflammatory and anti-oxidant properties through metallic ion chelation (Mazor *et al.*, 2006), and it has undergone some preliminary investigations in experimental studies of ischemia-reperfusion (Amersi *et al.*, 2002). We have investigated the vasorelaxant properties of  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  by using an *ex vivo* aortic ring model and compared them to those of the two constitutive *S*-mononitrosothiols, *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) or *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine (NACNO), and to an equimolar mixture of SNAP plus NACNO (which mimics the number of  $\text{NO}$  moles contained in a  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  molecule). We hypothesised that  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  and SNAP plus NACNO would be more pharmacologically potent than the constitutive *S*-mononitrosothiols.



A further objective was to examine the denitrosation pathway of BUC(NO)<sub>2</sub>. Most of the RSNO are unable to cross the cell membranes and require enzymatic transformations. Protein disulfide isomerase (PDI) is an important enzyme involved in the formation and breakage of disulfide bonds. In the endoplasmic reticulum, PDI is used to regulate protein folding through disulfide formation and correction (Wilkinson and Gilbert, 2004). PDI is also located at the cytoplasmic membrane and has already been pointed out in <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O release from RSNO (Xiao *et al.*, 2005; Heikal *et al.*, 2011). We investigated the contribution of PDI to the BUC(NO)<sub>2</sub>-induced vasorelaxant effect in isolated rat aorta by using bacitracin, *i.e.* a PDI inhibitor.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and standards

All reagents were of analytical grade and used without further purification. 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2), 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA) were obtained from Interchim (Montluçon, France). *N*-(2-mercapto-2-methylpropanoyl)-*L*-cysteine (bucillamine, CAS no: 65002-17-7) was purchased from Discovery Fine Chemicals (Wimborne Dorset, United Kingdom). SNAP, oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), bacitracin, carbachol, protein disulfide isomerase (PDI) from bovine liver, 2,3-diaminonaphthalene (DAN) and all other reagents were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Ultrapure deionized water ( $> 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) was used to prepare all solutions.

### 2.2. Synthesis and physico-chemical characterisation of *S*-nitrosothiols

Nitrosation of  $\text{BUC}(\text{SH})_2$  was performed in acidic medium with a 2-fold molar excess of sodium nitrite by using two different protocols (see online supplementary methods). Mononitrosobucillamine ( $\text{BUC}(\text{NO})_1$ ) and NACNO were obtained by using similar conditions but with a  $\text{BUC}(\text{SH})_2$  and *N*-acetylcysteine to sodium nitrite ratio of 1:1. Due to the light-sensitivity of RSNO, all solutions of RSNO were protected by aluminium foil.

Physicochemical characterisation of  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  was performed either on the oily product or on the unisolated form in solution obtained using the two synthesis protocols. Structure of  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  was studied by using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometry (MS),  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR) spectroscopy, Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-visible. Thermal analysis was performed by differential scanning calorimetry (DSC) (see online supplementary methods).

The reaction yield of  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  synthesis and the residual nitrite ion ( $\text{NO}_2^-$ ) content in the reaction medium were measured by using Saville-Griess and Griess methods, respectively (Bryan and Grisham, 2007). Calibration curves were performed in the range  $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  M, using SNAP and sodium nitrite as standards for Saville-Griess and Griess assays, respectively. Additional impurities ( $\text{BUC}(\text{NO})_1$ ,  $\text{BUC}(\text{SH})_2$  and  $\text{NO}_2^-$ ) in  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  solution which could result from the synthesis process were quantified by HPLC coupled with UV

detection at 220 nm, using a calibration curves ( $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  M). BUC(NO)<sub>2</sub> solution was injected at a concentration of  $10^{-3}$  M (see online supplementary methods).

### 2.3. *In vitro* stability studies of *S,S'*-dinitrosobucillamine

The stability of a  $10^{-2}$  M BUC(NO)<sub>2</sub> solution was monitored as a function of time in three different conditions of temperature and pH: i) 4 °C, pH 7.4; ii) 4 °C, pH < 0.5; iii) 37 °C, pH 7.4. Data were expressed as percentage of remaining BUC(NO)<sub>2</sub> concentration measured by monitoring the absorbance at 334 nm.

### 2.4. *Biochemical and vascular studies of S-nitrosothiols*

#### 2.4.1. *Interaction of S-nitrosothiols with purified protein disulfide isomerase*

Interaction between RSNO and PDI was first evaluated *in vitro* by measuring the kinetics of the reaction between  $10^{-6}$  M PDI and  $5 \cdot 10^{-6}$  M of each RSNO in Tris buffer ( $10^{-2}$  M; pH 7.4) at room temperature ( $22 \pm 2$  °C). The decrease of fluorescence intensity measured at an excitation wavelength of 280 nm and an emission wavelength of 340 nm was monitored for 30 min. The release of <sup>\*</sup>NO occurring during this reaction time was determined by 2,3-diaminonaphthalene (DAN) assay, as previously described (Misko *et al.*, 1993) (calibration curve in the range  $5 \cdot 10^{-8}$  -  $5 \cdot 10^{-7}$  M using sodium nitrite as standard; fluorescence intensity measured at  $\lambda_{exc} = 375$  nm and  $\lambda_{em} = 415$  nm). The experiments were repeated in the presence of  $10^{-4}$  M bacitracin as PDI inhibitor.

#### 2.4.2. *Vasorelaxation studies of S-nitrosothiols*

Vasorelaxation was evaluated on endothelium-intact aortic rings isolated from 12 week-old, male, normotensive, outbred Wistar rats (Janvier Laboratories, Le Genest St Isle, France;  $300 \pm 25$  g). All experiments were performed in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals, the respect of the 3 Rs' requirements for Animal Welfare. The protocol has been approved by the regional ethic committee (CELMEA, agreement number CELMEA-2012-0017). Animals were kept under standard conditions (temperature:  $21 \pm 1$  °C, hygrometry  $60 \pm 10$  %, light on 6 am to 6 pm) and had free access to standard diet (A04, Safe, Villemoisson-sur-Orge, France) and water

(reverse osmosis system, Culligan, Brussels, Belgium). After anesthesia (sodium pentobarbitone 60 mg/kg, i.p., Sanofi Santé Nutrition Animale, Libourne, France) and intravenous administration of heparin (500 units, heparine Choay), rats were sacrificed by exsanguination. A segment (3 cm) of the descending thoracic aorta was removed and immediately placed in ice-cold Krebs' solution containing  $119 \cdot 10^{-3}$  M NaCl,  $4.7 \cdot 10^{-3}$  M KCl,  $1.2 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1.2 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{MgSO}_4$ ,  $1.6 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{CaCl}_2$ ,  $24 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{NaHCO}_3$ ,  $5.5 \cdot 10^{-3}$  M glucose, adjusted to pH 7.4. Vessels were cleaned from surrounding connective tissues, cut in 5-mm long rings and immediately used for vasoactivity studies. Some samples of aortic rings were frozen in liquid nitrogen for biochemical studies.

Aortic vasoactivity was measured as previously described (Lartaud *et al.*, 2007; Dahboul *et al.*, 2012) using an isometric force transducer (0 - 10 g, Fort 10, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). All manipulations and assays involving RSNO were performed under conditions of subdued light, in order to minimize light-induced RSNO degradation. The bath was filled with Krebs' solution (1.5 mL, 37 °C) and continuously bubbled with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ . Following 60-min equilibration with a basal resting tension determined at 2 g, as giving the maximal response to  $\alpha$ -adrenergic stimulation, rings were exposed 3 times to KCl ( $60 \cdot 10^{-3}$  M, 5 min, rings with a response lower than  $4.5 \pm 0.5$  g were discarded). Aortic rings ( $n = 6 - 12$  per group, from 3 - 8 different rats in each group) were then precontracted with  $10^{-6}$  M phenylephrine (PHE). At the plateau of contraction, concentration-relaxation response curves to increasing RSNO concentrations ( $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M) were performed.

Endothelium integrity was verified by measuring the ability of carbachol  $10^{-5}$  M to relax precontracted aortic rings (PHE,  $10^{-6}$  M).

The role of PDI in the vasorelaxant effect of RSNO was evaluated by comparing concentration-response curves in the absence and in the presence of  $10^{-4}$  M bacitracin (added 60 min before precontracting with PHE), as previously described (Heikal *et al.*, 2011).

The involvement of sGC in the vasorelaxation induced by  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  was evaluated in the presence of the inhibitor ODQ added at a concentration of  $5 \cdot 10^{-6}$  M, since the start of the 60-min equilibration period (Wang *et al.*, 2004).

#### 2.4.3. Quantification of $\cdot\text{NO}$ production in aortic rings

Quantification of intracellular  $\cdot\text{NO}$  was measured using the cell-permeable fluorogenic probe DAF-2 DA (Dahboul *et al.*, 2012). After 1-h preloading with  $10^{-5}$  M DAF-2 DA, aortic rings were rinsed in Krebs' solution then incubated or not with  $10^{-4}$  M bacitracin for 1 h

followed by 15-min incubation with  $10^{-3}$  M of either BUC(NO)<sub>2</sub> or a SNAP plus NACNO equimolar mixture. The subsequent nitrosated DAF-2 probe (DAF-2T) was extracted from the tissue using DMSO and fluorescence intensity was read by using a microplate reader (Biotek, USA,  $\lambda_{\text{exc}} = 485 \pm 20$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 528 \pm 20$  nm); \*NO concentration was calculated by using a calibration curve ( $2.5 - 25 \cdot 10^{-8}$  M) built with sodium nitrite as the standard.

### 2.5. Data analysis and statistical tests

Relaxation induced by RSNO (or carbachol) was calculated as the percentage of the relaxation induced by  $10^{-6}$  M PHE. The value of Hill slope for all experiments was  $0.82 \pm 0.05$ . The  $\text{pD}_{2}$ , *i.e.* the negative log of the molar concentration that produced 50%, of the maximal effect ( $-\log \text{EC}_{50}$ ), was calculated by fitting the dose-response curve using Graph Pad prism<sup>®</sup> (Version 4.0) software. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Significant differences between groups were determined by a one-way ANOVA followed by a post-hoc Bonferroni test. The null hypothesis was rejected at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Physicochemical properties of *S,S'*-dinitrosobucillamine

The structure of BUC(NO)<sub>2</sub> was confirmed by using both HPLC-MS and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The *m/z* value observed for the molecular peak of BUC(NO)<sub>2</sub> was 281.0061, which is in accordance with the theoretical mass (Fig. 2A). Other observed *m/z* ions corresponding to BUC(NO)<sub>2</sub> adducts were consistent with the expected structure.

In the <sup>1</sup>H NMR spectrum, after nitrosation, the signal of the CH<sub>2</sub> group localised at the  $\alpha$  position of the -SNO function of the cysteine core was shifted from 3.17-2.99 to 3.97-3.82 ppm (Table 1). This displacement is in agreement with results obtained for *S*-nitrosoglutathion (GSNO) (Parent *et al.*, 2013). It is also worthy to mention that the signal of the two CH<sub>3</sub> groups linked to the carbon atom at the  $\alpha$  position of the -SNO function of the penicillamine core was shifted from 1.64 to 1.57 and 1.05 ppm after nitrosation. The obtained data confirmed the nitrosation of both thiol functions of BUC(SH)<sub>2</sub>.

FT-IR analysis of BUC(NO)<sub>2</sub> showed the full disappearance of the thiol stretching vibration (at  $846 \text{ cm}^{-1}$ ) observed for BUC(SH)<sub>2</sub> (Table 1). The different spectrometric data were consistent with the structure of BUC(NO)<sub>2</sub> and confirm it as the main product resulting

from synthesis. As for thermal analysis, performed with DSC, a difference was observed between the melting point of BUC(SH)<sub>2</sub> and BUC(NO)<sub>2</sub>, 139.8 and 197.9 °C, respectively (Table 1).

The UV-visible spectrum of BUC(NO)<sub>2</sub> exhibits two bands with maxima at 334 and 545 nm (which corresponds both to the specific absorption of the SNO bond, Table 1 and Fig. 2B). The band at 545 nm appears as a combination of each individual mononitrosothiol band, and the calculated molar absorbance of BUC(NO)<sub>2</sub> at 334 nm was  $1720 \pm 20 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Fig. 2B).

Saville-Griess and Griess assays performed on the reaction medium resulting from BUC(NO)<sub>2</sub> synthesis indicated a reaction yield of  $99.5 \pm 0.1 \%$  for BUC(NO)<sub>2</sub> and a nitrite ion content of  $0.4 \pm 0.1 \%$  (mean  $\pm$  SD for 4 different batches).

BUC(NO)<sub>2</sub> impurities resulting from the synthesis process were analysed by HPLC (Fig. 2C). Results showed that less than 0.6 % of quantified impurities were present in the BUC(NO)<sub>2</sub> solution and consist in nitrite ion ( $0.30 \pm 0.05 \%$ ), BUC(SH)<sub>2</sub> ( $0.19 \pm 0.01 \%$ ) and BUC(NO)<sub>1</sub> ( $0.10 \pm 0.02 \%$ ). Nitrate and chloride ions, eluted in the void volume of the column, could not be quantified.

### 3.2. *In vitro* stability of *S,S'*-dinitrosobucillamine

*In vitro* stability studies were devoted to define the best storage conditions of BUC(NO)<sub>2</sub> solution resulting from the synthesis and to check that no BUC(NO)<sub>2</sub> degradation occurs under experimental conditions used in the *ex vivo* model.

As shown in Fig. 3A, BUC(NO)<sub>2</sub> was more stable in solution at pH < 0.5 than at pH 7.4. After 4-days storage at pH < 0.5 and 4 °C, the content of BUC(NO)<sub>2</sub> solution was  $98.1 \pm 0.1 \%$  (n = 3). Our results showed also that under experimental conditions used for vasorelaxation studies (37 °C, pH 7.4) less than 5 % of degradation of BUC(NO)<sub>2</sub> was observed after 3 h of incubation (Fig. 3B).

### 3.3. *Interaction of S,S'*-dinitrosobucillamine with protein disulfide isomerase

The *in vitro* decrease of intrinsic PDI fluorescence intensity in the presence of the three studied RSNO highlighted different rates of PDI-mediated denitrosation (the plot of rate disappearance *versus* time is linear, showing that the reaction obeys first order kinetics) (Table 2).

The disappearance rate of the reduced PDI form in the presence of BUC(NO)<sub>2</sub> ( $-0.146 \pm 0.007$  s<sup>-1</sup>) remained intermediary between the values observed for SNAP and NACNO. Simultaneous release of <sup>\*</sup>NO from RSNO was measured (Table 2): when 10<sup>-6</sup> M of PDI was added to 5.10<sup>-6</sup> M of each RSNO, the concentration of released <sup>\*</sup>NO was around 10<sup>-6</sup> M in all conditions. These results were consistent with the 1:1 stoichiometric ratio of the reaction between PDI and each RSNO and the use of PDI in limiting concentration compared to RSNO. In the presence of bacitracin, both disappearance rates of reduced PDI form and released <sup>\*</sup>NO induced by BUC(NO)<sub>2</sub> were divided by 10 ( $-0.017 \pm 0.005$  s<sup>-1</sup> and  $0.081 \pm 0.008 \cdot 10^{-6}$  M, respectively). Similar results were obtained with NACNO and SNAP (data not shown). All these results confirm that bacitracin inhibited RSNO denitrosation induced by PDI (Table 2).

### 3.4. Vasorelaxant responses of S-nitrosothiols in isolated aortic rings

In endothelium-intact aortic rings precontracted with PHE, BUC(NO)<sub>2</sub> elicited a concentration-dependent vasorelaxation (Fig. 4 A,B). In the presence of the sGC inhibitor ODQ, the concentration-response curve of BUC(NO)<sub>2</sub> was shifted to the right ( $pD_2 = 4.7 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$  *versus* BUC(NO)<sub>2</sub> alone), thus confirming that the observed effect was mediated through production of cGMP (Fig. 4 A,B).

Moreover, as demonstrated by the calculated pD<sub>2</sub> values, BUC(NO)<sub>2</sub> exhibited a higher potency to relax aorta than NACNO, SNAP, and also than the equimolar mixture of SNAP plus NACNO ( $p < 0.05$  for each condition *versus* BUC(NO)<sub>2</sub>, Fig. 5 A,B).

The vasorelaxant responses induced by BUC(NO)<sub>2</sub> were also shifted to the right after incubation of aortic rings with bacitracin, a PDI inhibitor, with a significant decrease of the pD<sub>2</sub> value ( $p < 0.05$ , Fig. 6A). On the opposite, bacitracin exhibited no effect on the vasorelaxation induced by SNAP and NACNO alone. Similarly, no change was observed with the mixture of SNAP plus NACNO (Fig. 6 B, C, D, E).

### 3.5. Release of <sup>\*</sup>NO from aortic rings incubated with S,S'-dinitrosobucillamine

BUC(NO)<sub>2</sub> induced a 6-fold increase of the <sup>\*</sup>NO content measured in the aorta as compared to the basal value ( $107 \pm 2 \cdot 10^{-6}$  M) (Fig. 7). The amount of <sup>\*</sup>NO released from the mixture of SNAP plus NACNO was significantly less than that from BUC(NO)<sub>2</sub> (4-fold increase *versus* basal value,  $p < 0.05$ ). <sup>\*</sup>NO production was partially reduced in the presence of

bacitracin (3-fold increase *versus*  $\cdot\text{NO}$  released from  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  alone) whereas no significant changes were observed in the  $\cdot\text{NO}$  released from the mixture of SNAP plus NACNO (Fig. 7). Control experiments were carried out in order to verify the possibility that bacitracin might directly interact with DAF-2 DA or affect tissue autofluorescence. Aortic rings were thus incubated in Krebs' solution in the presence of DAF-2DA without addition (control-basal) and after addition of bacitracin alone (control-bacitracin). Basal fluorescence was indeed appreciable in aortic rings, but was not modified in presence of bacitracin, suggesting that this compound did not modify tissue autofluorescence. This result also confirmed that bacitracin did not exert any effect on  $\cdot\text{NO}$  production independently of exogenously added  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ .



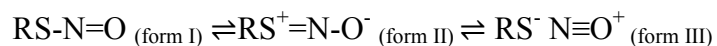
#### 4. Discussion

Use of dinitrosothiols appears as an interesting approach in order to increase the payload of compounds releasing  $\cdot\text{NO}$ , thus limiting the drug concentration. The first dinitrosothiol derived from penicillamine was synthesized by Moynihan and Roberts (1994), and it has been shown to induce a decrease of systemic arterial blood pressure in anesthetized rats and rabbits. Then, other di- or polynitrosothiols derived from cysteine core were synthesized. Poly-*S*-nitrosated albumin (polyAlbSNO) obtained by nitrosation of denaturated albumin, which presents a greater  $\cdot\text{NO}$  payload (20-fold) than the native form (AlbSNO), was shown to exhibit a more potent vasorelaxant effect (4-fold) than AlbSNO (DeMaster *et al.*, 1995). Similarly, *S*-nitrosophytochelatin (SNOPC, oligopeptides derived from GSNO; general formula:  $(\gamma\text{-Glu-Cys-NO})_n\text{-Gly}$ ;  $n = 2$  to  $6$ ) were more potent in vasorelaxation than GSNO, and this effect was related to the number of *S*-nitrosated moieties per mole of compound (Heikal *et al.*, 2011).

The initial choice of  $\text{BUC(SH)}_2$  mainly relies upon its ability to form a dinitrosothiol which could release two  $\cdot\text{NO}$ , and the addition of cleavable  $\cdot\text{NO}$  moieties to this drug could also enrich its basic pharmacological properties. Its synthesis was operated in the same conditions than those usually described for other *S*-mononitrosothiols such as GSNO, SNAP and NACNO (Al-Sa'doni *et al.*, 2000; Alencar *et al.*, 2003), but doubling the amount of sodium nitrite to fit with the stoichiometry of the expected product. This approach has already been reported to be successful to nitrosate other dithiols such as dithiothreitol (Le *et al.*, 1997) and polythiols, *e.g.* phytochelatin (Heikal *et al.*, 2009).

Most of RSNO synthesized in the literature, *e.g.* NACNO, SNAP derivatives and SNOPC (Tullett *et al.*, 2001; Alencar *et al.*, 2003) have never been isolated in solid form and they are commonly used to investigate their biological effect as solutions obtained by diluting reaction medium (Broniowska *et al.*, 2013). The product obtained by dinitrosation of  $\text{BUC(SH)}_2$  was physicochemically characterized, then its pharmacological action on vessels was evaluated. Classical physicochemical methods (HPLC-MS,  $^1\text{H}$  NMR, IR, DSC and UV-visible) already applied to other RSNO (Heikal *et al.*, 2009; Parent *et al.*, 2013), give rise to data consistent with  $\text{BUC(NO)}_2$  structure. Purity of  $\text{BUC(NO)}_2$  (99.5 %) and its impurities content (close to 0.5 %) were in accordance with the usual requirements of health competent authorities, and values reported for other RSNO in literature (Al-Sa'doni and Ferro, 2004; Parent *et al.*, 2013).

Stability is another critical point when considering new  $\text{NO}$  donors, and it was presently investigated for  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ . The *in vitro* stability of RSNO has already been extensively studied (Roy *et al.*, 1994; Moran *et al.*, 2011; Gaucher *et al.*, 2013) and it is mainly dependent on pH. This dependence can be rationalized in term of the relative weight of their three resonance forms (Moran *et al.*, 2011):



At pH 7.4,  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  was shown to be less stable than at low pH value. Indeed, under acid medium, a shift of the equilibrium to form II,  $\text{RS}^+=\text{N-O}^-$  (Roy *et al.*, 1994), occurred, which strongly stabilised  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ . Our results allowed to define the optimum storage conditions of  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  solution. In fact,  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  was stable for 4 days, at 4 °C and at pH < 0.5. We also demonstrated that  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  was not degraded under artificial physiological conditions (37 °C, pH 7.4) during at least 3 h. This result allowed the use of  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  solution during the present biochemical and pharmacological studies.

One of the most interesting findings in this work is the fact that  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  exhibits a potent concentration-dependant vasorelaxation of pre-constricted rat aorta.  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  exhibits an increase of  $\text{NO}$  bioavailability by providing a high theoretical  $\text{NO}/\text{RSNO}$  mass ratio (Table 3). The ability of  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  to release  $\text{NO}$  in aorta was higher and, when comparing their vasorelaxation efficiency measured by using the isolated aortic ring of Wistar rat,  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  induced vasorelaxation at lower concentrations than other usually studied *S*-mononitrosothiols (NACNO, SNAP, AlbsNO and GSNO) (Table 3). Moreover,  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  appears a more potent vasorelaxant agent than other di- or poly-*S*-nitrosothiols (Table 3).

The vasorelaxant effect of  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  is attenuated in presence of the inhibitor of sGC, ODQ. These data suggest that  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  is involved in the activation of sGC/cGMP pathway. It has already been reported that RSNO causes vasorelaxation *via* sGC activation (Ceron *et al.*, 2001; Alencar *et al.*, 2003; Dahboul *et al.*, 2012). However, RSNO can also produce relaxation by themselves, independently from sGC activation. NACNO and GSNO have been shown to induce vasorelaxation through cGMP dependent and independent pathways, and it has been suggested that these RSNO could directly activate  $\text{K}_{\text{ATP}}$  and  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels (Ceron *et al.*, 2001). In this context, it is not excluded that  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  can also induce direct vascular effects and further experiments are needed to investigate this point.

Based on the results reported by Heikal *et al.* (2011), our hypothesis was that the vasorelaxant properties were linked to the number of  $\text{NO}$  releasable from the RSNO. In this context, we expected that the vasorelaxation induced by  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  would occur at a similar concentration than the equimolar mixture of SNAP plus NACNO. We showed that the

vasorelaxant effect of BUC(NO)<sub>2</sub> occurred at lower concentrations and the corresponding <sup>•</sup>NO release in aortic rings were significantly more important than the mixture of NACNO plus SNAP. Therefore we hypothesized that other specific features of BUC(NO)<sub>2</sub> accounted to its effect and we have further investigated its interaction with the most important denitrosating enzyme located on the membrane, *i.e.* PDI. The *in vitro* interaction between BUC(NO)<sub>2</sub> and purified PDI demonstrated the ability of this enzyme to fully denitrosate BUC(NO)<sub>2</sub>. These *in vitro* studies also demonstrated that bacitracin was an efficient inhibitor of PDI, as already described in the literature (Shah *et al.*, 2007). When using the *ex vivo* model of isolated aorta, the vasorelaxant curve of BUC(NO)<sub>2</sub> was shifted to the right and the <sup>•</sup>NO release was significantly decreased in presence of bacitracin, whereas no change was noted for SNAP, NACNO and SNAP plus NACNO mixture (Fig. 5). Discrepancies were observed between data from *in vitro* studies demonstrating the ability of PDI to denitrosate both SNAP and NACNO, and the results from *ex vivo* studies showing no effect of PDI inhibition on vasorelaxation. In fact, purified PDI used in our *in vitro* studies at a concentration of 10<sup>-6</sup> M, was easily access for all RSNO. However, in a vessel, which represents a more complex biological system, PDI located at the plasma membrane could be less available to the RSNO denitrosation process. This difference in PDI availability might be account for these disagreements. Furthermore, despite the ability of PDI to metabolize SNAP and NACNO in the *in vitro* conditions, other mechanisms, such as transport by L-amino acid transport (L-AT), are suggested to preferentially participate to the release of <sup>•</sup>NO from RSNO with a cysteine core in the presence of vascular tissue (Heikal *et al.*, 2011).

Our results suggest that vascular PDI strongly interacts with BUC(NO)<sub>2</sub>, which could increase its <sup>•</sup>NO release and promote the aorta relaxation. The role of PDI in the vasorelaxation has also been observed with other *S*-mononitrosothiols such as GSNO and *S*-polynitrosothiols like SNOPC<sub>2,4,6</sub> (Heikal *et al.*, 2011). However, PDI inhibitor does not fully suppress BUC(NO)<sub>2</sub> vasorelaxation indicating that bioactive amounts of <sup>•</sup>NO entered the cells *via* other mechanisms such as direct uptake, or that PDI inhibition is only partial. Indeed, the higher lipophilicity of BUC(NO)<sub>2</sub> (cLog P = 1.08) than NACNO (cLog P = -0.46) and SNAP (cLog P = 0.08) could induce a more favourable direct cell penetration of BUC(NO)<sub>2</sub>, and consequently the released <sup>•</sup>NO could be increased. This hypothesis has already been proposed in the case of some *S*-nitrosated penicillamine derivatives which are more hydrophobic than the mother molecule SNAP (Al-S'adoni *et al.*, 2000). Intracellular enzymes such as thioredoxin can metabolise BUC(NO)<sub>2</sub> and allow the release of <sup>•</sup>NO (Broniowska *et al.*, 2013) (Fig. 8).

As a main result, we have demonstrated that BUC(NO)<sub>2</sub> which presents a 2-fold increase of NO payload *versus* conventional mononitrosothiols exhibits a 10-fold increase of vasorelaxation effect, offering interesting therapeutic perspectives to this molecule.

## 5. Conclusion

In this study, we prepared and fully characterized a new *S,S'*-dinitrosothiol, BUC(NO)<sub>2</sub>. Its synthesis using sodium nitrite and BUC(SH)<sub>2</sub> in a 2:1 molar ratio leads to a high product content and a very limited amount of impurities in solution. The vasorelaxant effect and <sup>•</sup>NO delivery of BUC(NO)<sub>2</sub> revealed that the molecule is 10-fold more potent than the mixture of SNAP plus NACNO, thus it could be an interesting drug candidate. Studies of selected <sup>•</sup>NO delivery mechanism to intracellular target showed that BUC(NO)<sub>2</sub> releases a large amount of <sup>•</sup>NO into the aorta through PDI enzymatic pathway. Further experiments are planned to test BUC(NO)<sub>2</sub> *in vivo*, and fully check its pharmacological activity.

## **Acknowledgments**

The authors acknowledge the National Agency for Research (ANR, NanoSNO project), the French Ministry of Education, Research and Technology (Paris, France, EA3452), the Lorraine Regional Development Committee (Metz, France) (CPER 2007-13 PRST «Ingénierie Moléculaire et Thérapeutique – Santé», Pr. P. NETTER, axe «Molécules et Ciblage Thérapeutique», Dr. Y. CHAPLEUR), and Université de Lorraine (France) (project UHP\_2010\_BMS\_EA 3452\_0047). The authors are also grateful to Arnaud Pallotta and Loic Zalka for their helpful contribution to the experimental studies.

The authors are grateful to Pr. Philippe MAINCENT (EA CITHEFOR 3452) and Pr. Jean-François COLLET (de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium) for their helpful contribution to the present manuscript preparation.

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Al-Sa'doni, H.H., Ferro, A., 2004. S-nitrosothiols as nitric oxide-donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications. *Curr. Med. Chem.* 11, 2679–2690.
- Al-Sa'doni, H.H., Khan, I.Y., Poston, L., Fisher, I., Ferro, A., 2000. A novel family of S-nitrosothiols: chemical synthesis and biological actions. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 4, 550–560.
- Alencar, J.L., Lobysheva, I., Chalupsky, K., Geffard, M., Nepveu, F., Stoclet, J.-C., Muller, B., 2003. S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 152–159.
- Amersi, F., Nelson, S.K., Shen, X.D., Kato, H., Melinek, J., Kupiec-Weglinski, J.W., Horwitz, L.D., Busuttill, R.W., Horwitz, M.A., 2002. Bucillamine, a thiol antioxidant, prevents transplantation-associated reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8915–8920.
- Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., Murad, F., 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 3203–3207.
- Bauer, J.A., Fung, H.L., 1991. Differential hemodynamic effects and tolerance properties of nitroglycerin and an S-nitrosothiol in experimental heart failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 249–254.
- Bryan, N.S., Grisham, M.B., 2007. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples, *Free Radic. Biol. Med.* 43, 645–657
- Broniowska, K.A., Diers, A.R., Hogg, N., 2013. S-nitrosoglutathione. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3173–3181.
- Ceron, P.I., Cremonez, D.C., Bendhack, L.M., Tedesco, A.C., 2001. The relaxation induced by S-nitroso-glutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine in rat aorta is not related to nitric oxide production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 686–694.

- Dahboul, F., Leroy, P., Maguin Gate, K., Boudier, A., Gaucher, C., Liminana, P., Lartaud, I., Pompella, A., Perrin-Sarrado, C., 2012. Endothelial  $\gamma$ -glutamyltransferase contributes to the vasorelaxant effect of S-nitrosoglutathione in rat aorta. *PLoS One* 7, e43190.
- DeMaster, E.G., Quast, B.J., Redfern, B., Nagasawa, H.T., 1995. Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide. *Biochemistry* 34, 11494–11499.
- Förstermann, U., Münzel, T., 2006. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease From Marvel to Menace. *Circulation* 113, 1708–1714.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.
- Furlong, B., Henderson, A.H., Lewis, M.J., Smith, J.A., 1987. Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.* 90, 687–692.
- Gaucher, C., Boudier, A., Dahboul, F., Parent, M., Leroy, P., 2013. S-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of S-nitrosothiols. *Curr. Pharm. Des.* 19, 458–472.
- Giustarini, D., Tsikas, D., Rossi, R., 2011. Study of the effect of thiols on the vasodilatory potency of S-nitrosothiols by using a modified aortic ring assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 95-102.
- Heikal, L., Martin, G.P., Dailey, L.A., 2009. Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of analogues: S-Nitrosophytochelatin. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 20, 157–165.
- Heikal, L., Aaronson, P.I., Ferro, A., Nandi, M., Martin, G.P., Dailey, L.A., 2011. S-nitrosophytochelatin: investigation of the bioactivity of an oligopeptide nitric oxide delivery system. *Biomacromolecules* 12, 2103–2113.
- Lartaud, I., Faure, S., Tabellion, A., Resende, A.C., Nadaud, S., Bagrel, D., Capdeville-Atkinson, C., Atkinson, J., 2007. Melatonin counteracts the loss of agonist-evoked contraction of aortic rings induced by incubation. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21, 273–279.

- Le, M., Zhang, H., Means, G.E., 1997. The decomposition of S-nitrosated dithiols: A model for vicinal nitrosothiols in enzymes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 1393–1398.
- Mancuso, C., Bonsignore, A., Di Stasio, E., Mordente, A., Motterlini, R., 2003. Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 66, 2355–2363.
- Mazor, D., Greenberg, L., Shamir, D., Meyerstein, D., Meyerstein, N., 2006. Antioxidant properties of bucillamine: possible mode of action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 1171–1175.
- Megson, I.L., Greig, I.R., Butler, A.R., Gray, G.A., Webb, D.J., 1997. Therapeutic potential of S-nitrosothiols as nitric oxide donor drugs. *Scott. Med. J.* 42, 88–89.
- Megson, I.L., Morton, S., Greig, I.R., Mazzei, F.A., Field, R.A., Butler, A.R., Caron, G., Gasco, A., Fruttero, R., Webb, D.J., 1999. N-substituted analogues of S-nitroso-N-acetylpenicillamine: chemical stability and prolonged nitric oxide mediated vasodilatation in isolated rat femoral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 126, 639–648.
- Misko, T.P., Schilling, R.J., Salvemini, D., Moore, W.M., Currie, M.G., 1993. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal. Biochem.* 214, 11–16.
- Moran, E.E., Timerghazin, Q.K., Kwong, E., English, A.M., 2011. Kinetics and mechanism of S-nitrosothiol acid-catalyzed hydrolysis: sulfur activation promotes facile NO<sup>+</sup> release. *J. Phys. Chem. B* 115, 3112–3126.
- Moynihan, H. A., Roberts, S. M. J. 1994. Preparation of some novel S-nitroso compounds as potential slow release agents of nitric oxide in vivo. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 7, 797-805.
- Parent, M., Dahboul, F., Schneider, R., Clarot, I., Maincent, P., Leroy, P., Boudier, A., 2013. A Complete Physicochemical Identity Card of S-nitrosoglutathione. *Curr. Pharm. Anal.* 9, 31–42.
- Parker, J.D., Gori, T., 2001. Tolerance to the organic nitrates: new ideas, new mechanisms, continued mystery. *Circulation* 104, 2263–2265.



- Roy, B., du Moulinet d'Hardemare, A., Fontecave, M., 1994. New Thionitrites: Synthesis, Stability, and Nitric Oxide Generation. *J. Org. Chem.* 59, 7019–7026.
- Shah, C.M., Bell, S.E., Locke, I.C., Chowdrey, H.S., Gordge, M.P., 2007. Interactions between cell surface protein disulphide isomerase and S-nitrosoglutathione during nitric oxide delivery. *Nitric Oxide* 16, 135–142.
- Thatcher, G.R.J., 1998. NO problem for nitroglycerin: organic nitrate chemistry and therapy. *Chem. Soc. Rev.* 27, 331–337.
- Tullett, J.M., Rees, D.D., Shuker, D.E., Gescher, A., 2001. Lack of correlation between the observed stability and pharmacological properties of S-nitroso derivatives of glutathione and cysteine-related peptides. *Biochem. Pharmacol.* 62, 1239–1247.
- Wang, C., Mansard, A., Giummelly, P., Atkinson, J., 2004. Decreased aortic smooth muscle contraction in a rat model of multibacterial sepsis. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 18, 679–683.
- Wilkinson, B., Gilbert, H.F., 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1699,35–44.
- Xiao, R., Lundström-Ljung, J., Holmgren, A., Gilbert, H.F., 2005. Catalysis of thiol/disulfide exchange. Glutaredoxin 1 and protein-disulfide isomerase use different mechanisms to enhance oxidase and reductase activities. *J. Biol. Chem.* 280, 21099–21106.

## Figure captions

**Figure 1.** Chemical structure of the different thiols presently studied for nitrosation: bucillamine (A), *N*-acetyl-*D,L*-penicillamine (B) and *N*-acetylcysteine (NAC) (C).

**Figure 2.** Mass spectra of BUC(NO)<sub>2</sub> obtained in negative ionisation mode (A). UV-visible spectra of BUC(NO)<sub>2</sub> (1), NACNO (2), and SNAP (3) in phosphate buffer (0.5 M; pH < 0.5) (B). Absorption maxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) and molar absorbance ( $\epsilon$ ) values for the different *S*-nitrosothiols presently studied. Typical chromatograms corresponding to (BUC(NO)<sub>2</sub>) solution showing the different inorganic and organic impurities detected at 220 nm (C). The separations were achieved on a C18 column eluted with acetonitrile-water-trifluoroacetic acid (30:70:0.1; v/v/v) at a flow rate of 0.8 mL.min<sup>-1</sup> and at 40 °C.

**Figure 3.** Stability studies of BUC(NO)<sub>2</sub> under the following conditions: 4 °C and pH < 0.5 (○) or pH = 7.4 (●) (A) and 37 °C and pH = 7.4 (B). Results are given as the percentage of remaining RSNO concentration evaluated by UV spectrophotometry at 334 nm. Data are means ± S.E.M.

**Figure 4.** Concentration dependent vasorelaxation response curves of BUC(NO)<sub>2</sub> alone (○) or in presence of 5.10<sup>-6</sup> M ODQ (●) (A). pD<sub>2</sub> values (B) (\*, p < 0.05 *versus* BUC(NO)<sub>2</sub> alone). Data are means ± S.E.M.

**Figure 5.** Concentration dependent vasorelaxation response curves of BUC(NO)<sub>2</sub> (○), SNAP (△), NACNO (□), and SNAP plus NACNO (◇) (A). pD<sub>2</sub> values (B) (\*, p < 0.05 *versus* BUC(NO)<sub>2</sub> alone). Data are means ± S.E.M.

**Figure 6.** Concentration dependent vasorelaxation response curves of BUC(NO)<sub>2</sub> alone (○) and in presence of 10<sup>-4</sup> M bacitracin (●) (A); SNAP alone (△) and in presence of 10<sup>-4</sup> M bacitracin ▲ (B); NACNO alone (□) and in presence of 10<sup>-4</sup> M bacitracin (■) (C), SNAP plus NACNO alone (◇) and in presence of 10<sup>-4</sup> M bacitracin (◆) (D). pD<sub>2</sub> values (E) (\*, p < 0.05 *versus* BUC(NO)<sub>2</sub> alone). Data are means ± S.E.M.

**Figure 7.** Panel A:  $\cdot\text{NO}$  production from rat aortic rings exposed to  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  alone ( $10^{-3}$  M) or SNAP plus NACNO alone or in the presence of bacitracin ( $10^{-4}$  M). Data are means  $\pm$  S.E.M. of 3 experiments \*  $p < 0.05$  *versus*  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ .

**Figure 8.** Proposed cellular mechanisms of  $\cdot\text{NO}$  release and vasorelaxant effect induced by  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ .

**Figure 1**

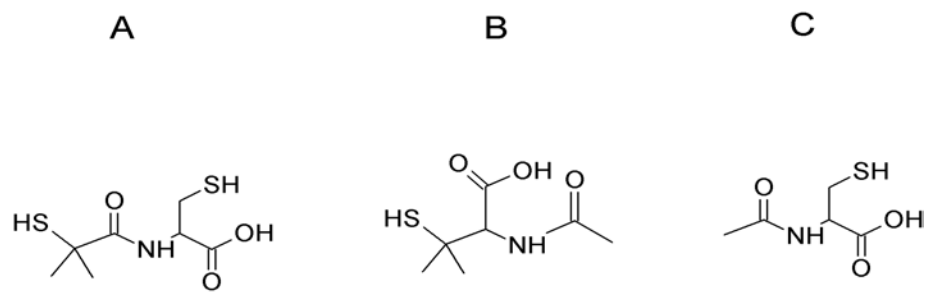
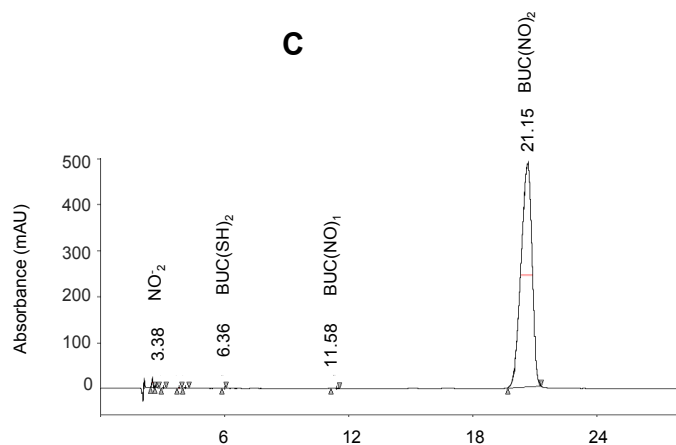
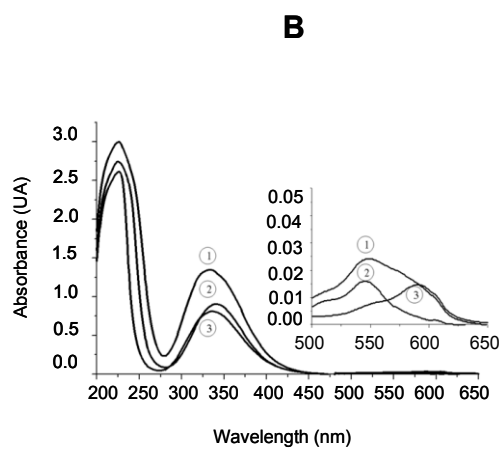
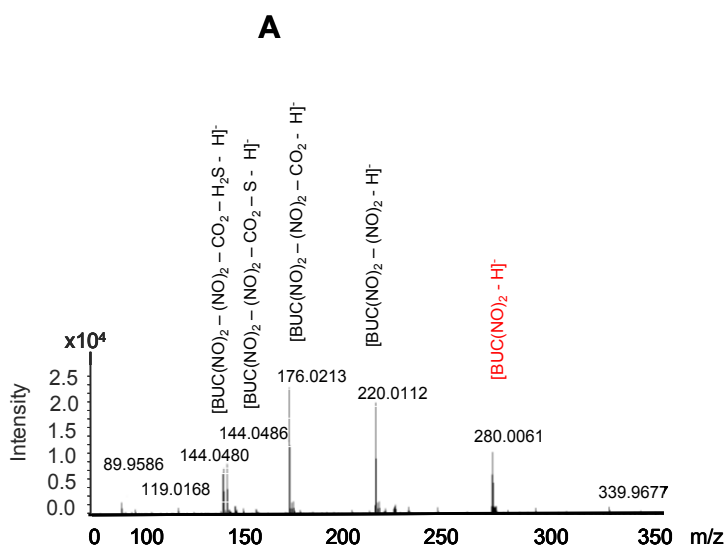


Figure 2



S- nitrosothiol	$\lambda$ max (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ )	
		our results	literature
NACNO	334	$900 \pm 10$	$872 \pm 22$ (Tullett <i>et al.</i> , 2001)
SNAP	340	$1020 \pm 20$	$1000 \pm 20$ (Megson <i>et al.</i> , 1999)
BUC(NO) <sub>2</sub>	334	$1720 \pm 20$	-
BUC(NO) <sub>2</sub>	334	$1720 \pm 20$	-

Figure 3

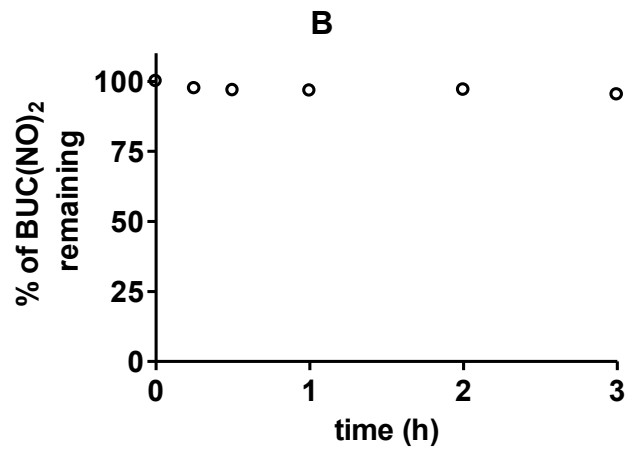
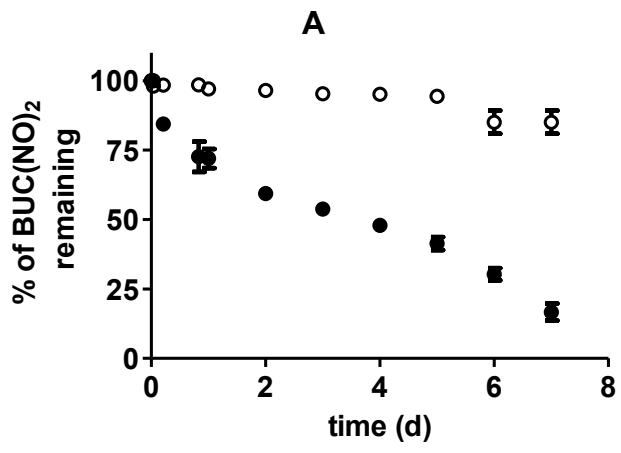


Figure 4

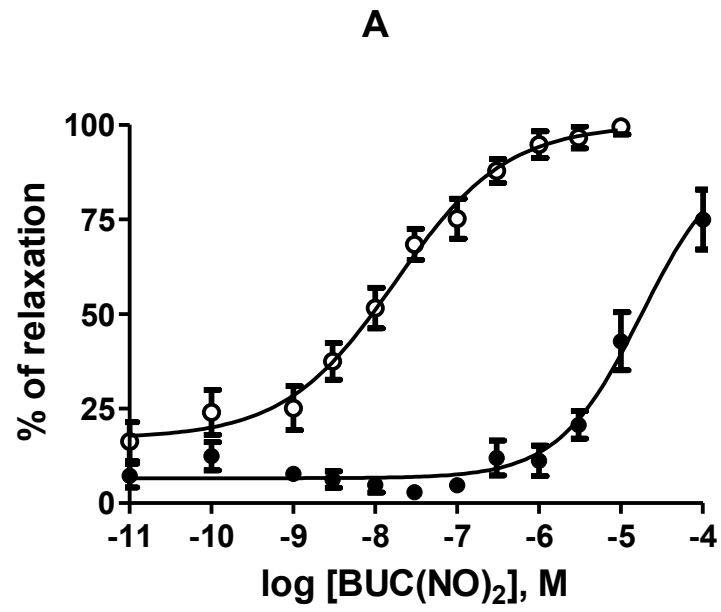


Figure 5

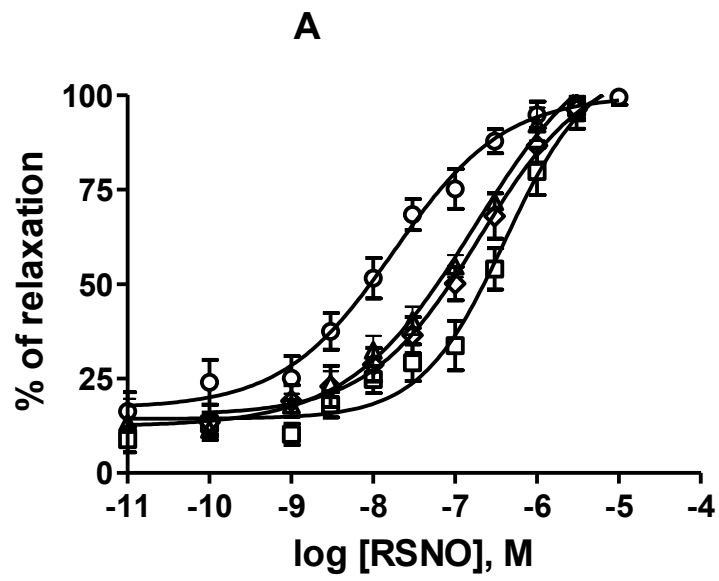
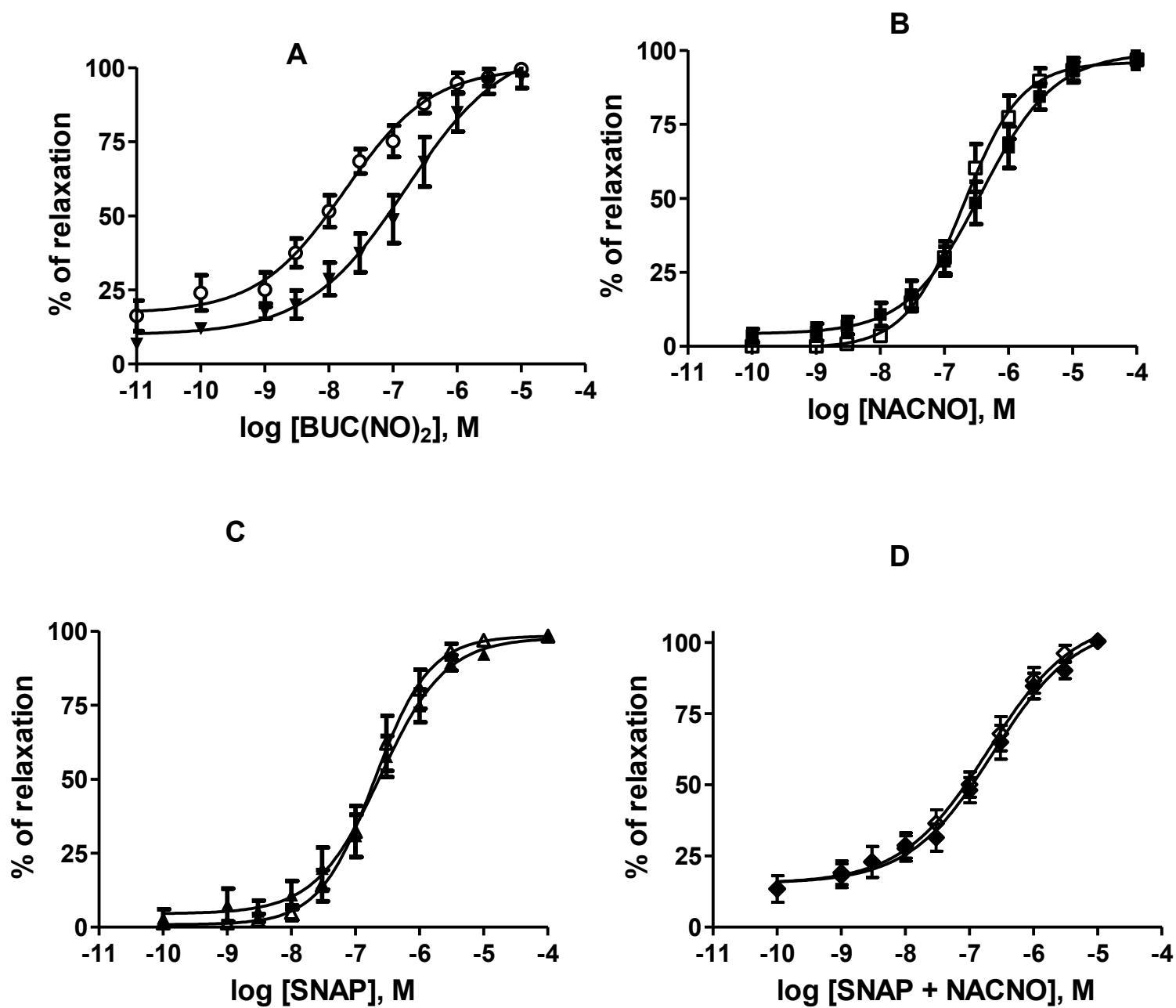




Figure 6



E

	pD <sub>2</sub>
BUC(NO) <sub>2</sub>	7.8 ± 0.1 (n = 11)
BUC(NO) <sub>2</sub> + bacitracin	6.8 ± 0.2 (n = 6)*
NACNO	6.4 ± 0.2 (n = 8)*
NACNO + bacitracin	6.7 ± 0.1 (n = 8)*
SNAP	6.7 ± 0.1 (n = 9)*
SNAP + bacitracin	7.1 ± 0.2 (n = 7)*
NACNO + SNAP	6.7 ± 0.2 (n = 7)*
NACNO + SNAP + bacitracin	6.4 ± 0.2 (n = 6)*

Figure 7

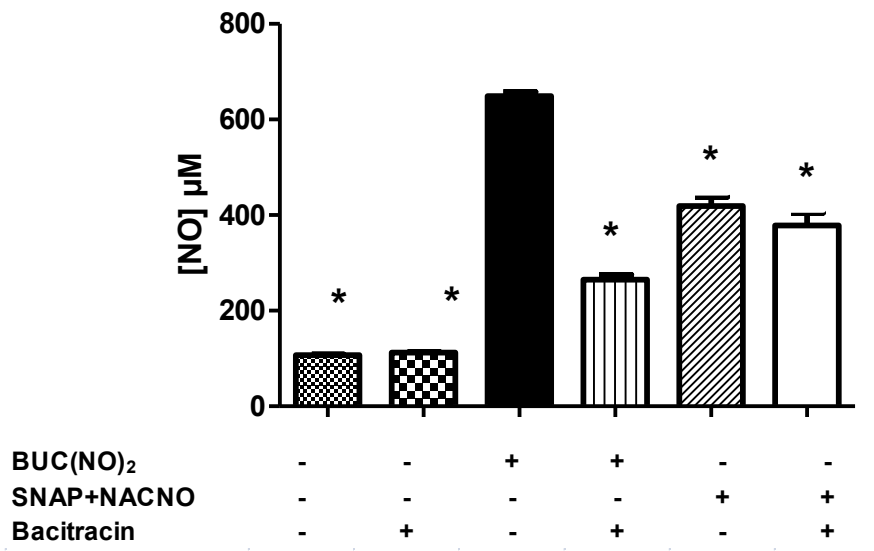
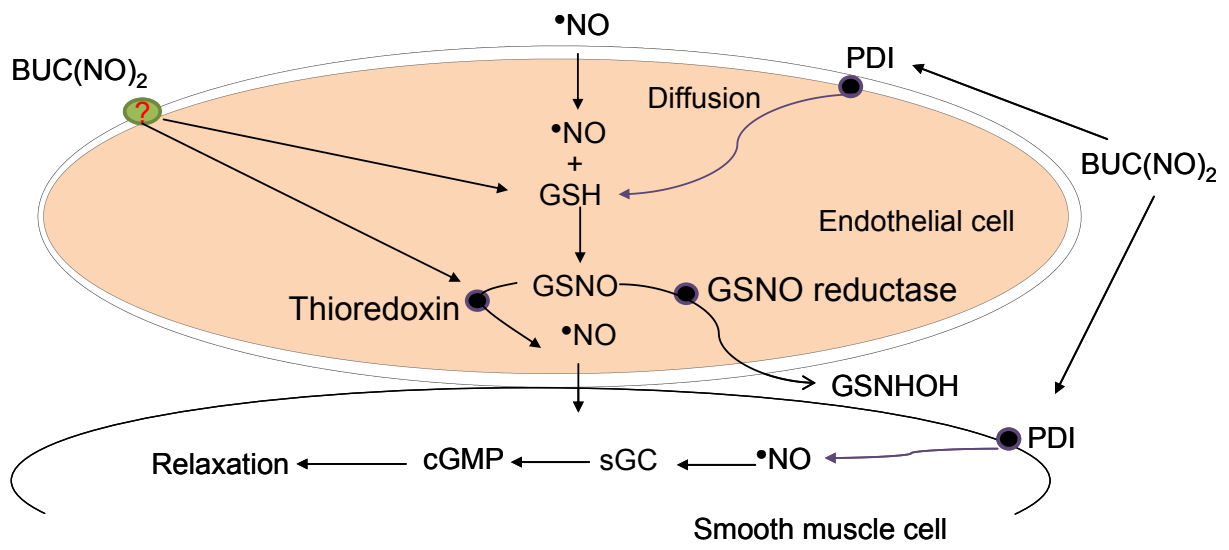
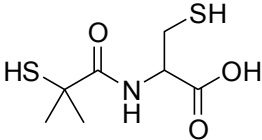
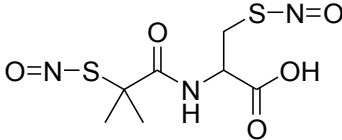


Figure 8



**Table 1.**

Physicochemical properties of BUC(NO)<sub>2</sub> compared to BUC(SH)<sub>2</sub>, using spectroscopic and thermal analysis.

Method		
	BUC(SH) <sub>2</sub>	BUC(NO) <sub>2</sub>
<b><sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)</b> δ (ppm)	4.60 (dd, <i>J</i> = 5.1, 1.8 Hz, 1H, <i>CH</i> ) 3.17-2.99 (m, 2H, <i>CH</i> <sub>2</sub> SH) 1.64 (s, 6H, 2 <i>CH</i> <sub>3</sub> )	8.45 (brd, 1H, <i>NH</i> ) 4.40 (brdd, 1H, <i>CH</i> ) 3.97-3.82 (m, 2H, <i>CH</i> <sub>2</sub> SNO) 1.57 (s, 3H, <i>CH</i> <sub>3</sub> ) 1.05 (s, 3H, <i>CH</i> <sub>3</sub> ) <i>CO</i> <sub>2</sub> <i>H</i> signal was not observed
<b>IR</b>	Thiol stretching vibration at 846 cm <sup>-1</sup>	Disappearance of the thiol stretching vibration at 846 cm <sup>-1</sup>
<b>DSC</b>	One endothermic event: melting point at 139.8 °C	One endothermic event: melting point at 197.9 °C
<b>UV-visible</b>	No maximum at λ > 220 nm	Maxima at 334 and 545 nm

**Table 2.**

Disappearance rate of reduced PDI after reaction with different *S*-nitrosothiols (RSNO). The reaction medium initially contains  $10^{-6}$  M of purified PDI, and  $5 \cdot 10^{-6}$  M of each studied RSNO in  $10^{-2}$  M Tris buffer pH 7.4, in the presence or absence of  $10^{-4}$  M bacitracin. The reaction was monitored by measuring the decrease of intrinsic PDI fluorescence intensity at 340 nm after excitation at 280 nm. Data correspond to three independent measurements (mean  $\pm$  S.E.M).

<b>RSNO</b>	<b>Disappearance rate of reduced PDI (<i>first order kinetic</i>)</b>	<b>Concentration of released <math>\cdot</math>NO (<math>10^{-6}</math> M)</b>
<b>NACNO</b>	$-0.062 \pm 0.005$	$0.700 \pm 0.150$
<b>BUC(NO)<sub>2</sub></b>	$-0.146 \pm 0.007$	$0.920 \pm 0.100$
<b>SNAP</b>	$-0.165 \pm 0.006$	$0.780 \pm 0.060$

**Table 3.**

Vasorelaxant effects (expressed as pD<sub>2</sub> values ± S.E.M.) of BUC(NO)<sub>2</sub> and different S-nitrosothiols (RSNO) reported in the literature using aortic rings isolated from male Wistar rat and physicochemical properties (cLog P and \*NO / RSNO mass ratio) that could influence pharmacological action of different S-nitrosothiols (RSNO).

<b>RSNO</b>	<b>Vasorelaxant effect (pD<sub>2</sub>)</b>	<b>cLog P<sup>#</sup></b>	<b>*NO / RSNO mass ratio</b>	<b>Reference</b>
GSNO	6.5 ± 0.1 6.5 <sup>§</sup>	-2.70	0.09	(Dahboul <i>et al.</i> , 2012) (Heikal <i>et al.</i> , 2011)
NACNO	6.5* <sup>§</sup> 6.4 ± 0.2	-0.46	0.16	(Alencar <i>et al.</i> , 2003) present study
SNAP	6.8* <sup>§</sup> 6.7 ± 0.1	0.08	0.14	(Alencar <i>et al.</i> , 2003) present study
AlbSNO (native form)	5.9* <sup>§</sup>	-	0.00046	(Giustarini <i>et al.</i> , 2011)
SNOPC <sub>2</sub>	6.8 <sup>§</sup>	-4.00	0.11	
SNOPC <sub>4</sub>	7.1 <sup>§</sup>	-	0.11	(Heikal <i>et al.</i> , 2011)
SNOPC <sub>6</sub>	7.2 <sup>§</sup>	-	0.11	
BUC(NO) <sub>2</sub>	7.8 ± 0.1	1.08	0.21	present study

<sup>#</sup>The calculated partition coefficient (cLog P) values were computed with ChemDraw software (CambridgeSoft, Perkin-Elmer, USA).

<sup>§</sup>pD<sub>2</sub> value calculated from the EC<sub>50</sub> provided in the corresponding study.

\*Vasorelaxation measured on endothelium-removed aortic rings.

## Supplementary Material and Methods

### 1. Synthesis of *S,S'*-dinitrosobucillamine

Nitrosation of BUC(SH)<sub>2</sub> was performed in acidic medium with a 2-fold molar excess of sodium nitrite by using two different protocols:

1- Synthesis of the BUC(NO)<sub>2</sub> solution: 44 mg of BUC(SH)<sub>2</sub> (0.2 mmol) were dissolved in *ca.* 7 mL of deoxygenated 0.5 M HCl by shaking for 30 min. Then, 1.0 mL of a 0.4 M NaNO<sub>2</sub> solution prepared in deoxygenated water was added, and the volume was filled up to 10.0 mL with 0.5 M HCl. The resulting mixture was kept in the dark at 4 °C for 1 h. For some experiments, 0.45 mL of a 40 % (w/v) NaOH solution was added and the volume was completed to 20.0 mL with phosphate buffer (0.5 M; pH 7.4).

2- Synthesis of BUC(NO)<sub>2</sub> applying the method described for SNAP (Al-S'adoni *et al.*, 2004) and consisting in a water-methanol mixture (32:68 v/v) as reaction medium: 580 mg of BUC(SH)<sub>2</sub> (2.6 mmol) were dissolved in 1 M HCl in CH<sub>3</sub>OH; 0.7 mL of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and a solution containing 360 mg of NaNO<sub>2</sub> (5.2 mmol) dissolved in 7 mL of water were added. The reaction mixture was stirred at 25 °C during 35 min under N<sub>2</sub> in the dark. Diethyl ether was added to the reaction medium (50:50 v/v), and the organic layer was separated and concentrated in vacuum. An oily product with 87 % purity (checked by Saville-Griess method) was obtained. All attempts to isolate BUC(NO)<sub>2</sub> as a solid with a high purity degree failed.

### 2. HPLC-UV/ HPLC-MS systems and operating conditions for studies of *S,S'*-dinitrosobucillamine

The HPLC system consisted of an isocratic pump (L-6000 model, Hitachi-Merck, Darmstadt, Germany), an injection valve equipped with a 20- $\mu$ L loop (7725i model, Rheodyne, IDEX, Oak Harbor, USA), a C18 column (Nucleosil<sup>®</sup> 100-5-C18-HD, 250  $\times$  4 mm I.D., Macherey-Nagel, Düren, Germany), a column oven (Croco-Cil, Cluzeau, France), a UV detector (LKB Bromma, Sweden), and a data processing software (Azur<sup>®</sup>153, Datalys, Saint-Martin-d'Hères, France). The mobile phase consisted in a mixture of acetonitrile-water-trifluoroacetic acid (30:70:0.1; v/v/v). Column temperature was set at 40 °C, flow rate was 0.8 mL.min<sup>-1</sup>, and UV detection was operated at 220 nm.

The HPLC coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) consisted of a HPLC system (model Ultimate 3000, Dionex-Thermo, Sunnyvale, USA) and a tandem MS equipped with an electrospray ionization (ESI) source (microTOF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, USA). Samples were dissolved in a mixture of acetonitrile and ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 6.8) (20:80 v/v) pumped through an Acclaim® 120 C18 (3 µm) column (150 × 1 mm I.D., Phenomenex, Torrance, USA) at a flow rate of 40 µL.min<sup>-1</sup> and a temperature of 40 °C. Analyte ions were generated by negative-mode ESI A (applied voltage: -4.5 kV).

### ***3. <sup>1</sup>H-NMR, infra-red studies of S,S'-dinitrosobucillamine***

<sup>1</sup>H NMR spectra were recorded in D<sub>2</sub>O using a 300 MHz spectrometer (Avance 300, Bruker, Bremen, Germany). Chemical shifts values are reported in ppm relative to the residual peak of the solvent. The following abbreviations were used to explain the multiplicities: s singlet, d doublet, m multiplet, dd doublet of doublets and br broadened. Coupling constants (*J*) are reported in hertz (Hz).

Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectra were recorded on a Vector 22 device (Bruker, Bremen, Germany) equipped with an attenuated total reflectance system (Pike Technologies, Meaux, France).

### ***4. Differential scanning calorimetric studies of S,S'-dinitrosobucillamine***

Differential scanning calorimetry (DSC) measurements were performed with a DSC Q10 (TA Instruments, Inc., New Castle, USA). About 5 mg of the product were placed in an open aluminium pan crimped with an aluminium lid. The crimped sample was then placed in the DSC cell opposite to empty aluminium pan (as reference) and the sample was scanned at 10 °C.min<sup>-1</sup> from 40 to 250 °C.



## 4. Résultats complémentaires du chapitre II

Dans cette section sont présentés les résultats complémentaires à ceux des articles 2 et 3. L'objectif de ces travaux est d'évaluer la stabilité des RSNO *in vitro* et dans les conditions expérimentales du modèle *ex vivo* utilisé pour l'étude de leurs propriétés vasorelaxantes. Les effets de la complexation des RSNO avec les CD ont été déterminés sur :

- (i) la stabilité des RSNO (GSNO, NACNO, SNAP et BUC(NO)<sub>2</sub>),
- (ii) la protection des RSNO contre la dégradation enzymatique par la GGT et la Trx-1.

### 4.1. Etude de la stabilité des *S*-nitroso-*N*-acétylcystéine et *S*-nitroso-*N*-acétylpénicillamine

Afin de déterminer les conditions idéales de conservation des solutions de NACNO et de SNAP (à une concentration de 10 mM) entre leur synthèse et leur utilisation, des études de stabilité ont été conduites dans les conditions opératoires suivantes (*cf.* article 3) :

- à deux valeurs de pH différentes : à pH < 0,5 (correspondant au milieu de synthèse) et à pH 7,4 (obtenu après neutralisation du milieu de synthèse par NaOH et ajout de tampon phosphate 10 mM, 7,4),
- à deux températures différentes : 4 et 37 °C,
- en présence de Cu<sup>2+</sup> (10 μM) à 4 °C et à pH 7,4.

Les résultats sont donnés en pourcentage de RSNO restant évalué par mesure de l'absorbance molaire à 334 nm pour la NACNO et 340 nm pour le SNAP (n = 3).

Comme le montre la figure 9 A et B, la dégradation de SNAP et de NACNO est plus lente à 4 °C qu'à 37 °C. En effet, après 2 h de stockage à 4 °C, le pourcentage de NACNO et de SNAP restant atteint 98,2 ± 0,6 % et 87,7 ± 0,1 %, respectivement. De la même manière, après 2 h de stockage à 37 °C, le pourcentage de NACNO et de SNAP restant est de 98,0 ± 0,6 % et 68,0 ± 0,2 %, respectivement. Par conséquent, une température 4 °C a été retenue pour tester l'influence du pH.

A pH < 0,5, le pourcentage de NACNO et de SNAP restant après 4 j atteint 96,1 ± 1,0 % (figure 9 C). Par ailleurs, à pH 7,4, le pourcentage de NACNO et de SNAP restant après 4 j est de 96,2 ± 0,2 % et 25,3 ± 0,9 %, respectivement (figure 9 A).

En effet, à pH < 0,5, la similitude entre la stabilité de SNAP, NACNO, BUC(NO)<sub>2</sub> et GSNO, dans lequel l'atome de carbone en position α est substitué ou non par un ou deux groupements méthyle, confirme l'hypothèse que la substitution de l'atome de carbone en

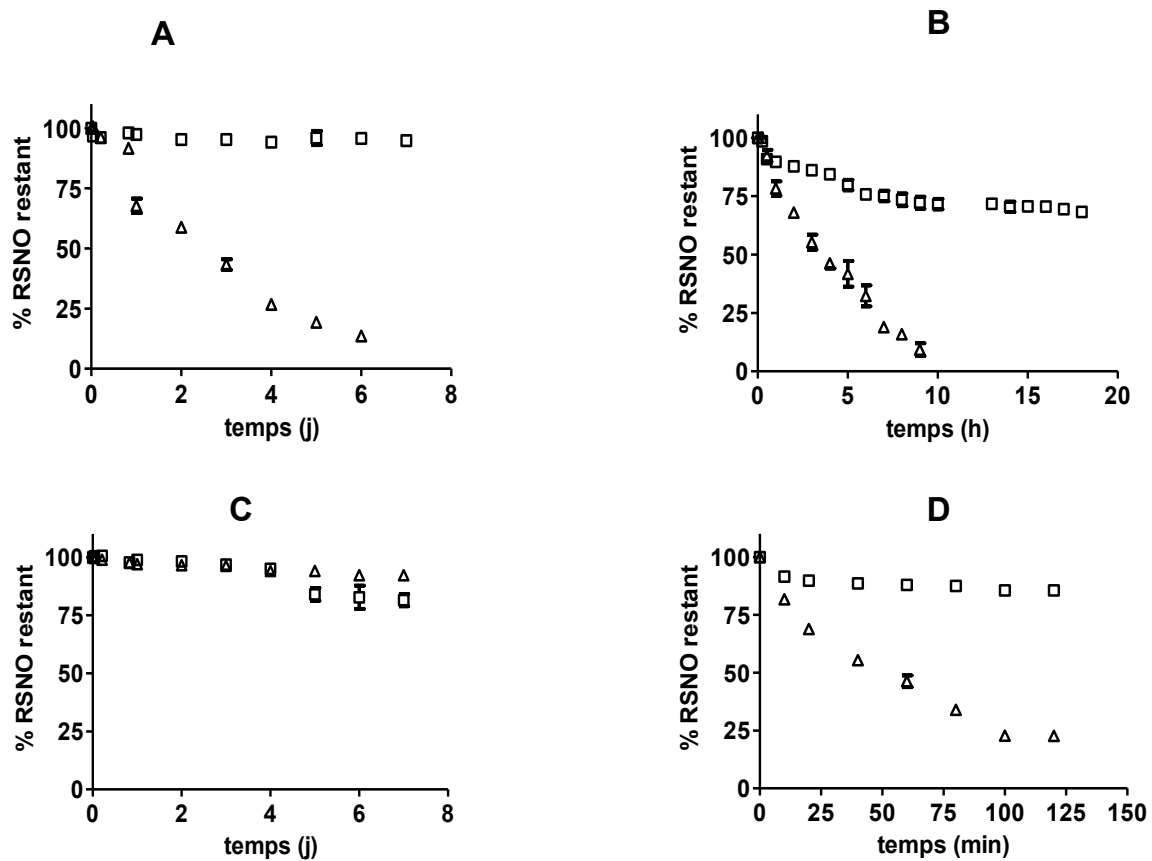
position  $\alpha$  n'a pas d'effet sur la stabilité des RSNO en milieu acide. Par conséquent, la raison pour laquelle les RSNO sont plus stables dans une solution acide peut être attribuée à un déplacement de l'équilibre de résonance vers la forme II ( $RS^+ = NO^-$ ) décrite comme la forme la plus stabilisante de la liaison S-NO et comme étant la plus abondante aux faibles valeurs de pH (Roy *et al.*, 1994, Megson *et al.*, 1997, Heikal *et al.*, 2010).

En opposition, la grande stabilité de NACNO et de GSNO à pH 7,4 se justifie par la formation de la structure cyclique à 6 atomes entre l'atome d'oxygène du groupe carbonyle et l'atome de soufre (Roy *et al.*, 1994).

La dégradation rapide de SNAP observée à pH 7,4 confirme que la présence d'un groupement méthyle en position  $\alpha$  déstabilise la liaison S-NO (Megson *et al.*, 1997). Ainsi, la BUC(NO)<sub>2</sub> présente une stabilité intermédiaire entre SNAP, NACNO et GSNO.

Enfin, l'impact des ions  $Cu^{2+}$  sur la stabilité de SNAP et de NACNO a été déterminé. Comme représenté sur la figure 9 D, les ions  $Cu^{2+}$  provoquent une décomposition rapide des deux RSNO. Le pourcentage de NACNO et de SNAP restant après 2 h de stockage à 4 °C est de  $85,2 \pm 0,5$  % et de  $23,5 \pm 0,5$  %, respectivement. Ces résultats sont conformes à ceux d'autres études (Megson *et al.*, 1997).

Par conséquent, les conditions idéales de conservation entre synthèse et utilisation sont : pH 7,4 et 4 °C pour NACNO et pH < 0,5 et 4 °C pour SNAP. Les deux solutions sont préparées avec des réactifs et de l'eau de haute qualité (afin de minimiser les traces d'ions métalliques) et sont conservées à l'abri de la lumière et pendant 4 j au maximum.



**Figure 9** : Etude de stabilité des solutions de NACNO (□) et SNAP (△) (10 mM) dans différentes conditions : A) 4 °C, pH 7,4, B) 37 °C, pH 7,4, C) 4 °C, pH 0,3, D) 4 °C, pH 7,4 avec Cu<sup>2+</sup> (10 μM). Les résultats sont donnés en pourcentage de RSNO restant et évalués par spectrophotométrie à 334 nm pour le NACNO et 340 nm pour le SNAP (n = 3).

## **4.2. Etude de la stabilité des S-nitrosothiols dans les conditions expérimentales du modèle *ex vivo***

Nous avons étudié la stabilité des RSNO dans les conditions expérimentales du modèle *ex vivo* utilisé pour l'évaluation de leurs propriétés vasorelaxantes, à savoir le modèle d'anneau d'aorte isolée de rat. Ces études ont été réalisées à une concentration de RSNO égale à  $10^{-7}$  M (valeur correspondant à la CE50 de la plupart des RSNO étudiés dans la littérature) et de ce fait elles ont nécessité l'emploi d'une méthode de dosage plus sensible que celles utilisées dans les études de stabilité décrites précédemment (UV, Saville-Griess, CLHP). Une méthode spectrofluorimétrique utilisant la sonde 2,3-diaminonaphtalène (DAN) a été retenue. Cette sonde est un composé diamino aromatique non fluorescent, qui réagit en milieu acide avec une espèce dérivée de  $\cdot\text{NO}$ ,  $\text{NO}^+$ , pour former un produit fluorescent en milieu alcalin : le 2,3-naphotriazole (NAT) ( $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{em}} = 415 \text{ nm}$ ). Les RSNO ont été quantifiés par réaction préalable avec un excès de  $\text{HgCl}_2$  en milieu acide provoquant un clivage hétérolytique de la liaison S-NO et une libération de  $\text{NO}^+$  qui peut ensuite réagir avec la sonde DAN.

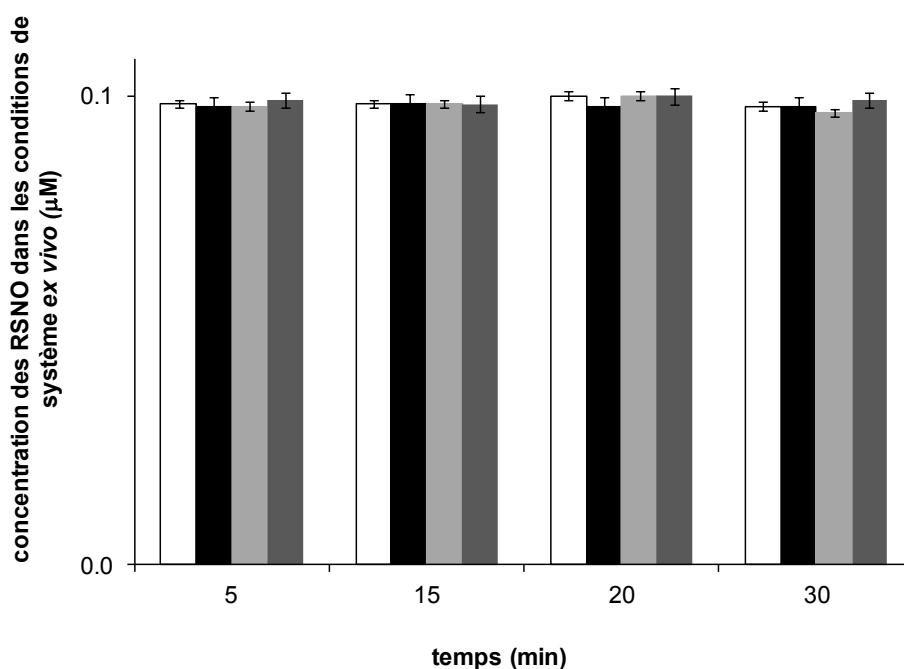
Le tableau 5 résume les différentes caractéristiques des méthodes analytiques utilisées au sein du laboratoire pour doser les RSNO, le  $\cdot\text{NO}$  ou les ions nitrite. Les espèces dérivées de  $\cdot\text{NO}$  ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NO}^+$ ) réagissant avec les réactifs varient avec la méthode analytique utilisée et elles ne seront pas précisées ultérieurement dans le texte. D'autres méthodologies offrant des limites de détections (LOD) plus faibles sont décrites dans la littérature (Griveau et Bedioui, 2013). Elles reposent principalement sur l'emploi de la chimiluminescence (LOD =  $1.10^{-9}$  M, Bryan et Grisham, 1997) et d'électrodes sélectives du  $\cdot\text{NO}$  (LOD =  $3.10^{-9}$  M, Davies et Zhang, 2008).

### **4.2.1. Conditions opératoires**

La stabilité d'une solution de RSNO ( $10^{-7}$  M) préparée dans une solution physiologique de Krebs à pH 7,4, oxygénée par bullage d'un mélange 95 %  $\text{O}_2$  et 5 %  $\text{CO}_2$  et placée dans des cuves d'organe isolées à 37 °C en l'absence de tissus, a été évaluée pendant 30 min. Les espèces dérivées du  $\cdot\text{NO}$  ont été quantifiées par la méthode spectrofluorimétrique décrite précédemment utilisant la sonde DAN.

#### 4.2.2. Résultats et discussion

Comme le montre la figure 10, après 15 min, la concentration en RSNO diminue d'environ  $3,25 \pm 0,05$  % en absence de vaisseaux, dans des conditions identiques à celles utilisées lors des études de vasorelaxation. Après 30 min, une dégradation de  $3,50 \pm 0,10$  % des RSNO est observée. Ces résultats ont permis de confirmer l'utilisation en toute sécurité des solutions de RSNO pendant les 15 premières min d'incubation (délai nécessaire pour atteindre le plateau de l'effet vasorelaxant des RSNO étudiés dans les conditions *ex vivo*).



**Figure 10** : Evolution de la concentration en GSNO (□), BUC(NO)<sub>2</sub> (■), SNAP (▒) et NACNO (■) ( $10^{-7}$  M) en fonction du temps d'incubation dans les conditions expérimentales des études de vasorelaxation (solution de Krebs pH 7,4, 37 °C et oxygénation (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>)) par la méthode spectrofluorimétrique (Hg<sup>2+</sup> + DAN) ( $\lambda_{\text{ex}} = 375$  nm ;  $\lambda_{\text{ém}} = 415$  nm) (n = 3).

**Tableau 5 :** Méthodes de dosage des RSNO et des espèces réactives dérivées de  $\cdot\text{NO}$  utilisées au cours des présents travaux.

Méthode	Analytes	Domaine de linéarité	LOD	LOQ
<b>Griess</b> 540 nm	$\text{NO}_2^-$ , $\text{NO}^+$	$10^{-6}$ à $10^{-5}$ M	$0,2 \cdot 10^{-6}$ M	$0,5 \cdot 10^{-6}$ M
<b>Saville-Griess (<math>\text{Hg}^{2+}</math>)</b> 540 nm	$\text{NO}_2^-$ , $\text{NO}^+$ (libre et provenant des RSNO)			
<b>DAN</b> Exc = 375 nm Em = 415 nm	$\text{NO}^+$	$5 \cdot 10^{-8}$ à $5 \cdot 10^{-7}$ M	$2,5 \cdot 10^{-8}$ M	$8 \cdot 10^{-8}$ M
<b>DAN + <math>\text{Hg}^{2+}</math></b> Exc = 375 nm Em = 415 nm	$\text{NO}^+$ (libre et provenant des RSNO)		$5 \cdot 10^{-8}$ M	$15 \cdot 10^{-8}$ M
<b>DAF-2</b> Exc = 485 nm Em = 538 nm	$\text{NO}^+$	$2,5 \cdot 10^{-8}$ à $25 \cdot 10^{-8}$ M	$1 \cdot 10^{-8}$ M	$3,04 \cdot 10^{-8}$ M
<b>DAF-2 DA</b> Exc = 485 nm Em = 538 nm	Permet de visualiser par microscopie de façon qualitative la production d'ions nitrite au niveau d'un tissu et de façon quantitative après extraction de la sonde transformée avec un solvant organique (diméthylsulfoxyde)			
<b>CLHP avec détection UV</b> 334 nm 220 nm	RSNO $\text{NO}_2^-$	$5 \cdot 10^{-4}$ à $5 \cdot 10^{-3}$ M $10^{-6}$ à $10^{-4}$ M	$5 \cdot 10^{-5}$ M $1 \cdot 10^{-6}$ M	$15 \cdot 10^{-5}$ M $3 \cdot 10^{-6}$ M

Abréviations : DAN : 2,3-diaminonaphtalène, DAF : diaminofluorescéine, DAF-2 DA : diaminofluorescéine diacétate, RSNO : *S*-nitrosothiols, LOD : limite de détection, LOQ : limite de quantification,  $\text{NO}_2^-$  : ions nitrite,  $\text{NO}_3^-$  : ions nitrate

### **4.3. Effet des cyclodextrines sur la stabilité des S-nitrosothiols et leur effet protecteur contre la dégradation enzymatique**

Les CD sont des oligosaccharides cycliques composés de sous-unités de glucopyranose liées en  $\alpha$ -(1,4). Trois familles sont principalement utilisées : les  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines formées respectivement de 6, 7 ou 8 sous-unités. Elles font l'objet de très nombreuses applications dans le domaine pharmaceutique (Szejtli, 2004) et l'une d'entre elles ( $\alpha$ -CD) a été récemment préconisée pour protéger le GSH contre sa dégradation catalytique par la GGT (Garcia-Fuentes *et al.*, 2006). Nous avons évalué l'impact de CD (i) sur la stabilité des RSNO et (ii) sur la protection des RSNO contre la dégradation enzymatique de la GGT et de la Trx-1 (protéine ayant le même site actif que la PDI).

#### **4.3.1. Conditions opératoires**

La stabilité d'une solution de RSNO (10 mM) préparée dans un tampon phosphate (10 mM) pH 7,4 a été évaluée à température ambiante ( $23 \pm 1$  °C), à l'abri de la lumière en présence ou en absence d' $\alpha$ -CD ou d'hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) (32 mM) après 28 h d'incubation. Les résultats sont donnés en pourcentage de RSNO restant mesuré par absorbance à 334 nm pour la NACNO, le GSNO et la BUC(NO)<sub>2</sub>, et à 340 nm pour le SNAP.

L'influence de l' $\alpha$ -CD ou HP- $\beta$ -CD sur la protection de GSNO (1 mM) contre la dégradation par la GGT purifiée de rein de bœuf (0,4  $\mu$ g/mL) a été évaluée *in vitro* en mesurant la consommation de GSNO selon le protocole précédemment décrit par Angeli *et al.* (2009) mais en présence ou en absence d'  $\alpha$ -CD ou HP- $\beta$ -CD (32 mM).

L'impact de la CD sur la protection des RSNO (5  $\mu$ M) contre la dégradation par la Trx-1 de *E. Coli* (1  $\mu$ M) a été déterminé en mesurant la diminution de l'intensité de fluorescence émise par la Trx-1 selon le protocole appliqué à la BUC(NO)<sub>2</sub> décrit dans l'article 3 mais en présence d' $\alpha$ -CD ou de HP- $\beta$ -CD (160 mM) à température ambiante ( $23 \pm 1$  °C). La Trx-1 est une protéine contenant un résidu tryptophane (Trp31-Cys32-Gly33-Pro34-Cys35) qui confère des propriétés de fluorescence à la protéine. La Trx-1 catalyse la réaction de dénitrosation des RSNO aboutissant à la libération de \*NO et à la formation de Trx-1 oxydée, forme n'étant pas dotée de fluorescence intrinsèque.

### 4.3.2. Résultats et discussion

Deux CD ont été testées pour leur capacité à former des complexes avec les RSNO : l' $\alpha$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD ; seule l' $\alpha$ -CD a permis de mesurer une constante de complexation avec le GSNO (technique utilisée : électrophorèse capillaire de zone ; travaux réalisés dans le cadre du master de Joanna Krawczyk, et intitulés : « *S*-nitrosothiols and cyclodextrins inclusion complexes: characterization, chemical stabilization and protection against degradation enzymes »). Pour les autres RSNO, l'emploi d'HP- $\beta$ -CD est apparu la plus appropriée à la formation de complexes (tableau 6). Chacune de ces CD sera utilisée avec le RSNO correspondant dans les études ultérieures de stabilité et d'interaction avec les enzymes.

**Tableau 6** : Détermination de la constante de complexation entre cyclodextrines et *S*-nitrosothiols.

<b>S-nitrosothiol</b>	<b>GSNO</b>	<b>NACNO</b>	<b>SNAP</b>	<b>BUC(NO)<sub>2</sub></b>
<b>CD</b>	$\alpha$ -CD	HP- $\beta$ -CD	HP- $\beta$ -CD	HP- $\beta$ -CD
<b>K<sub>c</sub> (M<sup>-1</sup>)</b>	28	27	24	77

La constante de complexation a été calculée selon l'équation suivante (Al Azzam *et al.*, 2010) :

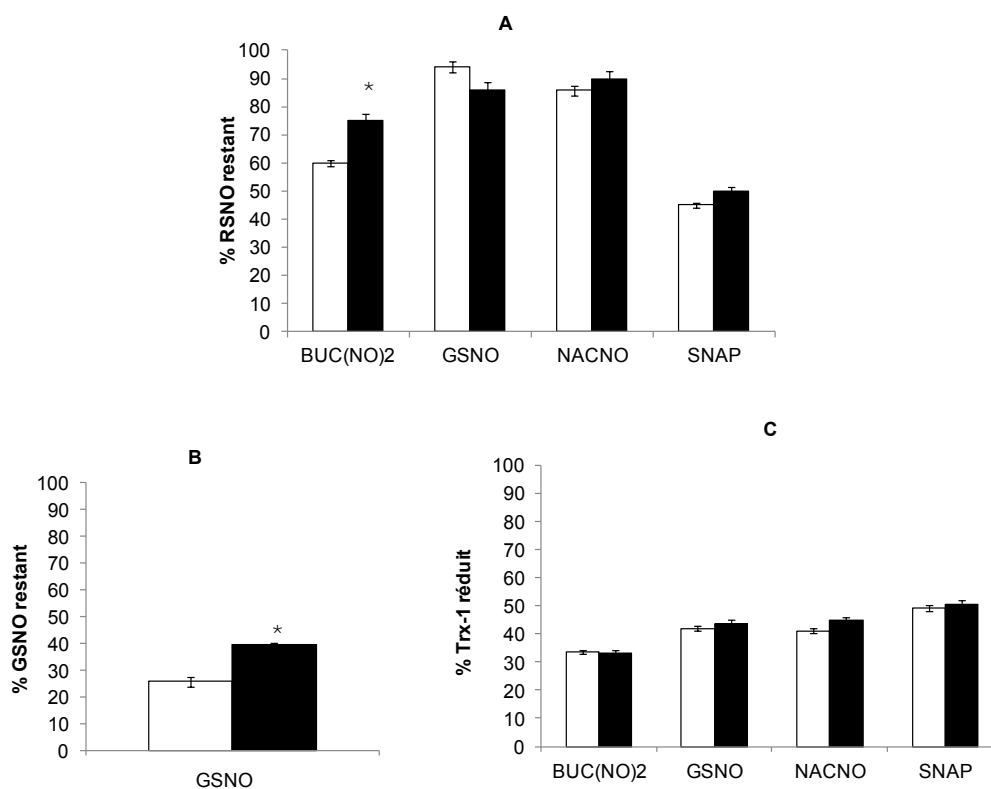
$$K_c \times [C] = \frac{\mu_{\text{libre}} - \mu_i}{\mu_i - \mu_c}$$

- $\mu^{\text{libre}}$  = mobilité électrophorétique du RSNO libre (sans ajout de CD dans le tampon de migration)
- $\mu^c$  = mobilité électrophorétique du RSNO totalement complexé (en présence d'une concentration de CD ( $C_{\text{max}}$ ) pour laquelle la mobilité du RSNO atteint un minimum)
- $\mu^i$  = mobilité de l'analyte à une concentration de CD ajoutée au tampon de migration égale à une valeur  $C_i$  comprise entre 0 et  $C_{\text{max}}$ .



En effet, la présence d' $\alpha$ -CD n'a pas d'influence sur la stabilité *in vitro* de NACNO, GSNO, SNAP et BUC(NO)<sub>2</sub>. Cependant, en présence de HP- $\beta$ -CD, comme le montre la figure 11 A, une augmentation significative de  $25 \pm 2$  % de la concentration BUC(NO)<sub>2</sub> a été observée. Ces résultats sont en concordance avec les mesures de constantes de complexation réalisées dans notre laboratoire montrant qu'il existe une plus forte affinité entre la BUC(NO)<sub>2</sub> et une CD, la HP- $\beta$ -CD, ( $K_c = 77 \text{ M}^{-1}$ ) par rapport aux autres RSNO (tableau 6). Ces résultats sont importants surtout si nous prenons en considération le fait que la BUC(NO)<sub>2</sub> n'existe qu'en solution/ou en produit huileux pour le moment ; le complexe formé entre BUC(NO)<sub>2</sub> et CD pourrait être utile pour obtenir la BUC(NO)<sub>2</sub> à l'état solide. En effet, les CD permettent d'isoler de nombreux composés en solution en solides par précipitation des complexes d'inclusion correspondants. Cette étape reste à valider expérimentalement.

Par ailleurs, la présence de HP- $\beta$ -CD n'a pas d'influence sur la protection du GSNO contre sa dégradation par la GGT et seulement une protection significative de  $50 \pm 3$  % du GSNO contre l'action de la GGT en présence d' $\alpha$ -CD est obtenue (figure 11 B). Etant donné que la GGT catalyse spécifiquement la coupure de molécules contenant un groupement  $\gamma$ -glutamyle, nous n'avons pas examiné le rôle de la CD sur la protection des autres RSNO. Enfin, aucune protection des RSNO contre l'action de la Trx n'a été observée avec les deux types de CD :  $\alpha$ -CD et HP- $\beta$ -CD (figure 11 C).



**Figure 11** : A) Etude de stabilité des RSNO (10 mM) en absence (□) et en présence (■) de HP-β-CD (36 mM) dans un tampon phosphate (10 mM) pH 7,4 à  $23 \pm 1$  °C après 28 h d'incubation. B) Interaction entre GSNO (1 mM) et GGT de rein de bœuf (0,4 μg/mL) en absence (□) et en présence (■) d'α-CD (36 mM) dans un tampon Tris (10 mM) pH 7,4 contenant de la glycylglycine (20 mM) et de  $\text{Cu}^{2+}$  (10 μM) à 37 °C après 2 h d'incubation. C) Interaction entre Trx-1 (1 μM) et RSNO (5 μM) en absence (□) et en présence (■) de HP-β-CD (160 mM) dans un tampon Tris (10 mM) pH 7,4 à  $23 \pm 1$  °C après 2 h d'incubation. (n = 3, \*p < 0,05).

**Chapitre III.**

**Evaluations biochimique et  
pharmacologique des *S*-nitrosothiols :  
rôle des enzymes dans les effets  
vasculaires**

## 1. Introduction

Après la synthèse, la caractérisation physico-chimique et l'étude de stabilité des RSNO, des études biochimique et pharmacologique ont été mises en place. L'objectif est d'étudier l'effet vasorelaxant des RSNO ainsi que l'implication de deux enzymes, la GGT et la PDI, dans leurs effets vasculaires. Le rôle de ces deux enzymes a été évalué en adoptant la stratégie suivante :

- 1- étude *in vitro* de l'interaction des deux enzymes purifiées, GGT et PDI, avec le GSNO et la BUC(NO)<sub>2</sub>,
- 2- mesure des activités enzymatiques de la GGT et de la PDI au niveau vasculaire,
- 3- relation entre la libération de \*NO à partir des RSNO *via* l'action catalytique des deux enzymes et les effets vasorelaxants induits par les RSNO.

En ce qui concerne le GSNO, nous avons montré que :

- 1- la GGT et la PDI purifiées dénitrosent le GSNO avec une production simultanée de \*NO.
- 2- l'activité de la GGT mesurée dans l'homogénat à l'aide d'un substrat communément utilisé dans la littérature, le *L*- $\gamma$ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide (Orlowski et Meister, 1963) mais également à l'aide de deux substrats naturels, le GSH et le GSNO, est diminuée en présence de SBC (entre 57 et 85 %) et augmentée en présence de glycyglycine (entre 24 et 108 %). Par ailleurs, l'évaluation histochimique de l'activité GGT a permis de localiser cette activité dans la couche endothéliale des vaisseaux.

Concernant la PDI, des essais ont été réalisés pour mesurer son activité au niveau vasculaire en utilisant l'insuline comme substrat. Cependant, cette technique n'a pas permis de mettre en évidence une activité dans les tissus aortiques et des techniques plus sensibles sont actuellement en cours de développement dans le laboratoire (*cf.* résultats complémentaires).

- 3- le GSNO induit une relaxation rapide ( $CE_{50} = 3,2 \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  M) en mettant en jeu la voie GCs/GMPc. L'implication de cette voie a été évaluée en présence de l'inhibiteur de la GCs, le 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ).

- 4- la dénitrosation du GSNO au niveau vasculaire est catalysée par la GGT mais également par la PDI. En effet, la  $CE_{50}$  du GSNO augmente en présence de deux inhibiteurs distincts de la GGT, la SBC ( $CE_{50} = 1,6 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$  M) et l'acivicine ( $CE_{50} = 8,3 \pm 0,6 \cdot 10^{-7}$  M), tandis qu'elle diminue en présence de l'activateur, la glycyglycine ( $CE_{50} = 4,7 \pm 0,9 \cdot 10^{-8}$  M). Quant à la PDI, son inhibition par la bacitracine entraîne une augmentation de la  $CE_{50}$  du GSNO ( $CE_{50} = 8,5 \pm 0,2 \cdot 10^{-7}$  M).

De plus, nous avons mis en évidence le rôle clé de l'endothélium dans les effets vasorelaxants du GSNO. En effet, en absence d'endothélium, la valeur de CE50 du GSNO est significativement augmentée ( $CE50 = 2,3 \pm 0,3 \cdot 10^{-6}$  M) par rapport à celle obtenue en présence d'endothélium ( $CE50 = 3,2 \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  M). Par ailleurs, la CE50 du GSNO obtenue en absence d'endothélium est similaire à celle induite par le GSNO après inhibition de la GGT par la SBC ( $CE50 = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$  M). Ces observations confirment le rôle important de la GGT endothéliale dans la vasorelaxation induite par le GSNO et elles sont en accord avec les résultats histologiques qui ont montré que l'activité de la GGT était principalement localisée au niveau de l'endothélium. Au meilleur de notre connaissance, une seule étude avait précédemment montré l'implication de la GGT dans la vasorelaxation rapide induite par le GSNO (Heikal *et al.*, 2011), mais le rôle spécifique de l'endothélium n'avait pas été évalué, d'où l'originalité de notre étude. Cette étude originale du rôle de la GGT dans les effets vasorelaxants du GSNO a fait l'objet d'un manuscrit publié dans *PlosOne* (article 4).

**2. Article 4.** F. Dahboul, P. Leroy, K. M. Gate, A. Boudier, C. Gaucher, P. Liminana, I. Lartaud, A. Pompella, C. Perrin-Sarrado. Endothelial  $\gamma$ -Glutamyltransferase Contributes to the Vasorelaxant Effect of *S*-Nitrosoglutathione in Rat Aorta. *PLoS One* 2012;7(9):e43190.

Les résultats concernant la détermination de l'activité de la PDI, son impact dans le métabolisme du GSNO et dans ses effets vasculaires sont présentés après cet article, en tant que résultats complémentaires.

Comme nous l'avons présenté précédemment dans l'**article 3** pages 90-127, notre étude pharmacologique a également décrit les effets vasculaires de la BUC(NO)<sub>2</sub>, un nouveau dinitrosothiol jamais décrit dans la littérature, ainsi que le rôle de la PDI dans ses effets. Nous avons montré que :

1- la PDI purifiée dénitrose la BUC(NO)<sub>2</sub> avec une production simultanée de  $\cdot$ NO. Etant donné que la GGT catalyse spécifiquement la coupure de molécules contenant un groupement  $\gamma$ -glutamyle, nous n'avons pas étudié son interaction avec la BUC(NO)<sub>2</sub> qui ne comporte pas ce groupement.

2- la BUC(NO)<sub>2</sub> est capable de libérer  $\cdot$ NO au niveau de l'aorte de rat ( $[\cdot$ NO] =  $649,1 \pm 14,4 \cdot 10^{-6}$  M) et d'induire une vasorelaxation concentration-dépendante ( $CE50 = 2,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-8}$  M) mettant en jeu la voie GCs/GMPc. La présence d'ODQ dans le

milieu d'incubation provoque une inhibition de la CE50 de la BUC(NO)<sub>2</sub> (CE50 = 1,4 ± 0,1.10<sup>-5</sup> M).

3- la BUC(NO)<sub>2</sub> induit une libération du <sup>\*</sup>NO au niveau vasculaire et une vasorelaxation plus importante que la NACNO (CE50 = 3,1 ± 0,5.10<sup>-7</sup> M) et le SNAP (CE50 = 3,8 ± 0,2.10<sup>-7</sup> M) seuls, mais également que le mélange équimolaire de SNAP plus NACNO (CE50 = 2,9 ± 0,3. 10<sup>-7</sup> M).

4- la PDI participe à l'effet vasorelaxant de la BUC(NO)<sub>2</sub> (CE50 = 2,3 ± 0,1.10<sup>-7</sup> M en présence d'un inhibiteur de la PDI, la bacitracine). De manière intéressante, en présence de la bacitracine, les effets vasorelaxants du mélange et ceux des mononitrosothiols seuls n'ont pas été modifiés. Ces résultats suggèrent que la présence de structures proches de la NACNO et du SNAP au sein d'une même molécule permettrait de modifier les propriétés pharmacologiques du produit et que la PDI vasculaire interagit préférentiellement avec BUC(NO)<sub>2</sub>.

# Endothelial $\gamma$ -Glutamyltransferase Contributes to the Vasorelaxant Effect of *S*-Nitrosoglutathione in Rat Aorta

Fatima Dahboul, Pierre Leroy, Katy Maguin Gate<sup>1a</sup>, Ariane Boudier, Caroline Gaucher, Patrick Liminana, Isabelle Lartaud, Alfonso Pompella<sup>2b</sup>, Caroline Perrin-Sarrado\*

EA3452 CITHEFOR "Drug targets, formulation and preclinical assessment", Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, Nancy, France

## Abstract

*S*-nitrosoglutathione (GSNO) involved in storage and transport of nitric oxide ( $\text{NO}$ ) plays an important role in vascular homeostasis. Breakdown of GSNO can be catalyzed by  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT). We investigated whether vascular GGT influences the vasorelaxant effect of GSNO in isolated rat aorta. Histochemical localization of GGT and measurement of its activity were performed by using chromogenic substrates in sections and in aorta homogenates, respectively. The role of GGT in GSNO metabolism was evaluated by measuring GSNO consumption rate (absorbance decay at 334 nm),  $\text{NO}$  release was visualized and quantified with the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein diacetate. The vasorelaxant effect of GSNO was assayed using isolated rat aortic rings (in the presence or absence of endothelium). The role of GGT was assessed by stimulating enzyme activity with cosubstrate glycylglycine, as well as using two independent inhibitors, competitive serine borate complex and non-competitive acivicin. Specific GGT activity was histochemically localized in the endothelium. Consumption of GSNO and release of free  $\text{NO}$  decreased and increased in presence of serine borate complex and glycylglycine, respectively. In vasorelaxation experiments with endothelium-intact aorta, the half maximal effective concentration of GSNO ( $\text{EC}_{50} = 3.2 \pm 0.5 \cdot 10^{-7}$  M) increased in the presence of the two distinct GGT inhibitors, serine borate complex ( $1.6 \pm 0.2 \cdot 10^{-6}$  M) and acivicin ( $8.3 \pm 0.6 \cdot 10^{-7}$  M), while it decreased with glycylglycine ( $4.7 \pm 0.9 \cdot 10^{-8}$  M). In endothelium-denuded aorta,  $\text{EC}_{50}$  for GSNO alone increased to  $2.3 \pm 0.3 \cdot 10^{-6}$  M, with no change in the presence of serine borate complex. These data demonstrate the important role of endothelial GGT activity in mediating the vasorelaxant effect of GSNO in rat aorta under physiological conditions. Because therapeutic treatments based on GSNO are presently under development, this endothelium-dependent mechanism involved in the vascular effects of GSNO should be taken into account in a pharmacological perspective.

**Citation:** Dahboul F, Leroy P, Maguin Gate K, Boudier A, Gaucher C, et al. (2012) Endothelial  $\gamma$ -Glutamyltransferase Contributes to the Vasorelaxant Effect of *S*-Nitrosoglutathione in Rat Aorta. PLoS ONE 7(9): e43190. doi:10.1371/journal.pone.0043190

**Editor:** Michael Bader, Max-Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC), Germany

**Received:** June 11, 2012; **Accepted:** July 20, 2012; **Published:** September 11, 2012

**Copyright:** © 2012 Dahboul et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The work was funded by the National Agency for Research (ANR, NanoSNO project), the French Ministry of Education, Research and Technology (Paris, France, EA3452) and Université de Lorraine (Nancy, France) (project UHP\_2010\_BMS\_EA 3452\_0047). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: Caroline.Perrin-Sarrado@univ-lorraine.fr

<sup>1a</sup> Current address: EA 3185 Fonctions et Dysfonctions Epithéliales, Université de Franche-Comté, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, Besançon, France

<sup>2b</sup> Current address: Department of Experimental Pathology, University of Pisa Medical School, Pisa, Italy

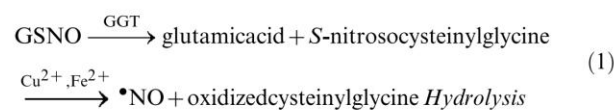
## Introduction

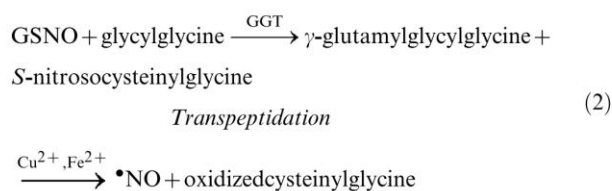
Nitric oxide ( $\text{NO}$ ) is involved in several vascular functions, including smooth muscle cells relaxation and proliferation, platelet aggregation and leucocyte interaction with endothelium [1,2]. In the vessel wall,  $\text{NO}$  released from endothelial cells diffuses to the smooth muscle cells layer and activates soluble guanylate cyclase to produce cyclic guanosine monophosphate, which in turn mediates smooth muscle cells relaxation [3]. Nitric oxide is highly reactive and has a short half life *in vivo*, estimated at a fraction of second.

*S*-nitrosoglutathione (GSNO) is an endogenous low molecular weight *S*-nitrosothiol, formed by nitrosation of reduced glutathione (GSH). *S*-nitrosoglutathione is involved in storage and transport of  $\text{NO}$ , exhibits higher stability than  $\text{NO}$ , mediates protein *S*-nitrosation processes and is thought to play an important role in vascular signaling [4]. The biological activity of GSNO and particularly its vasorelaxant effect have been reported in *ex vivo*

isolated vessel model [5,6], and are directly linked to its decomposition resulting in the release of  $\text{NO}$ .

*S*-nitrosothiols are quite stable *in vitro* at 37°C and pH 7.4 [7] but they are degraded *in vivo*, especially by enzymatic activities. One of them, the  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT; EC 2.3.2.2.) involved in the metabolism of GSH [8] has also been shown to metabolize GSNO [9,10]. *S*-nitrosoglutathione is labile in the reducing environment of cytosol, on the other hand in the extracellular space  $\gamma$ -glutamyltransferase specifically catalyzes its breakdown releasing its  $\gamma$ -glutamyl residue through a hydrolytic pathway (1), and transferring this residue to an acceptor such as glycylglycine, in a transpeptidation reaction (2):





The presence of glycylglycine, added to serve as co-substrate for transpeptidation reaction [9], accelerates the decomposition rate of GSNO, thus producing S-nitrosocysteinylglycine more quickly. This latter being less stable than GSNO, it is rapidly decomposed in the presence of divalent metallic ions such as Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>, leading to the release of  $\cdot\text{NO}$  and oxidized cysteinylglycine [9]. On the other hand, S-nitrosocysteinylglycine is itself provided with vasorelaxant activity, and the same is true for its metabolite S-nitroso-L-cysteine, produced by action of dipeptidases.

$\gamma$ -Glutamyltransferase is highly expressed in endothelial cells [11] and therefore bioactivity of GSNO on the vessel wall might be affected by endothelial GGT activity.

To verify this hypothesis, we first measured the GGT activity in rat aorta and evaluated its role in the ability of GSNO to release  $\cdot\text{NO}$ . Then, we determined the role of GGT in the vasorelaxant effect of GSNO, using the *ex vivo* model of isolated rat aortic rings with or without endothelium. Involvement of soluble guanylate cyclase in the relaxation induced by GSNO was also evaluated using ODQ as a specific inhibitor. In each experiment, the role of GGT was assessed by stimulating GGT activity with the exogenous  $\gamma$ -glutamyl acceptor glycylglycine, as well as by inhibiting it with competitive reversible inhibitor serine borate complex (SBC) [12,13]. Non-competitive irreversible inhibitor acivicin was also employed in selected experiments [12,13].

## Materials and Methods

### Chemicals and standards

All reagents were of analytical grade. 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2) and 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA) were obtained from Interchim (Montluçon, France). Acivicin, acetylcholine, L-N<sup>G</sup>-nitroarginine methyl ester (L-NAME), 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) and all other reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Ultrapure deionized water (>18.2 M $\Omega$ .cm) was used to prepare all solutions. Standard solutions of GSNO were prepared according to the method previously described [14]. The purity of GSNO was assessed by UV spectrophotometry using its molar absorbance at 334 nm ( $\epsilon = 922 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### Ethics Statement

All experiments were performed in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals, the respect of the 3 Rs' requirements for Animal Welfare (C. Perrin-Sarrado permit number n°54-72, French Ministry of Agriculture, Paris, France; protocols used in this study were described and approved by this permit).

### Preparation of aortic rings

Nine-week-old, male, normotensive, outbred Wistar rats (Janvier Laboratories, Le Genest St Isle, France; 480±32 g) were kept under standard conditions (temperature: 21±1°C, hygrometry 60±10%, lights on 6 am to 6 pm). Animals had free access to standard diet (A04, Safe, Villetta-sur-Orge, France) and

water (reverse osmosis system, Culligan, Brussels, Belgium). After anesthesia (sodium pentobarbitone 60 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p., Sanofi Sante Nutrition Animale, Libourne, France) and intravenous administration of heparin (500 units, heparine Choay), rats were sacrificed by exsanguination. A segment (3 cm) of the descending thoracic aorta was removed and immediately placed in ice-cold Krebs' solution containing 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.5 mM glucose, adjusted to pH 7.4. Vessels were cleaned from surrounding connective tissues, cut in 5-mm long rings (4 rings per rat) and immediately used for vasoactivity studies. In some rings, the endothelium was removed by gently rubbing the intimal surface with forceps.

Some samples of aortic rings were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent biochemical studies. Additional samples were embedded in freezing medium (Tissue-Tek), frozen in liquid nitrogen and conserved at -20°C for histological/histochemical studies.

### Measurement of muscle tension

Aortic vasoactivity was measured as previously described [15,16], isometric force transducer 0–10 g, Fort 10, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). The bath was filled with Krebs' solution (1.5 mL, 37°C) and continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Following 60-min equilibration with a basal resting tension determined at 2 grams as giving the maximal response to  $\alpha$ -adrenergic stimulation, rings were exposed 3 times to KCl (60 mM, 5 min, rings with a response lower than 4.5±0.5 g were discarded). Aortic rings (n = 6–12 per group, from 3–8 different rats in each group) were then precontracted with 1  $\mu\text{M}$  phenylephrine. At the plateau of contraction, concentration-relaxation response curves to increasing concentrations of GSNO (0.001–10  $\mu\text{M}$ ) were performed. Endothelium integrity or removal was assessed by en face silver nitrate staining [17] and relaxation to 10  $\mu\text{M}$  carbachol, with aortic rings showing less than 17±1% relaxation considered as endothelium-denuded [18].

The role of GGT in the vasorelaxant effect of GSNO was evaluated by comparing concentration-response curves in the absence and in the presence of either glycylglycine (20 mM, throughout the incubation with the different concentrations of GSNO), either SBC (20 mM, added since the start of the 60-min equilibration period) or acivicin (50  $\mu\text{M}$ , added 60 min prior to relaxation experiments). Involvement of soluble guanylate cyclase in the relaxation induced by GSNO was evaluated using ODQ as a specific inhibitor (5  $\mu\text{M}$ , added since the start of the 60-min equilibration period) [18]. Concentration-relaxation response curves to increasing concentrations of acetylcholine (0.001–10  $\mu\text{M}$ ) in the absence and in the presence of either 20 mM glycylglycine or 20 mM SBC were also performed as controls in order to check that both GGT modulators did not affect the vasorelaxation induced by a non-S-nitrosothiols  $\cdot\text{NO}$  donor.

### GGT activity, GSH and GSNO consumption in aorta homogenate

Aortic rings were homogenized in Tris buffer (100 mM, pH 7.4, Ultraturax<sup>®</sup> homogenizer, IKA, LaborTechnik, T25) and incubated for 2 h at 37°C in Tris buffer added with 1 mM of the synthetic GGT substrate L- $\gamma$ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide (GCNA), GSH or GSNO. Where indicated, 20 mM glycylglycine or 20 mM SBC were added to the reaction medium. Every 20 min, 25  $\mu\text{L}$  of reaction medium was withdrawn and centrifuged at 42,000  $\times$  g for 10 min at 4°C. Supernatants were used to determine (i) GGT activity and consumption rate of (ii) GSH and (iii) GSNO as follows (n = 3 in each condition):



- (i) GGT activity was measured using GCNA according to Orlowski and Meister [19] in the presence of 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Supernatant absorbance was read at 405 nm to monitor the release of 5-amino-2-nitrobenzoate ( $\epsilon = 9500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) from GCNA;
- (ii) consumption rate of GSH in aorta homogenates was evaluated by measuring GSH concentration in supernatant at different times, using the fluorescence-based microtiter plate method previously described [20] based on the fluorescence intensity of the GSH-naphthalenedicarboxaldehyde adduct ( $\lambda_{\text{exc}} = 485 \pm 20 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 528 \pm 20 \text{ nm}$ , Synergy 2 model, Biotek Instruments, Colmar, France, calibration curve 0.65–3.25  $\mu\text{M}$ );
- (iii) consumption rate of GSNO was calculated from the monitoring of the breakdown of S-nitrosated moieties (S-NO) in supernatant at 334 nm.

Protein concentrations were measured using the bicinchoninic acid method (Pierce Protein Assay Kit) with bovine serum albumin as standard. GGT specific activities, GSH and GSNO consumption rates are expressed in nmol of either obtained product or consumed substrate per min per mg of protein.

#### Histochemical localization of GGT activity in aortic ring sections

Localization of enzymatically active GGT on tissue was performed with an azo-coupling reaction using  $\gamma$ -glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamide (GMNA) as synthetic GGT substrate and Fast Garnet GBC as the chromogen [20]. Frozen aortic rings were cut into 8- $\mu\text{m}$  thin sections (Cryostat Microm HM505E). Air-dried sections were incubated for 45 min at room temperature in freshly prepared reagent mixture containing 4 mM GMNA, 1 mM Fast Garnet GBC and 6 mM glycylglycine in PBS, pH 7.4, in the presence or absence of 20 mM SBC. Then slides were washed with tap water, air-dried and observed under light microscope with a 16 $\times$  magnification. Negative controls were performed in the absence of substrate.

#### Visualization and quantification of <sup>•</sup>NO production in aortic rings

Visualization and quantification of <sup>•</sup>NO production were operated using DAF-2 DA according to Rodriguez *et al.* with some modifications [21]. For <sup>•</sup>NO quantification experiments, after 1-h preloading with 10  $\mu\text{M}$  DAF-2 DA, aortic rings were rinsed then incubated for 15 min with 1 mM GSNO in the presence or absence of 20 mM SBC or 20 mM glycylglycine ( $n = 4-7$  in each condition). To confirm that released <sup>•</sup>NO was indeed deriving from added GSNO, control experiments were performed with eNOS inhibitor L-NAME, control incubations were performed in the presence of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) inhibitor, 300  $\mu\text{M}$  L-NAME [16], added 15 min before and throughout the 1-h DAF-2 DA preloading period. The subsequent nitrosated DAF-2 probe (DAF-2T) was extracted from the tissue using DMSO. Fluorescence intensity of diluted samples was read in a microplate reader (Biotek, USA,  $\lambda_{\text{exc}} = 485 \pm 20 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 528 \pm 20 \text{ nm}$ ). Concentrations were evaluated using a calibration curve (0.025–0.250  $\mu\text{M}$ ) built with NaNO<sub>2</sub> reacting with DAF-2.

For <sup>•</sup>NO visualization, aortic rings preloaded (2 h) with the fluorescent probe were cut into 10- $\mu\text{m}$  thick sections. Sections were then incubated (15 min, 37°C) with 1 mM GSNO in Krebs' solution, in the presence or absence of 20 mM SBC or 20 mM glycylglycine, mounted in suitable mounting medium (ProLong

Antifade Kit, Invitrogen) and immediately observed with an inverted fluorescence microscope (Nikon TI-PS,  $\lambda_{\text{exc}} = 480 \pm 20 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 527 \pm 15 \text{ nm}$ ). All images were captured under constant exposure time, gain and offset chosen to increase the threshold for fluorescence, thus attenuating background autofluorescence of elastin.

#### Other procedures

All manipulations and assays involving GSNO were performed under conditions of subdued light, in order to minimize light-induced GSNO degradation.

#### Data Analysis

The percentage of relaxation induced by GSNO (or carbachol) was calculated as:

$$\% \text{of relaxation} = \left[ \frac{\text{Tension(g)Phenylephrine} - \text{Tension(g)RSNOs}}{\text{Tension(g)Phenylephrine} - \text{Tension(g)BASELINE}} \right] \times 100.$$

Half maximal effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) was calculated using the logistic equation:

$$\% \text{relaxation} = \frac{E_{\text{min}} + ((E_{\text{max}} - E_{\text{min}}) / (1 + 10^{(\log \text{EC}_{50} - \log(\text{concentration})) \times \text{Hillslope}}))}{1}$$

where  $E_{\text{min}}$  and  $E_{\text{max}}$  = minimal and maximal response reached in each concentration-response curve. The value of Hill slope for all experiments was  $0.9 \pm 0.1$ . Then  $-\log \text{EC}_{50}$  values ( $\text{pD}_2$  values) were also calculated.

Results are expressed as means  $\pm$  standard error of mean (SEM). For vasorelaxation studies, significant differences between groups were determined by a two-way ANOVA test (variables: endothelium and modulators of GGT activity) followed by a post-hoc Bonferroni test. For other experiments, a one-way ANOVA test followed by a post-hoc Bonferroni test was performed. The null hypothesis was rejected at  $p < 0.05$ .

## Results

#### Quantification and localization of GGT activity in aortic rings

Using the chromogenic substrate GCNA, aorta homogenates showed specific GGT activity (Table 1) which was abolished in the presence of SBC (values under limit of detection) and increased in the presence of glycylglycine. Correspondingly, using GSH as endogenous substrate of GGT, we showed that GSH consumption rate increased by  $108 \pm 20\%$  and decreased by  $85 \pm 2\%$  in the presence of glycylglycine and SBC, respectively (Table 1).

GGT activity was histochemically detected in the endothelium (Figure 1A, pink to red staining) and some activity was also present in the layers neighboring the intima. Specificity was confirmed in endothelium-intact aortic rings incubated with SBC and in endothelium-denuded aortic rings, which both exhibited less intense staining (Figures 1B, 1C).

#### GSNO consumption rate and GGT-dependent <sup>•</sup>NO release from GSNO in aorta

GSNO consumption was observed in aorta homogenates ( $2.4 \pm 0.2 \text{ nmol/min/mg proteins}$ ) (Figure 2) and was enhanced

**Table 1.** Specific GGT activity and GSH consumption rate in rat aorta homogenates.

Conditions	GGT activity (nmol/min/mg proteins)	GSH consumption rate (nmol/min/mg proteins)
Control + glycylglycine	0.30±0.01*	1.13±0.06*
Control	0.12±0.01	0.55±0.02
Control + SBC	ND <sup>#</sup>	0.08±0.01*

Specific activity of  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) and consumption rate of GSH measured in rat aorta homogenates incubated in Tris buffer pH 7.4 with and without SBC (20 mM) or glycylglycine (20 mM). Data are means  $\pm$  S.E.M. of 3 experiments. (\* $p$ <0.05 versus Control; ND<sup>#</sup>: not detected – below limit of detection). doi:10.1371/journal.pone.0043190.t001

in the presence of glycylglycine by  $24\pm 4\%$ , and reduced by  $57\pm 3\%$  following the addition of SBC.

Incubation of aortic rings with GSNO was associated with the release of  $\bullet$ NO as quantified using the fluorescent probes DAF-2 DA. In the presence of SBC,  $\bullet$ NO release was decreased by 20 % and strongly increased after GGT stimulation by glycylglycine (+45 %) (Figure 3A). Correspondingly, in aortic ring sections, DAF-2 DA revealed  $\bullet$ NO release following addition of GSNO (Figure 3C). The effect was diminished in the presence of SBC (Figure 3D) and increased in the presence of glycylglycine (Figure 3B).

Control experiments were carried out in order to verify whether glycylglycine or SBC might directly interact with GSNO and produce  $\bullet$ NO release. GSNO (1 mM) was incubated in 100 mM Tris buffer (pH 7.4, 37°C), alone or in the presence of glycylglycine (20 mM) or SBC (20 mM). No differences were appreciable in GSNO consumption in the three conditions studied during 2 h incubation time, as determined spectrophotometrically at 334 nm (*data not shown*).

Control experiments were also performed in order to verify the possibility that glycylglycine or SBC might directly interact with DAF-2 DA or affect tissue autofluorescence. Sections of aortic rings were thus incubated (15 min, 37°C) in Krebs solution in the presence of DAF-2DA without additions (control-basal) and after addition of SBC alone (control-SBC) or glycylglycine (control-glycylglycine). Sections were then analysed by microscopy, as well as fluorescence was extracted from tissue with DMSO and analysed spectrofluorimetrically. Basal fluorescence was indeed appreciable in aortic rings, which was however not modified after incubation with SBC or with glycylglycine (*data not shown*), suggesting that the two compounds did not modify tissue autofluorescence nor did

they exert effects on  $\bullet$ NO production independently of exogenously added GSNO.

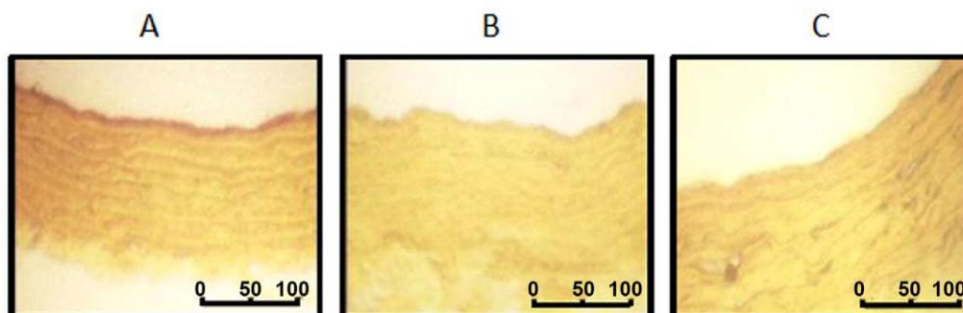
Finally, to confirm that released  $\bullet$ NO was indeed deriving from added GSNO, control experiments were performed with eNOS inhibitor L-NAME. Indeed, eNOS inhibition did not modify the amount of  $\bullet$ NO released following the addition of GSNO (Figure 3A). Thus confirming that eNOS was not involved in the described phenomena.

#### Vasorelaxant effects of RSNOs on isolated aortic rings

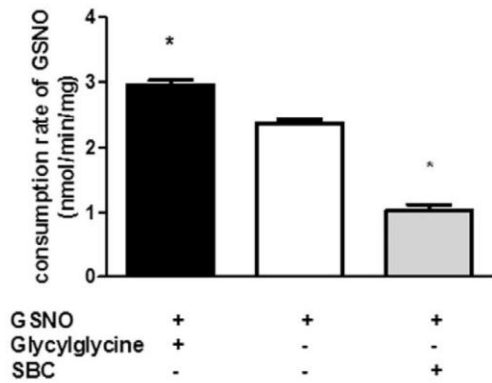
In endothelium-intact aortic rings precontracted with phenylephrine, GSNO induced a concentration-dependent relaxation (Figure 4A,  $EC_{50} = 3.2\pm 0.5 \cdot 10^{-7}$  M, pD<sub>2</sub> panel C). In the presence of glycylglycine, the curve was shifted to the left, with a 7 times lower  $EC_{50}$  value (pD<sub>2</sub> +1 log). On the opposite, in the presence of SBC or acivicin the curves were shifted to the right,  $EC_{50}$  was 5 or 3 times higher and pD<sub>2</sub> decreased by 0.7 log or 0.5 log, respectively.

To verify if glycylglycine or SBC might directly affect aortic ring contraction independently of GGT activity, control experiments were performed using non-SNO agonist acetylcholine. Neither compound did modify acetylcholine-induced vasorelaxation (*data not shown*). Experiments were also performed using guanylate cyclase inhibitor ODQ, which suppressed GSNO-induced vasorelaxation (Figure 4A) and confirmed that the observed effect was indeed mediated through production of cGMP.

In endothelium-denuded aortic rings, all GSNO concentration-response curves were shifted to the right in comparison to endothelium-intact rings (pD<sub>2</sub> -1 log), excepted with SBC which had no further effect (Figure 4B and panel C).



**Figure 1. Histochemical localization of GGT activity in rat aortic tissue.** Typical micrographs ( $\times 16$ ) corresponding to histochemical visualization of  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) activity in endothelium-intact rat aortic rings prepared in the presence of  $\gamma$ -glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamide (GMNA, panel A) or in the presence of GMNA and SBC (20 mM, panel B) and in endothelium-denuded aortic rings prepared in the presence of GMNA (panel C). Scale bar, 100  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0043190.g001



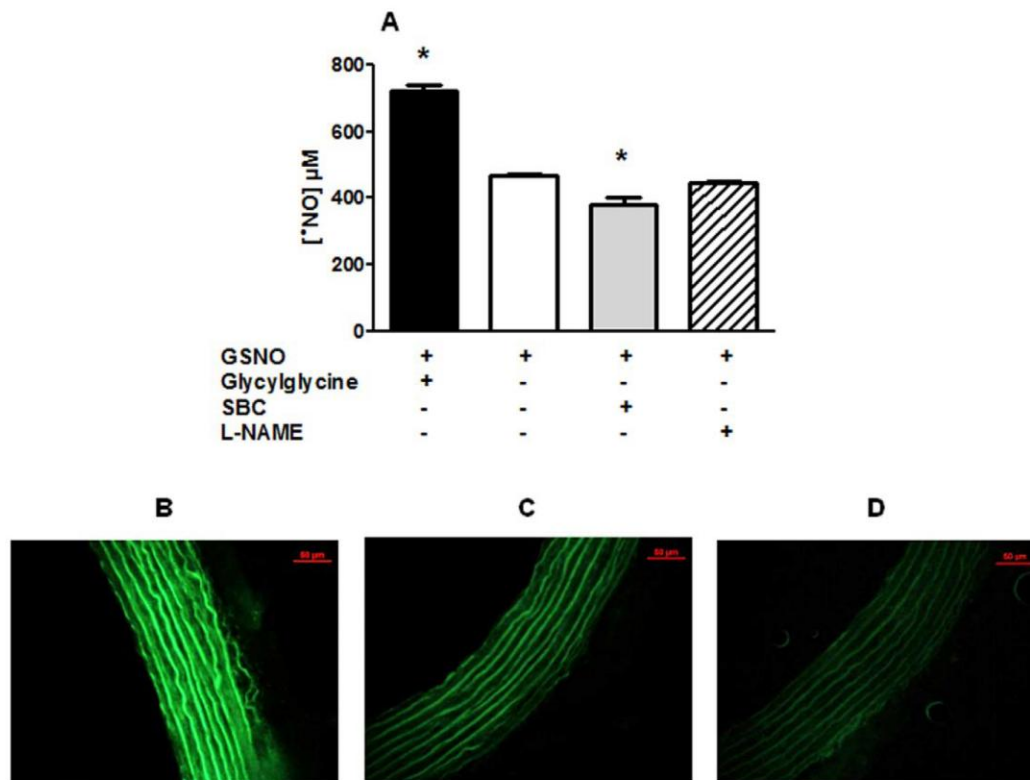
**Figure 2. Effects of modulation of GGT activity on GSNO consumption in rat aorta homogenates.** Consumption rates of GSNO measured in rat aorta homogenates incubated in Tris buffer pH 7.4 with and without SBC (20 mM) or glycylglycine (20 mM). Data are means  $\pm$  SEM of 3 experiments, \*  $p < 0.05$  versus substrate alone. doi:10.1371/journal.pone.0043190.g002

**Discussion**

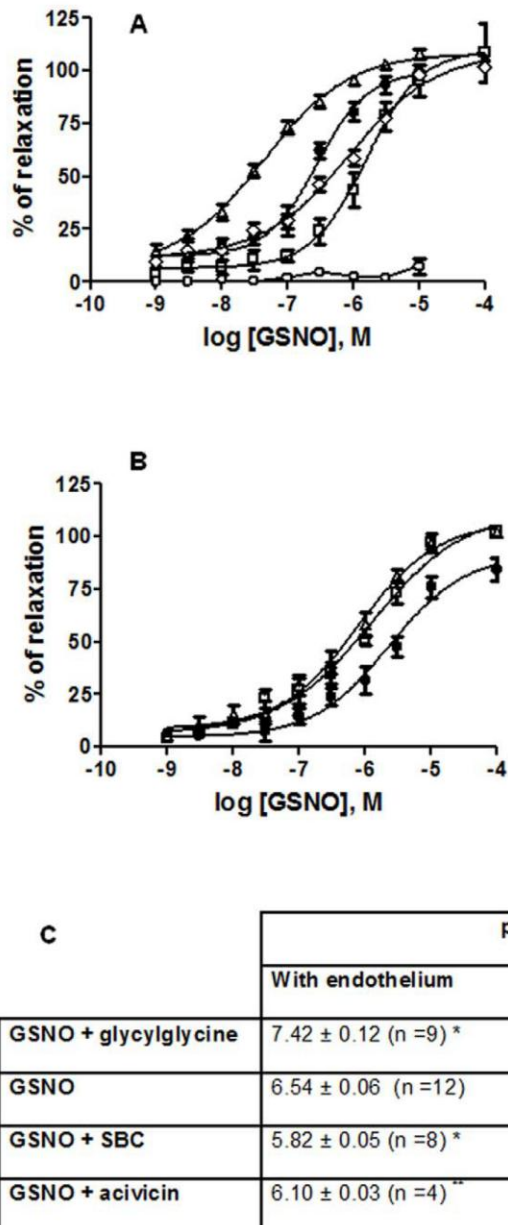
The aim of this study was to investigate the role of the endothelial GGT on the metabolism and vasorelaxant effect of GSNO on aorta in physiological conditions. We showed that

GGT activity is present in endothelial cells, is involved in the metabolism of GSNO and in the subsequent release of •NO. This led to the vasorelaxant effect of GSNO which was improved in the presence of endothelium. The GGT activity thus plays a pivotal role in the endothelium-dependent vasorelaxant properties of GSNO.

Previous studies *in vitro* have biochemically characterized the metabolism of GSNO by GGT, showing that the affinity of GGT for this substrate is comparable to that of GSH [22]. However, few data are available about the importance of GGT activity in the bioactivity of GSNO in vascular tissue. In the present study, GGT activity was mainly localized in the endothelial layer as previously described [11]. This activity, measured in rat aorta homogenates using the specific chromogenic substrate GCNA, was comparable to values previously measured in human mammary artery tissue [23]. The specificity of the reaction was confirmed with SBC, a specific reversible GGT inhibitor, as well as with non-competitive inhibitor acivicin, and with glycylglycine, an acceptor of  $\gamma$ -glutamyl residue used for stimulation of GGT activity [24]. The 20 mM concentration of SBC was chosen on the basis of our previous work where it decreased more than 95% of GGT activity in cerebral microvessels, a tissue with rich GGT activity [20]. Twenty millimolar of glycylglycine was previously shown to accelerate GGT-dependent GSNO decomposition in rat kidney homogenates [10].



**Figure 3. Effects of modulation of GGT activity on GSNO-mediated •NO production in aortic tissue.** Panel A: •NO production from rat aortic rings exposed to GSNO (1 mM) or GSNO (1 mM) in the presence of SBC (20 mM), glycylglycine (20 mM) or L-NAME (300  $\mu$ M). Data are means  $\pm$  SEM of 4–7 experiments, \*  $p < 0.05$  versus GSNO. Panels B, C, D: representative fluorescence micrographs ( $\times 20$ ) of 10- $\mu$ m sections of rat aortic rings loaded for 2 h with 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA, 10  $\mu$ M) showing •NO production following 15-min incubation with GSNO (1 mM, panel C) or GSNO in the presence of SBC (20 mM, panel D) or glycylglycine (20 mM, panel B). Scale bar, 50  $\mu$ m. All pictures were captured under constant exposure time, gain and offset. doi:10.1371/journal.pone.0043190.g003



**Figure 4. Influence of GGT activity on the vasorelaxant effect of GSNO.** Concentration-dependent vasorelaxation response curves of GSNO (●), GSNO with glycylglycine (20 mM) (Δ), GSNO with acivicin (50 μM) (◇), GSNO with SBC (20 mM) (□), and GSNO with ODQ (5 μM) (○) in endothelium-intact (panel A) and endothelium-denuded (panel B) aortic rings. Panel C: pD2 values (panel C). Data are means ± SEM of 4–12 aortic rings per group. p values (2 ways ANOVA test):  $p_{\text{interaction}} < 0.0001$ ;  $p_{\text{endothelium}} < 0.0001$ ;  $p_{\text{modulator of GGT}} < 0.0001$ . \*  $p < 0.05$  versus GSNO endothelium-intact; \$  $p < 0.05$  versus GSNO endothelium-denuded (post-hoc Bonferroni test). \*\*  $p < 0.05$  versus GSNO in endothelium-intact aortic rings (one way ANOVA test). doi:10.1371/journal.pone.0043190.g004

GGT activity was also evaluated with its endogenous substrate GSH, in the same conditions than with the synthetic substrate GCNA. As expected, SBC significantly decreased the consumption rate of GSH, whereas addition of glycylglycine strongly increased it.

The subsequent observations that SBC decreased and glycylglycine accelerated GSNO decomposition strongly indicate that GGT is responsible for GSNO breakdown in aorta homogenates. Moreover, GSNO induced the  $\text{NO}$  release, which was quantified

and histochemically visualized in aorta with the fluorescent probe DAF-2 (Figure 3). This  $\text{NO}$  production was reduced in the presence of SBC and enhanced in the presence of glycylglycine. Altogether, our results indicate that GSNO (i) is metabolized in rat aorta and (ii) its breakdown, and the subsequent release of  $\text{NO}$  depend on GGT activity.

Inhibition of GGT resulted in only partial inhibition of GSNO consumption (Figure 2) which suggests that other enzyme activities are involved in GSNO metabolism in the aorta. This is in

agreement with recent studies showing the role of other systems in *S*-nitrosothiols uptake and degradation [25], such as amino acid membrane transporters or protein disulfide isomerases [26], and thioredoxin [27], a protein with a redox active disulfide.

We demonstrate that GSNO induced a rapid and concentration-dependent relaxation in endothelium-intact precontracted aorta, in agreement with previously published studies [5,26,28,29]. As shown by results obtained with specific inhibitor ODQ, this effect can be explained with the rapid activation of soluble guanylate cyclase following NO release, resulting in the fast relaxation of vascular smooth muscle cells. Our interesting results, showing increased or decreased EC<sub>50</sub> of GSNO after inhibition or stimulation of GGT, respectively, strongly confirm the major role of GGT in the vasorelaxant effect of GSNO in the aorta. Moreover, removal of endothelium changed the impact on the vasorelaxant properties of GSNO. As expected, the effect of GSNO was decreased in the absence of endothelium (7-fold higher EC<sub>50</sub>). GSNO-induced vasorelaxation was similar in endothelium-intact/GGT inhibited (SBC) aortic rings and in endothelium-denuded aorta (pD<sub>2</sub> values not different between the two conditions). These observations further confirm the role of endothelial GGT in the vasorelaxation induced by GSNO.

In endothelium-denuded rings, addition of glycylglycine surprisingly increased the pD<sub>2</sub> value of GSNO. Removal of endothelium was mechanically performed and we cannot exclude that few endothelial cells and consequently some active GGT remained behind in some rings. The presence of transition metals (copper, iron) has been shown to catalyze the GGT-mediated release of NO from GSNO [9,10]. As no metals were exogenously added in our experimental systems, decomposition of RSNO was likely supported by metals present as contaminants in incubation media, as previously described in our laboratories [9].

To the best of our knowledge, only one study has previously investigated the implication of GGT in the rapid relaxation

induced by GSNO and other RSNO's such as *S*-nitrosophytochelatin in rat aortic rings [26], but the specific role of endothelium was not evaluated.

In conclusion, our results show for the first time that, in physiological conditions, the rapid vasorelaxant effects of GSNO are largely dependent on the presence of endothelium and are mediated through its GGT-dependent metabolism. This is an important observation that should be taken into account in a pathophysiological perspective, because elevated GGT activity has been associated with various pathologies such as cystic fibrosis [30], hypertension [31] and atherosclerosis [23], and because therapeutic treatments based on GSNO have already been proposed at the clinical level [32,33]. Future studies in animal models will help to clarify whether modulation of endothelial GGT activity can be used as a pharmacological tool in order to improve the effects of GSNO-based therapies.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Mélanie THOMAS and Anaïs DURET for their helpful contribution to experimental studies. The authors acknowledge the National Agency for Research (ANR, NanoSNO project), the French Ministry of Education, Research and Technology (Paris, France, EA3452), the Lorraine Regional Development Committee (Metz, France) (CPER 2007-13 PRST «Ingénierie Moléculaire et Thérapeutique – Santé », Pr. P. NETTER, axe « Molécules et Ciblage Thérapeutique », Dr. Y. CHAPLEUR), and Université de Lorraine (Nancy, France) (project UHP\_2010\_BMS\_EA 3452\_0047).

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FD IL KMG P. Leroy AP CPS. Performed the experiments: FD KMG P. Liminana. Analyzed the data: FD KMG AP CPS. Contributed reagents/materials/analysis tools: AB CG. Wrote the paper: FD IL AP CPS.

## References

- Ginnan R, Guikema BJ, Halligan KE, Singer HA, Jourdeuil D (2008) Regulation of smooth muscle by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases. *Free Radic Biol Med* 44: 1232–45.
- Krejcy K, Schmetterer L, Kastner J, Nieszpaar-Los M, Monitzer B, et al. (1995) Role of nitric oxide in hemostatic system activation in vivo in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 2063–7.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3203–7.
- Marozkina NV, Gaston B (2012) *S*-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1820: 722–9.
- Sogo N, Campanella C, Webb DJ, Megson IL (2000) *S*-nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: therapeutic potential in bypass surgery. *Br J Pharmacol* 131: 1236–44.
- Alencar JL, Lobysheva I, Chalupsky K, Giffard M, Nepveu F, et al. (2003) *S*-Nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 152–9.
- McAninly J, Williams DLH, Askew SC, Butler AR, Russell C (1993) Metal ion catalysis in nitrosothiol (RSNO) decomposition. *J Chem Soc, Chem Commun* 23: 1758–9.
- Griffith OW, Meister A (1979) Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5606–10.
- Angeli V, Tacito A, Paolicchi A, Barsacchi R, Franzini M, et al. (2009) A kinetic study of gamma-glutamyltransferase (GGT)-mediated *S*-nitrosoglutathione catabolism. *Arch Biochem Biophys* 481: 191–6.
- Hogg N, Singh RJ, Konorev E, Joseph J, Kalyanaraman B (1997) *S*-Nitrosoglutathione as a substrate for gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem J* 323: 477–81.
- Cotgreave IA, Schuppe-Koistinen I (1994) A role for gamma-glutamyl transpeptidase in the transport of cystine into human endothelial cells: relationship to intracellular glutathione. *Biochim Biophys Acta* 1222: 375–82.
- Tate SS, Meister A (1978) Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4806–09.
- Dominici S, Pieri L, Comperti M, Pompella A (2003) Possible role of membrane gamma-glutamyltransferase activity in the facilitation of transferrin-dependent and -independent iron uptake by cancer cells. *Cancer Cell Int* 3: 7.
- Hart TW (1985) Some observations concerning the *S*-nitroso and *S*-phenylsulphonyl derivatives of L-CysH and glutathione. *Tetrahedron Lett* 26: 2013–6.
- Lartaud I, Faure S, Tabellion A, Resende AC, Nadaud S, et al. (2007) Melatonin counteracts the loss of agonist-evoked contraction of aortic rings induced by incubation. *Fundam Clin Pharmacol* 21: 273–9.
- Resende AC, Tabellion A, Nadaud S, Lartaud I, Bagrel D, et al. (2004) Incubation of rat aortic rings produces a specific reduction in agonist-evoked contraction: effect of age of donor. *Life Sci* 76: 9–20.
- Tran NNP, Spitzbarth E, Robert A, Giummelly P, Atkinson J, et al. (1998) Nitric oxide lowers the calcium sensitivity of tension in the rat tail artery. *J Physiol* 507: 163–74.
- Wang C, Mansard A, Giummelly P, Atkinson J (2004) Decreased aortic smooth muscle contraction in a rat model of multibacterial sepsis. *Fundam Clin Pharmacol* 18: 679–83.
- Orlowski M, Meister A (1963) Gamma-glutamyl-p-nitroanilide: a new convenient substrate for determination and study of L- and D-gamma-glutamyltranspeptidase activities. *Biochim biophys acta* 73: 679–81.
- Maguin Gate K, Lartaud I, Giummelly P, Legrand R, Pompella A, et al. (2011) Accurate measurement of reduced glutathione in gamma-glutamyltransferase-rich brain microvessel fractions. *Brain Res* 1369: 95–102.
- Rodriguez J, Specian V, Maloney R, Jourdeuil D, Feilich M (2005) Performance of diamino fluorophores for the localization of sources and targets of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 38: 356–68.
- Bramanti E, Angeli V, Franzini M, Vecoli C, Baldassini R, et al. (2009) Exogenous vs. endogenous gamma-glutamyltransferase activity: Implications for the specific determination of *S*-nitrosoglutathione in biological samples. *Arch Biochem Biophys* 487: 146–52.
- Franzini M, Corti A, Martinelli B, Del Corso A, Emdin M, et al. (2009) Gamma-glutamyltransferase activity in human atherosclerotic plaques – Biochemical similarities with the circulating enzyme. *Atherosclerosis* 202: 119–27.

24. Huseby NE, Strömme JH (1974) Practical points regarding routine determination of gamma-glutamyl transferase (gamma-GT) in serum with a kinetic method at 37 degrees C. *Scand J Clin Lab Invest* 34: 357–63.
25. Gaucher C, Boudier A, Dahboul F, Parent M, Leroy P (2012) *S*-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of *S*-nitrosothiols. *Curr Pharm Des*. In press.
26. Heikal L, Aaronson PI, Ferro A, Nandi M, Martin GP, et al. (2011) *S*-nitrosophytochelutins: investigation of the bioactivity of an oligopeptide nitric oxide delivery system. *Biomacromolecules* 12: 2103–13.
27. Nikitovic D, Holmgren A (1996) *S*-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem*. 271: 19180–5.
28. Hanspal IS, Magid KS, Webb DJ, Megson IL (2002) The Effect of Oxidative Stress on Endothelium-Dependent and Nitric Oxide Donor-Induced Relaxation: Implications for Nitrate Tolerance. *Nitric Oxide-Biol Ch* 6: 263–70.
29. Xu A, Vita JA, Keaney JF Jr (2000) Ascorbic Acid and Glutathione Modulate the Biological Activity of *S*-Nitrosoglutathione. *Hypertension* 36: 291–5.
30. Corti A, Franzini M, Cianchetti S, Bergamini G, Lorenzini E, et al (2012) Contribution by polymorphonuclear granulocytes to elevated gamma-glutamyltransferase in cystic fibrosis sputum. *PLoS ONE* 7(4): e34772.
31. Pompella A, Emdin M, Passino C, Paolicchi A (2004) The significance of serum gamma-glutamyltransferase in cardiovascular diseases. *Clin Chem Lab Med* 42: 1085–91.
32. Snyder AH, McPherson ME, Hunt JF, Johnson M, Stamler JS, et al. (2002) Acute effects of aerosolized *S*-nitrosoglutathione in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 922–6.
33. Rassaf T, Poll LW, Brouzos P, Lauer T, Totzeck, et al. (2006) Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur Heart J* 27: 1699–705.

### 3. Résultats complémentaires du chapitre III

Dans cette section sont présentés les résultats complémentaires à ceux de l'article 4. L'objectif de ces travaux complémentaires est d'évaluer les interactions *in vitro* du GSNO avec la GGT purifiée ainsi que le rôle de la PDI dans le catabolisme et les effets vasorelaxants du GSNO.

#### ***3.1. Etude in vitro des interactions du S-nitrosoglutathion avec la $\gamma$ -glutamyltransférase purifiée***

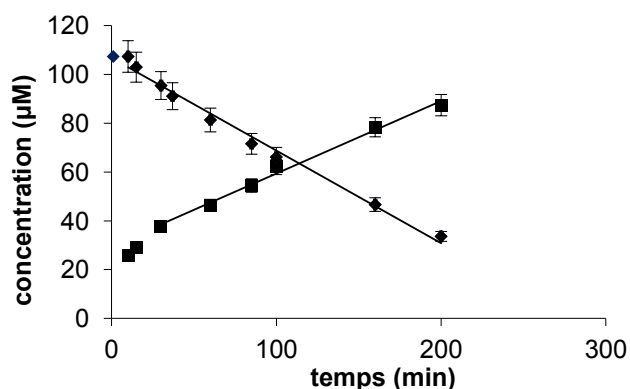
Dans une étude préalable aux expérimentations réalisées en présence de tissus vasculaires, les interactions entre l'enzyme GGT purifiée et le GSNO ont été évaluées *in vitro*. Dans ce but, la dégradation du GSNO catalysée par la GGT et la quantité de  $\cdot$ NO libéré en fonction du temps ont été suivies en parallèle.

##### ***3.1.1. Conditions opératoires***

L'étude *in vitro* de l'interaction de la GGT purifiée de rein de bœuf (0,4  $\mu$ g/mL) avec le GSNO (0,1 mM), a été réalisée selon le protocole précédemment décrit par Angeli *et al.* (2009). La quantité de  $\cdot$ NO libéré a été déterminée par la méthode spectrofluorimétrique utilisant la sonde DAN selon le protocole précédemment décrit dans l'article 3.

##### ***3.1.2. Résultats et discussion***

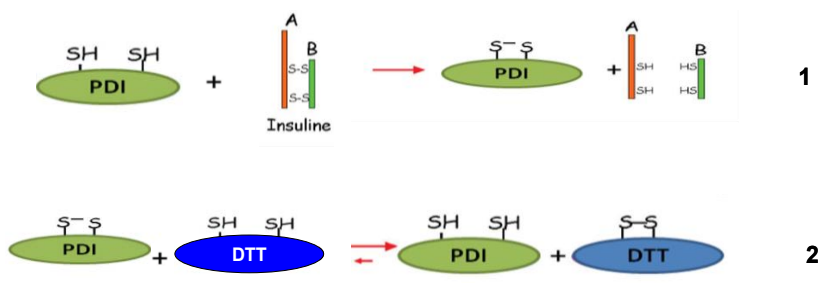
Comme le montre la figure 12, en présence de glycyglycine (accepteur du résidu  $\gamma$ -glutamyle) et d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  (catalyseur de la dégradation du métabolite cysglyNO), la concentration en GSNO diminue en fonction du temps sous l'action catalytique de la GGT et parallèlement la concentration en  $\cdot$ NO augmente. Ces résultats sont conformes à la littérature (Angeli *et al.*, 2009) et confirment que la GGT et les ions  $\text{Cu}^{2+}$  jouent un rôle essentiel dans la libération de  $\cdot$ NO à partir de GSNO qui s'avère quasi-totale selon le rapport stoechiométrique 1 : 1.



**Figure 12 :** Evolution des concentrations de GSNO (◆) mesurées par spectrophotométrie UV, et des concentrations des espèces dérivées du NO (■) mesurées par spectrofluorimétrie (DAN) ( $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ém}} = 415 \text{ nm}$ ) en fonction du temps sous l'action de la GGT purifiée de rein de bœuf ( $0,4 \mu\text{g/mL}$ ) dans un tampon phosphate ( $10 \text{ mM}$ ) pH 7,4, à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  et en présence de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10 \mu\text{M}$ ) et de glycylglycine ( $20 \text{ mM}$ ) ( $n = 3$ ).

### 3.2. Mesure de l'activité de la protéine disulfure isomérase purifiée par le test de turbidité à l'insuline

Le test de turbidité à l'insuline a été initialement développé par Holmgren et son équipe pour la mesure de l'activité de la Trx d'*E. Coli* (Holmgren, 1979) mais il est aussi applicable aux autres rédoxines comme la PDI. Ce test mesure la capacité de l'enzyme à catalyser la réduction de l'insuline en présence de l'agent réducteur *D,L*-dithiothréitol (DTT) (figure 13, réaction 2). Le DTT permet de maintenir la PDI sous forme réduite après réaction avec l'insuline (figure 13, réaction 1). L'insuline est composée de deux chaînes polypeptidiques A et B reliées entre elles par deux ponts disulfures. Lorsque ces ponts sont rompus, la chaîne B libérée insoluble précipite.



**Figure 13 :** Mécanisme de réduction de l'insuline par la protéine disulfure isomérase (PDI) (1). Réduction de la PDI par le *D,L*-dithiothréitol (DTT) (2).



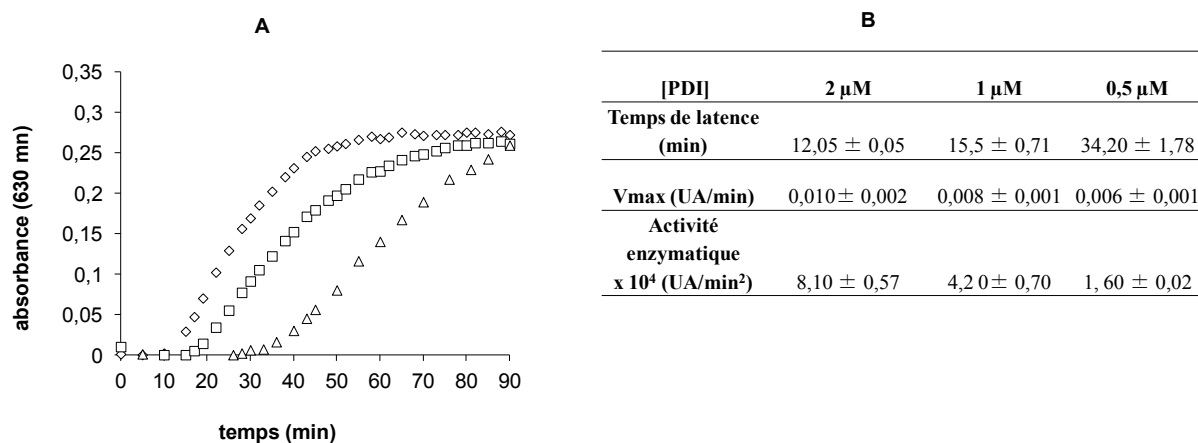
### **3.2.1. Conditions opératoires**

La mesure de l'activité de la PDI de foie de bœuf par le test de turbidité à l'insuline a été réalisée selon le protocole décrit par Holmgren (1979). Brièvement, l'insuline (0,13 mM) est incubée avec différentes concentrations de PDI (entre 0,5 et 2  $\mu$ M) ou avec des homogénats de foie ou d'aorte de rat Wistar dans un tampon phosphate (10 mM) pH 7,4 à température ambiante ( $23 \pm 2$  °C). La réaction est initialisée par l'addition de DTT (1 mM). Pour les manipulations en présence de bacitracine (100  $\mu$ M), une pré-incubation du milieu réactionnel est réalisée pendant 30 min avant l'ajout de l'insuline et de DTT.

L'activité enzymatique exprimée en UA/min<sup>2</sup> correspond au rapport vitesse maximale sur temps de latence ( $\tau$ , en min) (Holmgren, 1979, Martínez-Galisteo *et al.*, 1993). L'activité spécifique est exprimée en UA/min<sup>2</sup>/mg de protéines et elle est calculée par le rapport activité enzymatique sur quantité de protéines déterminée par la méthode à l'acide bicinchoninique (Pierce Kit pour le dosage des protéines).

### **3.2.2. Résultats et discussion**

Avant de débiter la mesure de l'activité de la PDI dans les homogénats tissulaires, une validation du protocole au moyen de PDI purifiée a été réalisée. Comme le montre la figure 14 A, la réduction de l'insuline par la PDI en fonction du temps correspond à une courbe présentant trois phases : une phase de latence, une phase exponentielle (au cours de laquelle la phase initiale correspond à la vitesse maximale de l'enzyme) et une phase stationnaire (plateau). Ces résultats sont conformes à ceux de la littérature (Holmgren, 1979). Par ailleurs, une corrélation linéaire entre la concentration de la PDI et son activité a été mise en évidence (figure 14 B). Nous avons ensuite vérifié l'effet de la bacitracine sur l'activité de la PDI purifiée (2  $\mu$ M). L'activité enzymatique de la PDI est diminuée d'un facteur 10 ( $8,10 \pm 0,57$  vs.  $0,80 \pm 0,07 \cdot 10^4$  UA/min<sup>2</sup>, n = 3), ce qui confirme l'inhibition de la PDI par la bacitracine.

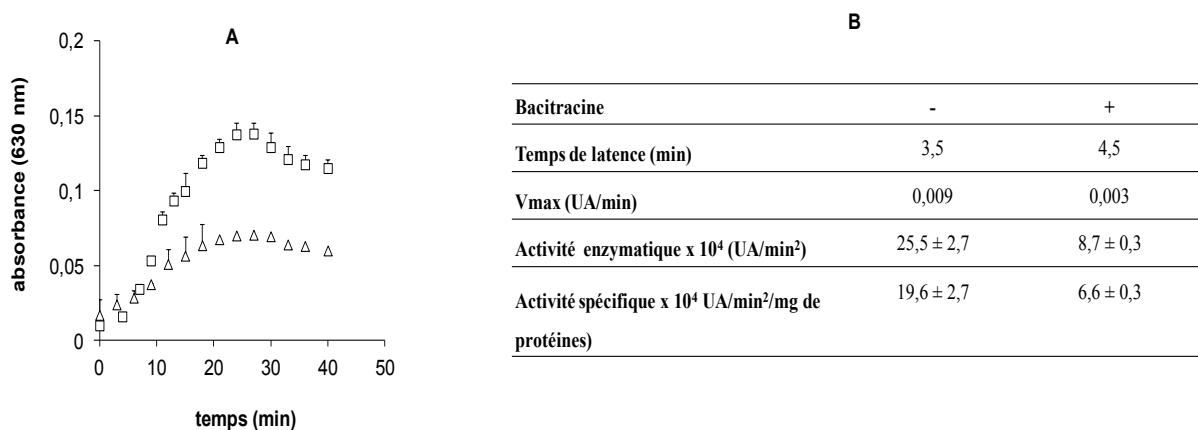


**Figure 14 :** A) Suivi de la réduction de l'insuline (0,13 mM) en fonction du temps en présence de différentes concentrations de PDI purifiée de foie de bœuf (2 ( $\diamond$ ), 1 ( $\square$ ), 0,5 ( $\Delta$ )  $\mu$ M)) (n = 3) en présence de DTT (1 mM) dans un tampon phosphate (10 mM) pH 7,4 et à  $23 \pm 2$  °C. B) Tableau récapitulatif des valeurs de temps de latence (min), Vmax (UA/min) et activité enzymatique de la PDI (UA/min<sup>2</sup>).

Après avoir validé la mesure de l'activité de la PDI sur enzyme purifiée, des mesures d'activité des rédoxines sur des protéines isolées à partir d'homogénats de foie et d'aorte ont été réalisées en présence et en absence de bacitracine. Les protéines ont été isolées par saturation à 90 % à l'acétate d'ammonium selon le protocole précédemment décrit par Lundström et Holmgren (1990).

Comme le montre la figure 15 A et B, une activité des rédoxines dans les homogénats de foie a été mise en évidence. Par ailleurs, la présence de bacitracine (100  $\mu$ M) dans le milieu réactionnel diminue l'activité spécifique de 3 fois.

Ces expériences ont été répétées de façon similaire mais en présence d'homogénats d'aorte de rat avec la même quantité de protéines que celle présente dans le cas de l'étude sur le foie. Aucune activité n'a été détectée. Actuellement, des techniques plus sensibles pour la mesure de l'activité de la PDI comme celle utilisant un substrat fluorogénique, le diéosine glutathion disulfure (Raturi et Mutus, 2007), sont en cours de développement dans le laboratoire.



**Figure 15 :** A) Suivi de la réduction de l'insuline (0,13 mM) en fonction du temps en présence d'homogénats de foie de rat Wistar et de DTT (1 mM) avec (□) ou sans (Δ) bacitracine (100 μM) (n =3) dans un tampon phosphate (10 mM) pH 7,4 à 23 ± 2 °C. B) Tableau récapitulatif des valeurs de temps de latence (min), de Vmax (UA/min), d'activité enzymatique (UA/min<sup>2</sup>) et spécifique des rédoxines (UA/min<sup>2</sup>/mg de protéines).

### 3.3. Etude *in vitro* des interactions du *S*-nitrosoglutathion avec la protéine disulfure isomérase purifiée

La réaction de dénitrosation du GSNO médiée par la PDI a également été évaluée *in vitro*. La PDI est une protéine contenant un résidu tryptophane (Cys32-Val33-Trp34-Cys35) caractérisé par un hétérocycle indole qui confère des propriétés de fluorescence à la protéine. La PDI catalyse la réaction de dénitrosation du GSNO aboutissant à la libération de <sup>•</sup>NO et à l'oxydation de la PDI (pont disulfure entre les deux résidus cystéine du site actif), la forme oxydée de la PDI n'étant pas dotée de fluorescence intrinsèque. Ainsi la réaction de dénitrosation est suivie en mesurant la diminution de l'intensité de fluorescence émise par la PDI. Parallèlement, la production de <sup>•</sup>NO est mesurée par la méthode spectrofluorimétrique utilisant la sonde DAN. Par ailleurs, nous avons vérifié sur ce test *in vitro* l'effet de la bacitracine sur l'inhibition de la décomposition du GSNO médiée par la PDI.

#### 3.3.1. Conditions opératoires

L'étude *in vitro* de l'interaction de la PDI avec le GSNO a été réalisée selon le même protocole appliqué à la BUC(NO)<sub>2</sub> décrit dans l'article 3.

### 3.3.2. Résultats et discussion

Comme le montre le tableau 7, le taux de diminution de l'émission de fluorescence intrinsèque de la PDI réduite associé à la décomposition du GSNO est égal à  $-0,120 \pm 0,007 \text{ s}^{-1}$  (cinétique d'ordre 1) et il est accompagné d'une production de  $\cdot\text{NO}$  de  $0,80 \pm 0,05 \text{ }\mu\text{M}$ . En effet, quand  $1 \text{ }\mu\text{M}$  de PDI (facteur limitant par rapport au GSNO) est ajouté à  $5 \text{ }\mu\text{M}$  de GSNO, la concentration maximale de  $\cdot\text{NO}$  libérée est d'environ  $1 \text{ }\mu\text{M}$ . Ce résultat confirme que la réaction entre la PDI et le GSNO obéit à un rapport stœchiométrique de 1:1. En parallèle, nous avons observé que la bacitracine ( $100 \text{ }\mu\text{M}$ ) diminue significativement ( $p < 0,05$  vs. GSNO seul) la production de  $\cdot\text{NO}$  et qu'elle ralentit la diminution de la fluorescence intrinsèque de la PDI consécutive à l'interaction entre GSNO et PDI. Ces résultats confirment que la bacitracine est un inhibiteur de la PDI (prouvé par ailleurs avec un autre substrat comme l'insuline (paragraphe 4.2.).

**Tableau 7 :** Etude de l'interaction entre la PDI réduite et le GSNO en absence ou présence de bacitracine. Le milieu réactionnel contient de la PDI purifiée ( $1 \text{ }\mu\text{M}$ ), du GSNO ( $5 \text{ }\mu\text{M}$ ) en présence ou en absence de bacitracine ( $100 \text{ }\mu\text{M}$ ) préparé dans un tampon phosphate ( $10 \text{ mM}$ ) pH 7,4. La réaction est suivie en mesurant la diminution de l'intensité de la fluorescence intrinsèque de la protéine réduite ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ém}} = 340 \text{ nm}$ ) à  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 30 min. La libération de  $\cdot\text{NO}$  a été mesurée par spectrofluorimétrie (DAN) ( $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ém}} = 415 \text{ nm}$ ) ( $n = 3$ ,  $*p < 0,05$ ).

RSNO	Vitesse de diminution de la PDI sous forme réduite ( $\text{s}^{-1}$ )	Concentration de $\cdot\text{NO}$ libérée ( $\mu\text{M}$ )
GSNO	$-0,120 \pm 0,007$	$0,80 \pm 0,05$
GSNO + bacitracine	$-0,011 \pm 0,005^*$	$0,07 \pm 0,01^*$

### ***3.4. Evaluation du rôle de la protéine disulfure isomérase dans les effets vasculaires du S-nitrosoglutathion***

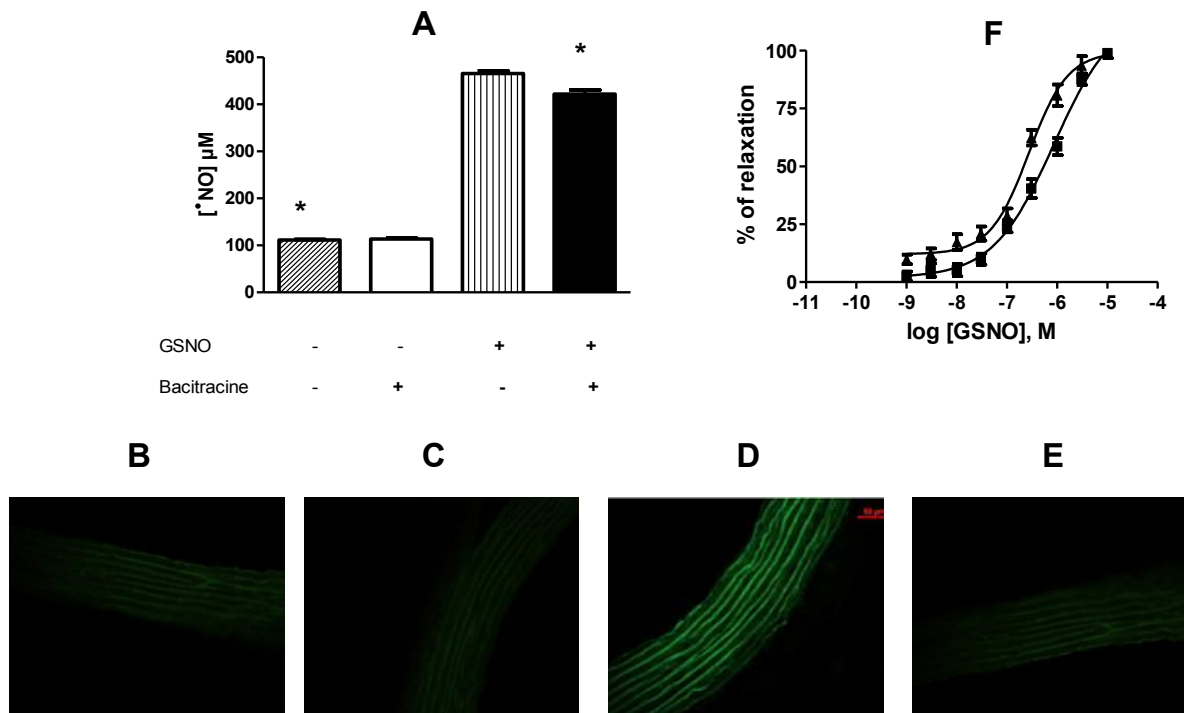
Le rôle de la PDI dans la libération de  $\text{NO}$  à partir de GSNO et l'effet vasorelaxant correspondant ont été évalués sur des aortes isolées de rat grâce à l'utilisation d'un inhibiteur, la bacitracine.

#### ***3.4.1. Conditions opératoires***

La quantification et la production de  $\text{NO}$  à partir de GSNO au sein de l'aorte ainsi que la détermination de la CE50 du GSNO en présence de bacitracine ont été réalisées selon les protocoles décrits dans l'article 4.

#### ***3.4.2. Résultats et discussion***

La production de  $\text{NO}$  (figure 16 A) induite par le GSNO et quantifiée à l'aide de la sonde perméable DAF-2 DA est modérément mais significativement diminuée d'environ 10 % en présence de bacitracine ( $p < 0,05$  vs. GSNO seul). De même, dans les sections aortiques, l'intensité de fluorescence correspondant à la libération de  $\text{NO}$  à partir de GSNO (figure 16 D) diminue après l'addition de GSNO en présence de bacitracine (figure 6 E). Des contrôles ont également été effectués afin de vérifier que la bacitracine n'interagissait pas avec la sonde DAF-2 DA. Les sections d'anneaux ou les tissus aortiques ont donc été incubés dans une solution de Krebs en présence de DAF-2 DA et de bacitracine (figure 16 A, B, C). Les résultats montrent que l'incubation d'anneaux en présence de DAF-2 DA et de bacitracine seule ne modifie pas la quantité de  $\text{NO}$  basal. Enfin, l'effet vasorelaxant de GSNO (CE50 =  $3,2 \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  M) est augmenté en présence de l'inhibiteur de la PDI (CE50 =  $8,5 \pm 0,2 \cdot 10^{-7}$  M). Ces résultats confirment que, parallèlement à l'action de la GGT, la PDI joue également un rôle dans la libération de  $\text{NO}$  à partir du GSNO et dans l'effet vasorelaxant du GSNO.



**Figure 16** : Rôle de la PDI dans les effets vasculaires du GSNO. A) production de  $\cdot\text{NO}$  après incubation des anneaux aortiques isolés de rat avec du GSNO (1 mM) en absence ou en présence de bacitracine (100  $\mu\text{M}$ ). B et C) sections d’anneaux aortiques chargés pendant 2 h avec DAF-2 DA (10  $\mu\text{M}$ ) montrant les contrôles en absence et en présence de bacitracine, respectivement. D, E) sections d’anneaux aortiques de rat chargés pendant 2 h avec DAF-2 DA 10  $\mu\text{M}$  montrant la production de  $\cdot\text{NO}$  après 15 min d’incubation avec du GSNO (1 mM) en absence ou en présence de bacitracine (100  $\mu\text{M}$ ), respectivement. Toutes les images ont été prises avec le même temps d’exposition, gain et offset. F) courbe concentration-réponse de GSNO (0,001 – 100  $\mu\text{M}$ ) obtenue sur des anneaux aortiques isolés de rat précontractés à la phényléphrine 10  $\mu\text{M}$  en présence (■) ou en absence (▲) de bacitracine. (n = 3 – 12, \*p < 0,05).

**Chapitre IV.**

**Discussion générale, conclusion et  
perspectives**

Dans ce dernier chapitre, nous discuterons successivement des faits marquants de nos travaux. Les résultats obtenus seront mis en parallèle avec ceux de la littérature et les perspectives du présent travail seront évoquées.

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde et la dysfonction endothéliale constitue l'élément essentiel de ces pathologies (Laslett *et al.*, 2012). Cette dysfonction endothéliale est essentiellement associée à une diminution de la production et/ou de la disponibilité de  $\text{NO}$ . Comme précédemment mentionné, de nombreuses équipes de recherche s'intéressent à de nouvelles familles de composés de structure chimique variée, susceptibles de mimer l'action de  $\text{NO}$ , d'activer ses voies de signalisation et de ne pas présenter les inconvénients des médicaments « donneurs de  $\text{NO}$  » actuellement présents sur le marché. Il existe différentes familles de donneurs de  $\text{NO}$  (NONOates, complexes nitrosyle, RSNO, etc...). L'utilisation de donneurs de  $\text{NO}$  naturellement présents dans l'organisme apparaît comme une alternative intéressante pour le développement de composés améliorant la biodisponibilité de  $\text{NO}$ . La famille des RSNO existant de façon endogène assure majoritairement une fonction de stockage et transport de  $\text{NO}$  (Stamler *et al.*, 1992a, Tsikas *et al.*, 2012). De nombreuses enzymes comme la GGT, la PDI, la Trx et le GSNOR sont capables de métaboliser les RSNO et d'induire la libération de  $\text{NO}$ . Le but de ce travail a été d'évaluer l'impact de deux enzymes membranaires, la GGT et la PDI, dans la libération de  $\text{NO}$  et les effets vasorelaxants des RSNO.

### ***1. S-nitrosothiols : critères de choix, synthèse et caractérisation physico-chimique***

Dans ce travail, deux RSNO ont été synthétisés : l'un existe de façon endogène, le GSNO (article 2), l'autre est exogène, la BUC(NO)<sub>2</sub> (article 3).

Le GSNO est le RSNO le plus étudié sur différents modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* (Hogg *et al.*, 1997, Sogo *et al.*, 2000, Tullett *et al.*, 2001, Heikal *et al.*, 2011). Il a déjà été administré chez l'Homme dans plusieurs essais cliniques de phase I ou II, généralement pour ses propriétés vasodilatatrices et antiagrégantes plaquettaires (tableau 8).



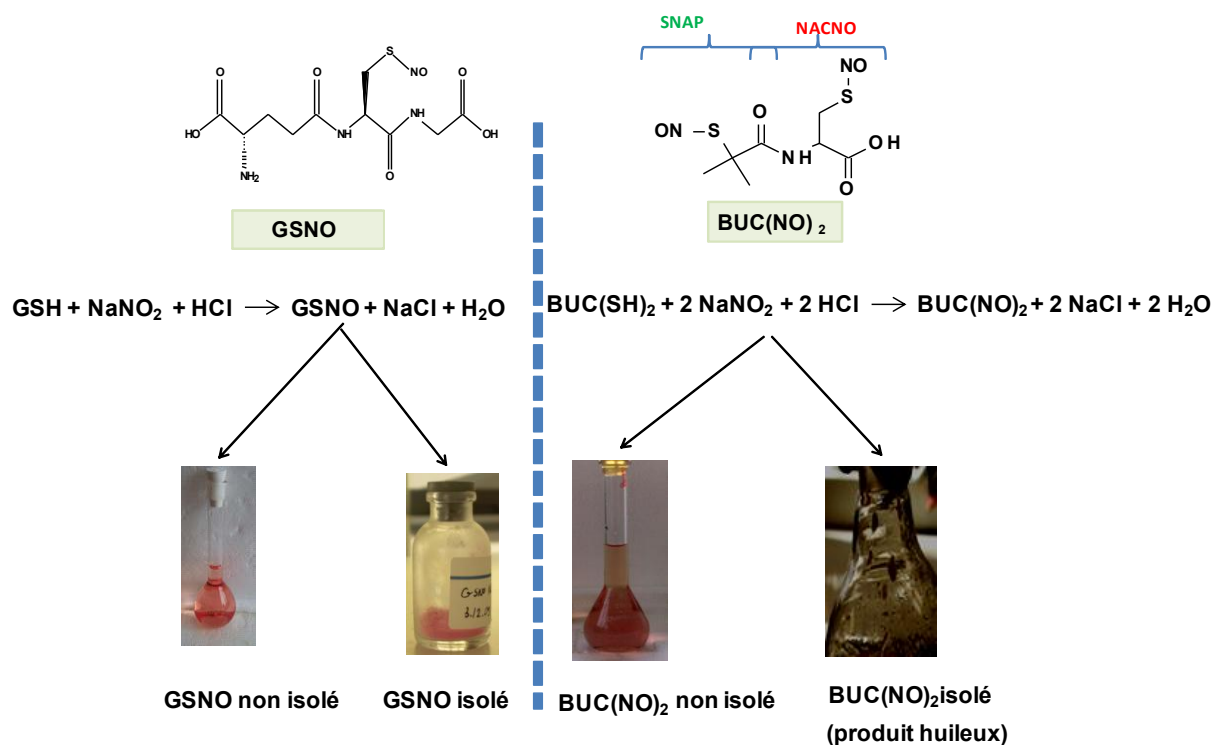
**Tableau 8 :** Utilisation du S-nitrosoglutathion dans des essais cliniques.

<b>Voie d'administration</b>	<b>Nombre de patients</b>	<b>But de l'étude/Application</b>	<b>Essai de phase</b>	<b>Référence</b>
Perfusion intraveineuse	10 (sains)	Etude des effets systémiques et détection d'éventuels effets indésirables	I	Ramsay <i>et al.</i> , 1995
Perfusion intra-artérielle	5 (sains)	Confirmation des résultats obtenus chez l'animal : effet vasodilatateur/antiagrégant plaquettaire	II	De Belder <i>et al.</i> , 1994
Administration <i>via</i> le cathéter utilisé pour la procédure chirurgicale	13 (malades)	Réduction de l'activation plaquettaire induite par l'angioplastie coronaire	II	Langford <i>et al.</i> , 1994
Administration parentérale	24 (malades)	Diminution de l'embolisation post-endarterectomie cérébrale	II	Molloy <i>et al.</i> , 1998
Inhalation (tampon ou aérosol)	20 (malades)	Amélioration des paramètres respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose	II	Snyder <i>et al.</i> , 2002
Application locale (bras)	8 (sains)	Augmentation du flux sanguin local (lutte contre une ischémie locale, pansements)	II	Seabra <i>et al.</i> , 2005

Pour synthétiser les RSNO, nous avons choisi une méthode rapide, simple et répétable. Elle consiste à faire réagir des ions nitrite avec le thiol en milieu acide (figure 17).

Nous avons démontré que cette méthode de synthèse utilisant un rapport 1 : 1 entre  $\text{NO}_2^-$  et GSH permet d'obtenir un produit soit sous forme isolée (après précipitation à l'acétone) soit sous forme non isolée en solution utilisé pour les expériences biologiques, tous deux offrant les garanties nécessaires en matière de pureté (97,5 %) et de leur très faible niveau d'impuretés (article 2).

De nombreuses techniques ont été proposées dans ce travail pour caractériser le GSNO synthétisé (article 2). Les méthodes physico-chimiques classiques (UV-visible,  $^1\text{H}$  RMN et IR, CLHP-SM et DSC) déjà appliquées au GSNO ont permis de s'assurer que la  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ , non isolé en solution et utilisé pour les expériences biologiques était d'une haute pureté (99,5 %), comparable à celle rapportée pour le GSNO (article 3).



**Figure 17 :** Méthode de synthèse de GSNO et BUC(NO)<sub>2</sub>.

Actuellement dans la littérature, seulement quelques di-ou polynitrosothiols à cœur pénicillamine ou cystéine ont été nitrosés et caractérisés. Ces RSNO ont montré des effets biologiques plus importants que le mononitrosothiol initial. C'est le cas du dinitrosodithiol dérivé de la pénicillamine qui a démontré une diminution plus importante (3 fois plus que le SNAP) de la pression artérielle systémique chez le rat et le lapin anesthésiés (Moynihan et Roberts, 1994). D'autres polynitrosothiols ont également été synthétisés. La *S*-nitrosopolyalbumine, obtenue par nitrosation de l'albumine dénaturée, présente des propriétés vasodilatatrices plus importantes que la molécule mère AlbsNO (DeMaster *et al.*, 1995). De même, les *S*-nitrosophytochélatines (SNOPC) ont prouvé un effet vasorelaxant plus puissant que le mononitrosothiol GSNO, cet effet étant en relation avec le nombre de groupements *S*-nitrosés présents par mole de polymère (Heikal *et al.*, 2011).

Au-delà de leur structure (cœur cystéine ou pénicillamine) et de leur lipophilie (cLog P (GSNO) = -2,7 ; cLog P BUC(NO)<sub>2</sub> = 1,08), nous avons vu que GSNO et BUC(NO)<sub>2</sub> diffèrent fortement en termes de stabilité (articles 2 et 3). Plusieurs paramètres (pH,

température, ions métalliques) y compris la structure du composé lui-même jouent un rôle prépondérant dans leur stabilité. Ces données viennent conforter les études précédemment réalisées (Roy *et al.*, 1994, Al-S'adoni *et al.*, 2000, Heikal *et al.*, 2009). En effet, malgré leurs avantages incontestables, les RSNO souffrent d'une demi-vie et d'une stabilité faibles (Al-S'adoni *et al.*, 2000, Tsikas *et al.*, 2012). Des modulations chimiques des groupements permettant d'améliorer la stabilité de ces composés sont à l'essai, notamment en jouant sur les substitutions des atomes de carbone proches du groupement thiol (Megson *et al.*, 1999, Al-S'adoni *et al.*, 2004, Gaucher *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'augmentation de l'hydrophobie des composés permettrait aussi de prolonger la libération de  $\text{NO}$  (Megson *et al.*, 1999). Une autre façon de protéger les RSNO des agressions environnementales est de les incorporer dans des formulations galéniques. Il existe déjà quelques exemples de formulations du GSNO dans la littérature (Seabra *et al.*, 2005, Marcato *et al.*, 2011). L'équipe CITHEFOR EA 3452 travaille également sur le développement de formes galéniques appropriées aux RSNO, notamment le GSNO. En outre, des travaux dans la littérature ont montré que l'inclusion du SNAP dans une CD est une approche utile pour le stabiliser sans perte de son activité pharmacologique (Bauer et Fung, 1991b). Nous avons vu que l'emploi de CD améliore significativement la stabilité de la  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  et protège le GSNO de la dégradation par la GGT (résultats complémentaires du chapitre 2). Ces approches sont à prendre en considération dans le but d'augmenter la demi-vie des RSNO.

Les RSNO représentent un choix logique pour le développement de nouveaux donneurs de  $\text{NO}$ . Un RSNO « idéal » devrait posséder les caractéristiques suivantes :

- être disponible en quantité suffisante et/ou facile à synthétiser (Al-S'adoni *et al.*, 2004)
- avoir une pureté déterminée et un profil d'impuretés bien caractérisé (Butler *et al.*, 1998)
- être isolé, facile à manipuler et à stocker (Al-S'adoni *et al.*, 2004)
- être lipophile, ce qui entraîne une augmentation de la pénétration à l'intérieur des cellules (Al-S'adoni *et al.*, 2000)
- avoir une demi-vie *in vivo* suffisante pour l'application thérapeutique visée (Al-S'adoni *et al.*, 2004)
- avoir une capacité à libérer le  $\text{NO}$  *in vitro* (Megson *et al.*, 1999, Al-Sadoni *et al.*, 2004)
- avoir un rapport élevé masse de  $\text{NO}$  libéré / masse de RSNO afin d'augmenter la biodisponibilité de  $\text{NO}$  en limitant la concentration du médicament. (Al-S'adoni *et al.*, 2000)
- être peu ou pas toxique (Roy *et al.*, 1994).

On peut conclure d'après nos données que le  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  répond à la plupart de ces critères ; cependant, il reste à isoler ce produit et à évaluer sa toxicité cellulaire.

## 2. Effets vasorelaxants des S-nitrosothiols et rôle des enzymes dans ces effets

Après avoir étudié les caractéristiques physico-chimiques du GSNO, nous avons montré *in vitro* que la libération de  $\text{NO}$  à partir de GSNO est catalysée par la GGT, la Trx et la PDI. Ces résultats sont conformes à la littérature où plusieurs travaux ont montré que la GGT, la PDI et la Trx jouent un rôle dans la dégradation des RSNO et la libération du  $\text{NO}$  (Hogg *et al.*, 1997, Bramanti *et al.*, 1999, Sliskovic *et al.*, 2005, Holmgren *et al.*, 2010). Ensuite, nous nous sommes intéressés à étudier l'impact de deux enzymes membranaires, la GGT et la PDI, dans l'effet vasorelaxant des RSNO en utilisant comme modèle d'étude l'anneau aortique isolé de rat.

Notre modèle d'étude *ex vivo* (anneau aortique isolé de rat) est très largement décrit dans la littérature ; il utilise comme milieu extracellulaire une solution physiologique de Krebs dans lequel aucune protéine n'est présente. L'omission des protéines notamment l'albumine et l'hémoglobine dans le milieu génère un environnement qui s'éloigne des conditions *in vivo*. En effet, l'activité des RSNO est considérablement augmentée *in vivo* par la présence de ces protéines. Les interactions entre les différents thiols et les RSNO ainsi que leurs conséquences sur la pression artérielle ont été décrites (*cf.* partie bibliographique) ; ces études suggèrent l'importance des réactions de transnitrosation entre les thiols et les RSNO de faible masse moléculaire (Scharfstein *et al.*, 1994, Orié *et al.*, 2005, Warnecke *et al.*, 2009, Ishibashi *et al.*, 2011).

Récemment, l'équipe de Giustarini *et al.* (2011) a développé un modèle *ex vivo* d'anneau aortique isolé pour mesurer la vasorelaxation des RSNO dans un milieu contenant de l'albumine afin de se rapprocher de la composition extracellulaire. Cette étape a nécessité le développement d'un nouveau dispositif utilisant de larges cuves de volume 30 mL en raison de la formation de mousse à partir de l'albumine lors de l'oxygénation par bullage (95 %  $\text{O}_2$  et 5 %  $\text{CO}_2$ ) du milieu réactionnel. Leurs résultats ont montré que l'albumine augmente l'activité biologique des RSNO par des réactions de transnitrosation.

Malgré cet éloignement des conditions physiologiques, le modèle *ex vivo* que nous avons utilisé dans nos travaux représente à l'heure actuelle un modèle approprié pour :

- l'investigation de l'effet vasorelaxant des RSNO
- l'étude de l'implication des enzymes (*via* l'utilisation d'inhibiteurs) et d'autres médiateurs gazeux ( $\text{H}_2\text{S}$ ) sur l'effet vasorelaxant des RSNO
- l'évaluation du rôle de l'endothélium dans l'effet vasorelaxant des RSNO

- l'évaluation des capacités des différents RSNO à libérer le  $\text{NO}$  de manière prolongée. Des tests préliminaires ont été effectués pour évaluer cette libération prolongée mais une limite de la viabilité des anneaux ( $< 4$  h) a été mise en évidence. Cette viabilité a été évaluée *via* les réponses contractiles à la phényléphrine.

Sur ce modèle *ex vivo*, nous avons démontré que la GGT est impliquée dans la libération de  $\text{NO}$  et dans les effets vasorelaxants induits par le GSNO (article 4). Ceci est en accord avec les résultats obtenus par l'équipe de Heikal *et al.*, (2011). Par ailleurs, l'implication de la GGT a également été mise en évidence sur les effets hypotenseurs induits par une administration aiguë de GSNO chez le rat (Kashiba *et al.*, 1999).

Un des résultats importants obtenus au cours de notre travail est la mise en évidence, à notre connaissance pour la première fois, du rôle important de l'endothélium dans l'effet vasorelaxant immédiat GGT-dépendant induit par le GSNO. Nos résultats fonctionnels sont cohérents avec nos résultats histochimiques qui ont permis de localiser l'activité de la GGT au niveau de l'endothélium dans l'aorte de rat.

Certains travaux décrits dans la littérature se sont intéressés au rôle de l'endothélium dans les effets vasorelaxants retardés du GSNO sur des vaisseaux isolés. L'équipe de Sarr *et al.* (2005) a montré que le GSNO exerçait, en absence d'endothélium, des effets vasorelaxants persistants, effets attribués à la capacité du GSNO de favoriser des réactions de nitrosation de thiols cellulaires de faible masse moléculaire comme la cystéine, constituant ainsi la formation d'une réserve de  $\text{NO}$  pouvant être libéré de manière prolongée au niveau des cellules. Cependant, cet effet retardé ne semble exister qu'en absence d'endothélium. En effet, bien que la capacité du vaisseau à stocker le  $\text{NO}$  soit préservée en présence d'endothélium, l'existence d'une production basale de  $\text{NO}$  empêcherait la libération lente de  $\text{NO}$  à partir de ces stocks et donc l'effet vasorelaxant.

L'équipe de Megson *et al.* (1999) décrit également que l'absence d'endothélium est nécessaire pour révéler les effets vasorelaxants au long court d'autres RSNO, le SNAP et ses dérivés. Selon leur hypothèse, ces RSNO seraient retenus dans les zones riches en lipides des couches sous-endothéliales au niveau desquelles ils décomposeraient lentement pour libérer le  $\text{NO}$ . Ces effets disparaîtraient en présence de l'endothélium, car celui-ci représenterait une barrière empêchant la rétention de ces RSNO dans les couches sous-jacentes.

Cependant, la même équipe a montré que le GSNO induisait des effets vasorelaxants persistants sur des artères humaines isolées indépendamment de l'intégrité de l'endothélium (Sogo *et al.*, 2000).

Le rôle de l'endothélium dans les effets retardés du GSNO n'est donc pas encore clairement établi et il semble dépendre du type de vaisseau étudié et du type de RSNO administré, mais il doit également être influencé par les enzymes participant au métabolisme des RSNO présentes dans les vaisseaux. L'étude de l'implication de la GGT dans les effets retardés du GSNO demeure ainsi une voie future de recherche. En outre, nous avons observé que la PDI participe également à la libération de  $\text{NO}$  et aux effets vasorelaxants du GSNO. Nos résultats sont comparables à ceux de Heikal *et al.* (2011) qui est à notre connaissance, la seule étude à avoir montré le rôle de la PDI dans les effets vasorelaxants du GSNO au niveau vasculaire.

Enfin, le rôle important de l'endothélium, et plus particulièrement de la GGT présente sur cet endothélium, revêt une importante capitale dans l'orientation future des travaux sur les pathologies vasculaires au cours desquelles l'endothélium est très souvent altéré.

Quant à la  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ , nos résultats montrent que la présence de deux mononitrosothiols au sein d'une même molécule :

1- permet de libérer davantage de  $\text{NO}$  au niveau vasculaire et améliore les propriétés vasorelaxantes par rapport aux mononitrosothiols GSNO, SNAP, NACNO, AlBSNO, et au dinitrosothiol SNOPC<sub>2</sub>. Par ailleurs, la valeur de CE50 de la  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  est égale à celle de GSNO en présence de l'activateur glycyglycine, condition proche des conditions physiologiques.

2- modifie les propriétés pharmacologiques et les mécanismes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des RSNO. En effet, la libération de  $\text{NO}$  ainsi que l'effet vasorelaxant de la  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  sont supérieurs aux effets du mélange malgré le même nombre de groupements S-NO dans les préparations. Par ailleurs, alors que les effets vasculaires de la  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  sont dépendants de la PDI, le SNAP, la NACNO et le mélange ne sont pas dépendants de celle-ci. De plus, la forte lipophilie de la  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  (cLog P = 1,08) par rapport à celle de la NACNO (cLog P = -0,46) et du SNAP (cLog P = 0,08) pourrait également expliquer les effets plus importants de la  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  en permettant de favoriser la pénétration membranaire et le transfert vers le compartiment intracellulaire. L'équipe de Megson *et al.* (1997) ont d'ailleurs mis en évidence une corrélation linéaire entre la lipophilie de différents dérivés du SNAP et leur effet vasorelaxant. L'évaluation de la lipophilie de la  $\text{BUC}(\text{NO})_2$  vs. NACNO et SNAP reste à valider expérimentalement. Il serait possible de l'évaluer à l'aide de la technique de Langmuir. C'est une méthode pour construire des multicouches homogènes de molécules tensioactives à la surface de l'eau. Ces multicouches sont considérées comme des membranes biologiques permettant l'étude des caractéristiques hydrophiles, hydrophobes ou amphiphiles de la molécule (Ulman, 1991).

L'ensemble des données obtenues prouvent une implication de la GGT et de la PDI dans les effets vasorelaxants du GSNO et de la BUC(NO)<sub>2</sub> mais ils n'excluent pas l'intervention d'autres enzymes ou transporteurs au niveau membranaire et intracellulaire (*cf.* partie bibliographique). L'évaluation de ces enzymes peut être envisagée dans de futures expériences en suivant la même stratégie que celle appliquée pour la GGT et la PDI décrite dans les articles 3 et 4. Elle consiste à évaluer la libération de \*NO et l'effet vasorelaxant des RSNO en présence des inhibiteurs des enzymes comme : le 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylique pour la L-AT (Heikal *et al.*, 2010), le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène pour le système Trx/TrxR (Choi *et al.*, 2011) et le N6338 pour la GSNOR (Chen *et al.*, 2013).

### **3. Perspectives : de la physiologie à la pathologie**

Dans des conditions physiologiques, les effets vasorelaxants immédiats des RSNO sont médiés par différentes enzymes, en particulier, la GGT, les rédoxines (PDI, Trx/TrxR) et la GSNOR. Le rôle de ces enzymes dans le mécanisme d'action des RSNO est d'autant plus important à connaître que leurs activités ou leurs expressions enzymatiques sont modulées dans certaines pathologies (tableau 9).

En effet, de nombreuses études cliniques montrent que l'activité de la GGT plasmatique est augmentée dans différentes pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle et l'athérosclérose (Franzini *et al.*, 2009, Ermis *et al.*, 2012). Cette augmentation d'activité a été corrélée à une augmentation dans la plaque d'athérome (Franzini *et al.*, 2009).

Quelques études expérimentales ont montré que l'activité de la PDI est également augmentée dans des conditions pathologiques. En effet, dans des conditions de stress oxydant généré au cours d'un traitement par l'angiotensine II de cellules musculaires lisses vasculaires en culture, l'activité et l'expression de la PDI sont augmentées de 5 et 2 fois, respectivement, (Janiszewski *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont également été observés sur des aortes isolées de rat préalablement traité par de l'angiotensine II pendant 14 j, traitement reconnu comme inducteur d'un dysfonctionnement endothélial associé au stress oxydant (Mehta et Griendling, 2007, Laurindo *et al.*, 2008). Cette activation de la PDI est associée à la production d'ERO consécutive à l'activation de NADPH oxydase, un complexe enzymatique membranaire produisant l'O<sub>2</sub>\*. Le stress oxydant agirait sur la protéine PDI *via* des modifications de sa conformation et une translocation de la protéine de la lumière du réticulum endoplasmique vers la membrane cytoplasmique a été observée (Madrigal-Matute *et al.*, 2012).

**Tableau 9** : Modulation de l'activité / expression des enzymes GGT et rédoxines en pathologie vasculaire.

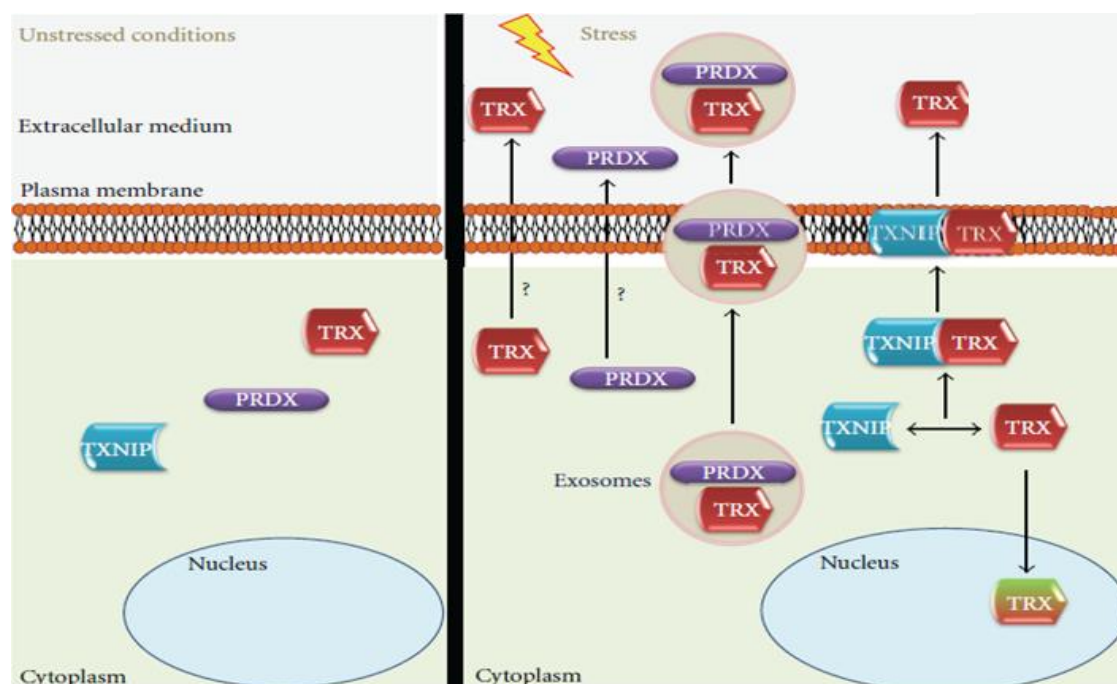
Conditions pathologiques	Modulation de l'activité / expression enzymatique	Référence
<b>Athérosclérose</b>	Augmentation de l'activité de la GGT plasmatique et des plaques d'athérome <i>(plasma et plaquettes humains)</i>	Franzini <i>et al.</i> , 2009
	Augmentation de l'expression du système Trx/TrxR <i>(sections d'artère coronaire humaine)</i>	Okuda <i>et al.</i> , 2001
<b>Hypertension artérielle</b>	Augmentation de 1,6 fois de l'activité de la GGT plasmatique <i>(plasma humain)</i>	Ermis <i>et al.</i> , 2012
<b>Stress oxydant induit par traitement à l'angiotensine II</b>	Augmentation de 5 et de 2 fois de l'activité et de l'expression de la PDI membranaire, respectivement <i>(cellules musculaires lisses d'aorte de lapin)</i>	Janiszewski <i>et al.</i> , 2005
<b>Dysfonction endothéliale induite par perfusion d'angiotensine II</b>	Diminution de 1,5 fois de l'activité du système Trx/TrxR Pas de différence d'expression du système Trx/TrxR <i>(homogénats d'aorte de souris)</i>	Choi <i>et al.</i> , 2011
<b>Hypertension artérielle pulmonaire hypoxique</b>	Augmentation de 1,8 et de 1,4 fois de l'activité et de l'expression de la GSNOR, respectivement <i>(homogénats des vaisseaux pulmonaires de souris)</i>	Wu <i>et al.</i> , 2010

Quant au système Trx/TrxR, dans un modèle de dysfonction endothéliale induite par perfusion d'angiotensine II pendant 14 j chez le rat (Choi *et al.*, 2011), son activité est diminuée de 1,5 fois. Cette diminution d'activité a été reliée à une augmentation du taux des protéines nitrosées. En outre, l'expression du système Trx/TrxR n'est pas modifiée. Ces résultats suggèrent que ce système constitue un mécanisme d'intérêt dans les maladies vasculaires comme l'hypertension. Par ailleurs, dans le cas de l'athérosclérose, l'expression



du système Trx/TrxR est augmentée. Cette surexpression a été corrélée à une augmentation des ERO produites (Maulik et Das, 2008). Récemment, l'équipe de Madrigal-Matute *et al.* (2012) a montré que dans le cas d'un stress oxydant, l'activité du système Trx/TrxR est augmentée et une translocation de la Trx du cytoplasme ou du noyau vers la membrane cytoplasmique est observée. Cette translocation est régulée et facilitée par (i) la protéine TXNIP (thioredoxin interacting protein binding), et (ii) les exosomes qui sont des microparticules libérées par les cellules lors de l'apoptose. Ces vésicules ont été impliquées dans la thrombose, le diabète, l'inflammation, l'athérosclérose, et la prolifération des cellules vasculaires (Madrigal-Matute *et al.*, 2012) (figure 18).

Enfin, dans un modèle d'hypertension artérielle pulmonaire hypoxique chez les souris, l'activité et l'expression de la GSNOR sont augmentées de 1,8 et 1,4 fois, respectivement, et elles ont été associées à une diminution de libération d'ions  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$  (Wu *et al.*, 2010).



**Figure 18** : Emplacement cellulaire de la thiorédoxine dans des conditions de non stress (gauche) et de stress (droite). Thiorédoxine (Trx), thioredoxin interacting protein binding (TXNIP). D'après Madrigal-Matute *et al.* (2012).

Compte tenu :

- du rôle de la GGT et de la PDI dans les effets vasculaires des RSNO,
- du rôle de l'endothélium dans les effets vasorelaxants GGT-dépendants du GSNO,

- des altérations fonctionnelles de l'endothélium, de l'existence d'un stress oxydant et d'une inflammation au cours des pathologies vasculaires,
- des modifications des activités plasmatiques et éventuellement tissulaires de ces enzymes au cours de ces mêmes pathologies, il nous paraît maintenant intéressant que notre travail de thèse soit poursuivi par la mesure de l'activité de ces enzymes et leur impact sur les effets vasculaires des RSNO dans une situation pathologique.

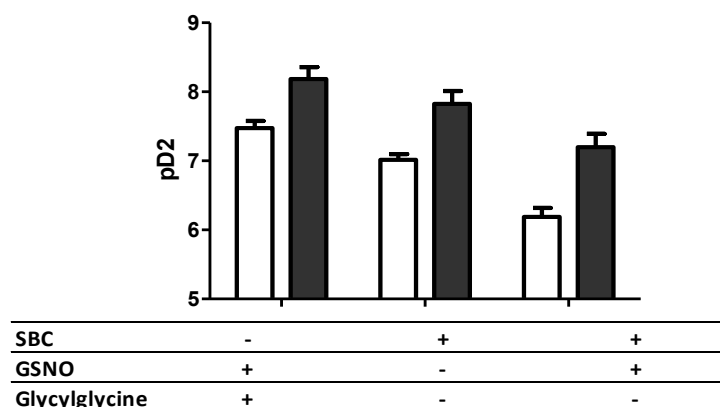
Dans ce contexte, une étude a été initiée au laboratoire sur des rats SHR, modèle d'hypertension expérimentale caractérisée par l'existence d'une dysfonction endothéliale et d'un stress oxydant (Ulker *et al.*, 2003, Féléto et Vanhoutte, 2009). Notre hypothèse est que l'existence d'une dysfonction endothéliale chez les rats SHR implique une diminution de l'activité tissulaire de la GGT et que l'effet vasorelaxant du GSNO soit limité.

Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet vasorelaxant du GSNO et l'implication de la GGT chez des rats SHR selon les mêmes protocoles que ceux décrits dans l'article 4. Nos résultats préliminaires montrent que (figure 19) :

- une faible dysfonction endothéliale existe chez les rats SHR âgés de 20 semaines. La dysfonction endothéliale a été évaluée par l'étude de la vasorelaxation induite par le carbachol chez les rats SHR et WKY. En effet, la valeur de CE50 du carbachol chez les rats SHR ( $CE50 = 3,4 \pm 0,2 \cdot 10^{-7}$  M) est augmentée de 2-3 fois par rapport à celle chez les rats WKY ( $CE50 = 1,3 \pm 0,3 \cdot 10^{-7}$  M) (n = 6 - 12).
- le GSNO est plus efficace chez les rats SHR ( $CE50 = 2,4 \pm 1,2 \cdot 10^{-8}$  M) que chez les rats WKY ( $CE50 = 1,23 \pm 0,05 \cdot 10^{-7}$  M) (n = 6 - 12)
- l'effet vasorelaxant du GSNO est dépendant de la GGT aussi bien chez les rats SHR que chez les rats WKY.

Chez les rats WKY, la valeur de la CE50 du GSNO en présence de glycylglycine est diminuée de 3 fois ( $CE50 = 4,0 \pm 2,6 \cdot 10^{-8}$  M) et elle est augmentée de 8 fois en présence de SBC ( $CE50 = 1,0 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$  M) (n = 6 - 12). De même, la valeur de CE50 du GSNO chez les rats SHR est diminuée de 2 fois en présence de glycylglycine ( $CE50 = 9,9 \pm 7,7 \cdot 10^{-8}$  M) et elle est augmentée de 6 fois en présence de SBC ( $CE50 = 1,1 \pm 0,7 \cdot 10^{-7}$  M) (n = 6 - 12).

- l'activité de la GGT au niveau aortique déterminée par le substrat chromogène L- $\gamma$ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide selon le même protocole décrit dans l'article 3, n'est pas significativement modifiée chez les rats WKY ( $22,5 \pm 2,3$   $\mu$ mol/min/mg de protéines) par rapport aux rats SHR ( $17,6 \pm 1,3$   $\mu$ mol/min/mg de protéines) (n = 6 - 12).



PD <sub>2</sub>	WKY	SHR
GSNO + glycylglycine	7,47 ± 0,30	8,19 ± 0,49
GSNO	6,96 ± 0,25	7,82 ± 0,53
GSNO + SBC	5,97 ± 0,06	7,20 ± 0,58

**Figure 19** : Impact de la GGT dans les effets vasorelaxants du GSNO chez les rats spontanément hypertendus (SHR, ■) et les rats Wistar-Kyoto (WKY, □). Les effets des modulateurs de la GGT dans les deux groupes de rat ont été analysés par une ANOVA 2 facteurs (variables = modulateurs GGT et hypertension) (p hypertension < 0,0001, p modulateurs GGT < 0,001 et p interaction > 0,05) (n = 6 - 12).

Ces résultats soulèvent de nouvelles questions : quel phénomène pourrait-il expliquer les effets supérieurs du GSNO chez les rats SHR ? Nos résultats préliminaires montrant que ces différences d'effets obtenus chez les rats normotendus et hypertendus ne sont pas dûes à une implication différente de la GGT, est-ce que d'autres activités ou expressions enzymatiques telles que celle de la PDI sont modifiées et pourraient expliquer les variations dans les effets du GSNO ? Enfin, qu'en est-il des liens entre activités enzymatiques et effets des RSNO dans des conditions pathologiques plus sévères en termes de dysfonction endothéliale et d'inflammation ?

La réponse à ces questions conduira à une meilleure connaissance des mécanismes d'action des RSNO et du rôle physiopathologique des enzymes de dénitrification au cours des pathologies vasculaires comme l'hypertension artérielle et permettra d'optimiser le choix de la meilleure molécule à utiliser dans un objectif thérapeutique.

# Références bibliographiques

- Al Azzam KM, Saad B, Abdoul-Enein HY. Determination of the binding constants of modanafil enantiomers with sulfated  $\beta$ -cyclodextrin chiral selector by capillary electrophoresis using three different linear plotting methods, *Electrophoresis*, 2010;31: 2957–63.
- Alencar JL, Lobysheva I, Chalupsky K, Geffard M, Nepveu F, Stoclet J-C, et al. S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:152–9.
- Alp NJ, Channon KM. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:413–20.
- Al-Sa'doni HH, Ferro A. S-nitrosothiols as nitric oxide-donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications. *Curr Med Chem* 2004;11:2679–90.
- Al-Sa'doni HH, Khan IY, Poston L, Fisher I, Ferro A. A novel family of S-nitrosothiols: chemical synthesis and biological actions. *Nitric Oxide Biol Chem* 2000;4:550–60.
- Angeli V, Tacito A, Paolicchi A, Barsacchi R, Franzini M, Baldassini R, et al. A kinetic study of gamma-glutamyltransferase (GGT)-mediated S-nitrosoglutathione catabolism. *Arch Biochem Biophys* 2009;481:191–6.
- Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L. In vivo reduction-oxidation state of protein disulfide isomerase: the two active sites independently occur in the reduced and oxidized forms. *Antioxidants Redox Signal* 2008;10:55–64.
- Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem Febs* 2000;267:6102–9.
- Bateman RL, Rauh D, Tavshanjian B, Shokat KM. Human carbonyl reductase 1 is an S-nitrosoglutathione reductase. *J Biol Chem* 2008;283:35756–62.
- 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;256:249–54.
- Bauer JA, Fung HL. Chemical stabilization of a vasoactive S-nitrosothiol with cyclodextrins without loss of pharmacologic activity, *Pharm Res*, 1991;8:1329–1333
- Beigi F, Gonzalez DR, Minhas KM, Sun Q-A, Foster MW, Khan SA, et al. Dynamic denitrosylation via S-nitrosoglutathione reductase regulates cardiovascular function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:4314–9.
- Bennett BM, McDonald BJ, Nigam R, Simon WC. Biotransformation of organic nitrates and vascular smooth muscle cell function. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:245–9.

- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994;368:850–3.
- Bramanti E, Angeli V, Franzini M, Vecoli C, Baldassini R, Paolicchi A, et al. Exogenous vs. endogenous gamma-glutamyltransferase activity: Implications for the specific determination of S-nitrosoglutathione in biological samples. *Arch Biochem Biophys* 2009;487:146–52.
- Bramanti E, Angeli V, Mester Z, Pompella A, Paolicchi A, D'Ulivo A. Determination of S-nitrosoglutathione in plasma: comparison of two methods. *Talanta* 2010;81:1295-9
- Braun M, Grosser T and Schror K. Bioactivation of nitroglycerin in vascular smooth muscle cells is different from that in non-vascular tissue. *Eur J Pharmacol* 1995; 276:239–
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994;63:175–95.
- Broniowska KA, Diers AR, Hogg N. S-nitrosoglutathione. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:3173–81.
- Broniowska KA, Zhang Y, Hogg N. Requirement of transmembrane transport for S-nitrosocysteine-dependent modification of intracellular thiols. *J Biol Chem* 2006;281:33835–41.
- Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* 2007;43:645–57.
- Carver DJ, Gaston B, deRonde K, Palmer LA. Akt-Mediated Activation of HIF-1 in Pulmonary Vascular Endothelial Cells by S-Nitrosoglutathione. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:255–63.
- Ceron PI, Cremonese DC, Bendhack LM, Tedesco AC. The relaxation induced by S-nitrosoglutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine in rat aorta is not related to nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:686–94.
- Chen Q, Sievers RE, Varga M, Kharait S, Haddad DJ, Patton AK, et al. Pharmacological inhibition of S-nitrosoglutathione reductase improves endothelial vasodilatory function in rats in vivo. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 2013;114:752–60.
- Chen Y-H, Yao W-Z, Geng B, Ding Y-L, Lu M, Zhao M-W, et al. Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD. *Chest* 2005;128:3205–11.
- Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8306–11.

- Chirolì V, Benedini F, Ongini E, Del Soldato P. Nitric oxide-donating non-steroidal anti-inflammatory drugs: the case of nitroderivatives of aspirin. *Eur J Med Chem* 2003;38:441–6.
- Choi H, Allahdadi KJ, Tostes RC, Webb RC. Augmented S-nitrosylation contributes to impaired relaxation in angiotensin II hypertensive mouse aorta: role of thioredoxin reductase. *J Hypertens*. 2011;29:2359–68.
- Cleland WW. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*. 1964;3:480-2.
- Collet J-F, Messens J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidants Redox Signal* 2010;13:1205–16.
- Crawford JH, White CR, Patel RP. Vasoactivity of S-nitrosohemoglobin: role of oxygen, heme, and NO oxidation states. *Blood* 2003;101:4408–15.
- Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995;75:519–60.
- De Belder AJ, MacAllister R, Radomski MW, Moncada S, Vallance PJ. Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res* 1994;28:691–4.
- De Saram K, McNeill KL, Khokher S, Ritter JM, Chowienczyk PJ. Divergent effects of vitamin C on relaxations of rabbit aortic rings to acetylcholine and NO-donors. *Br J Pharmacol* 2002;135:1044–50.
- DelaTorre A, Schroeder RA, Kuo PC. Alteration of NF-kappa B p50 DNA binding kinetics by S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:703–6.
- DeMaster EG, Quast BJ, Redfern B, Nagasawa HT. Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide. *Biochemistry* 1995;34:11494–9.
- Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005;23:971-8.
- Dicks AP, Beloso PH, Williams DLH. Decomposition of S-nitrosothiols: the effects of addedthiols. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1997:1429–34.
- Dicks AP, Swift HR, Williams DLH, Butler AR, Al-Sa'doni HH, Cox BG. Identification of Cu<sup>+</sup> as the effective reagent in nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO). *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1996:481–7.

- Diodati JG, Quyyumi AA, Hussain N, Keefer LK. Complexes of nitric oxide with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide: antiplatelet effect. *Thromb Haemost* 1993;70:654–8.
- Do KQ, Benz B, Grima G, Gutteck-Amsler U, Kluge I, Salt TE. Nitric oxide precursor arginine and S-nitrosoglutathione in synaptic and glial function. *Neurochem Int* 1996;29:213–24.
- Ermis N, Yagmur J, Acikgoz N, Cansel M, Cuglan B, Pekdemir H, et al. Serum gamma-glutamyl transferase (GGT) levels and inflammatory activity in patients with non-dipper hypertension. *Clin Exp Hypertens New York N* 1993 2012;34:311–5.
- Feelisch M, Ostrowski J, Noack E. On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;14:S13–22.
- Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci Lond Engl* 1979 2009;117:139–55.
- Fitzhugh AL, Keefer LK. Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the “NONOates.” *Free Radic Biol Med* 2000;28:1463–9.
- Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease From Marvel to Menace. *Circulation* 2006;113:1708–14.
- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33: 829–37
- Foster MW, Hess DT, Stamler JS. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med* 2009;15:391–404.
- Franzini M, Corti A, Martinelli B, Del Corso A, Emdin M, Parenti GF, et al. Gamma-glutamyltransferase activity in human atherosclerotic plaques--biochemical similarities with the circulating enzyme. *Atherosclerosis* 2009;202:119–27.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373–6.
- Garcia-Fuentes M, Trapani A, Alonso MJ. Protection of the peptide glutathione by complex formation with alpha-cyclodextrin: NMR spectroscopic analysis and stability study. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;64:146–53.
- Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1774–7.
- Gaston B, Sears S, Woods J, Hunt J, Ponaman M, McMahon T, et al. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *Lancet* 1998;351:1317–9.



- Gaucher C, Boudier A, Dahboul F, Parent M, Leroy P. S-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of S-nitrosothiols. *Curr Pharm Des* 2013;19:458–72.
- Geschka S, Kretschmer A, Sharkovska Y, Evgenov OV, Lawrenz B, Hucke A, et al. Soluble guanylate cyclase stimulation prevents fibrotic tissue remodeling and improves survival in salt-sensitive Dahl rats. *Plos One* 2011;6:e21853.
- 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.
- Gladwin MT, Ognibene FP, Pannell LK, Nichols JS, Pease-Fye ME, Shelhamer JH, et al. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9943–8.
- Granillo OM, Brahmajothi MV, Li S, Whorton AR, Mason SN, McMahon TJ, et al. Pulmonary alveolar epithelial uptake of S-nitrosothiols is regulated by L-type amino acid transporter. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L38–43.
- Griveau S, Bedioui F. Electroanalytical methodologies for the detection of S-nitrosothiols in biological fluids. *Analyst* 2013;138:5173–81.
- Grossi L, Montevecchi PC. A kinetic study of S-nitrosothiol decomposition. *Chem Weinh Bergstr Ger* 2002;8:380–7.
- Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:469–87.
- Hanspal IS, Magid KS, Webb DJ, Megson IL. The effect of oxidative stress on endothelium-dependent and nitric oxide donor-induced relaxation: implications for nitrate tolerance. *Nitric Oxide* 2002;6:263–70.
- Hart TW. Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Lett* 1985;26:2013–6.
- Heikal L, Aaronson PI, Ferro A, Nandi M, Martin GP, Dailey LA. S-nitrosophytochelatin: investigation of the bioactivity of an oligopeptide nitric oxide delivery system. *Biomacromolecules* 2011;12:2103–13.
- Heikal L, Martin GP, Dailey LA. Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of analogues: S-Nitrosophytochelatin. *Nitric Oxide* 2009;20:157–65.

- Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, Fukuto JM. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol*. 2013;169:1417-29.
- Henderson EM, Gaston B. SNOR and wheeze: the asthma enzyme? *Trends Mol Med* 2005;11:481-4.
- Henson SE, Nichols TC, Holers VM, Karp DR. The ectoenzyme gamma-glutamyl transpeptidase regulates antiproliferative effects of S-nitrosoglutathione on human T and B lymphocytes. *J Immunol Baltim Md* 1999;163:1845-52.
- Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:150-66.
- Hirayama A, Noronha-Dutra AA, Gordge MP, Neild GH, Hothersall JS. S-nitrosothiols are stored by platelets and released during platelet-neutrophil interactions. *Nitric Oxide* 1999;3:95-104.
- Hogg N, Darley-USmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* 1992;281:419-24.
- Hogg N, Singh RJ, Konorev E, Joseph J, Kalyanaraman B. S-Nitrosoglutathione as a substrate for gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem J* 1997;323:477-81.
- Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396:120-4.
- Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 1989;264:13963-6.
- Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* 1979;254:9627-32.
- Holmgren A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Struct Lond Engl* 1995;3:239-43.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9265-9.
- Ischiropoulos H, Gow A. Pathophysiological functions of nitric oxide-mediated protein modifications. *Toxicology* 2005;208:299-303.
- Ishibashi T, Miwa T, Nishizawa N, Shinkawa I, Yoshida J, Kawada T, et al. Role of plasma S-nitrosothiols in regulation of blood pressure in anesthetized rabbits with special references to hypotensive effects of acetylcholine and nitrovasodilators. *Biol Pharm Bull* 2011;34:1307-13.
- Jacob C, Winyard PG. *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009: 433-464.

- Jaffe IA. The effect of penicillamine on the laboratory parameters in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1965;8:1064–79.
- Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, Laurindo FR. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2005;280:40813–9.
- Jensen DE, Belka GK, Du Bois GC. S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem J* 1998;331:659–68.
- Jiang H, Wu H, Li Z, Geng B, Tang C. [Changes of the new gaseous transmitter H<sub>2</sub>S in patients with coronary heart disease]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2005;25:951–4.
- Jourd'heuil D, Miranda KM, Kim SM, Espey MG, Vodovotz Y, Laroux S, et al. The oxidative and nitrosative chemistry of the nitric oxide/superoxide reaction in the presence of bicarbonate. *Arch Biochem Biophys* 1999;365:92–100.
- Kashiba M, Kasahara E, Chien KC, Inoue M. Fates and vascular action of S-nitrosoglutathione and related compounds in the circulation. *Arch Biochem Biophys* 1999;363:213–8.
- Kashiba-Iwatsuki M, Yamaguchi M, Inoue M. Role of ascorbic acid in the metabolism of S-nitroso-glutathione. *Febs Lett* 1996;389:149–52.
- Keeble JE, Moore PK. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. *Br J Pharmacol* 2002;137:295–310.
- Keefer LK, Flippen-Anderson JL, George C, Shanklin AP, Dunams TM, Christodoulou D, et al. Chemistry of the diazeniumdiolates. I. Structural and spectral characteristics of the [N(O)NO]- functional group. *Nitric Oxide* 2001;5:377–94.
- Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* 1990;66:1561–75.
- Kevil CG, Lefer DJ. Nitrite and Nitrate: From Bench to Bedside. *Nitric Oxide* 2012;26:195–6.
- Khan M, Im Y-B, Shunmugavel A, Gilg AG, Dhindsa RK, Singh AK, 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;2094:6–32.
- Khan M, Sakakima H, Dhammu TS, Shunmugavel A, Im YB, Gilg AG, Singh AK, Singh I. S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms of neurorepair following traumatic brain injury in rats. *J Neuroinflammation* 2011;8:78.

- Khan M, Sekhon B, Giri S, Jatana M, Gilg AG, Ayasolla K, et al. S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:177–92.
- Kjøller-Hansen L, Boesgaard S, Laursen JB, Poulsen HE, Aldershvile J. [Nitroglycerin preparations. Effect and tolerance]. *Ugeskr Laeger* 1994;156:3621–5.
- Krawczyk J. S-nitrosothiols and cyclodextrins inclusion complexes: characterization, chemical stabilization and protection against degradation enzymes Master's thesis.2011-2012.
- Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Wilcox DE. Effects of temperature, oxygen, heme ligands and sulfhydryl alkylation on the reactions of nitroprusside and nitroglycerin with hemoglobin. *Biochem Pharmacol* 1993;46:95–102.
- Kukovetz WR, Holzmann S, Pösch G. Molecular mechanism of action of nicorandil. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20:S1–7.
- Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ, de Belder AJ, Thomas MR, Smith RE, et al. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet* 1994;344:1458–60.
- Laslett LJ, Alagona P Jr, Clark BA 3rd, Drozda JP Jr, Saldivar F, Wilson SR, et al. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:S1–49.
- Laurindo FRM, Fernandes DC, Amanso AM, Lopes LR, Santos CXC. Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. *Antioxidants Redox Signal* 2008;10:1101–13.
- Lazzarato L, Chegaev K, Marini E, Rolando B, Borretto E, Guglielmo S, et al. New nitric oxide or hydrogen sulfide releasing aspirins. *J Med Chem* 2011;54:5478–84.
- Leclerc PC, Lanctot PM, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R, Guillemette G. S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. *Br J Pharmacol* 2006;148:306–13.
- Lee D-H, Jacobs DR Jr, Gross M, Kiefe CI, Roseman J, Lewis CE, et al. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2003;49:1358–66.
- Lidder S, Webb AJ. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75:677–96.

- Lieberman MW, Barrios R, Carter BZ, Habib GM, Lebovitz RM, Rajagopalan S, et al. gamma-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? *Am J Pathol* 1995;147:1175–85.
- Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ Res* 2010;106:633–46.
- Lipton AJ, Johnson MA, Macdonald T, Lieberman MW, Gozal D, Gaston B. S-nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature* 2001;413:171–4.
- Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 1995;38:87–104.
- Lum G, Gambino SR. Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone. *Clin Chem* 1972;18:358–62.
- Lundström J, Holmgren A. Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J Biol Chem* 1990;265:9114–20.
- Madrigal-Matute J, Martinez-Pinna R, Fernandez-Garcia CE, Ramos-Mozo P, Burillo E, Egido J, et al. Cell stress proteins in atherothrombosis. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:232464.
- Mansuy D, Boucher J-L. Oxidation of N-hydroxyguanidines by cytochromes P450 and NO-synthases and formation of nitric oxide. *Drug Metab Rev* 2002;34:593–606.
- Marcato PD, Adami LF, Melo PS, de Paula LB, Durán N, Seabra B. Glutathione and S-nitrosoglutathione in alginate/chitosan nanoparticles: Cytotoxicity. *Journal of Physics: Conference Series* 2011; 304:1–5.
- Martínez-Galisteo E, Padilla CA, García-Alfonso C, López-Barea J, Bárcena JA. Purification and properties of bovine thioredoxin system. *Biochimie* 1993;75:803–9.
- Martínez-Ruiz A, Lamas S. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res* 2004;62:43–52.
- Mathews WR, Kerr SW. Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;267:1529–37.
- Maulik N, Das DK. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780:1368–82.
- Mazor D, Greenberg L, Shamir D, Meyerstein D, Meyerstein N. Antioxidant properties of buccillamine: possible mode of action. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:1171–5.
- Megson IL, Greig IR, Butler AR, Gray GA, Webb DJ. Therapeutic potential of S-nitrosothiols as nitric oxide donor drugs. *Scott Med J* 1997;42:88–9.

- Megson IL, Morton S, Greig IR, Mazzei FA, Field RA, Butler AR, et al. N-Substituted analogues of S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine: chemical stability and prolonged nitric oxide mediated vasodilatation in isolated rat femoral arteries. *Br J Pharmacol* 1999;126:639–48.
- Megson IL, Webb DJ. Nitric oxide donor drugs: current status and future trends. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:587–601.
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2007;292:C82–C97.
- Meister A, Tate SS, Griffith OW. Gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol* 1981;77:237–53.
- Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, Loscalzo J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 1990;265:19028–34.
- Messana I, Rossetti DV, Misiti F, Vincenzoni F, Tellone E, Giardina B, et al. Determination of S-nitrosoglutathione in erythrocytes by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 2000;21:1606–10.
- Miller MR, Megson IL, Roseberry MJ, Mazzei FA, Butler AR, Webb DJ. Novel S-nitrosothiols do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryl trinitrate-tolerant rat femoral arteries. *Eur J Pharmacol* 2000;403:111–9.
- Miranda-Vizuite A, Gustafsson JA, Spyrou G. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a human thioredoxin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:284–8.
- Mohazzab-H KM, Kaminski PM, Agarwal R, Wolin MS. Potential role of a membrane-bound NADH oxidoreductase in nitric oxide release and arterial relaxation to nitroprusside. *Circ Res* 1999;84:220–8.
- Molloy J, Martin JF, Baskerville PA, Fraser SC, Markus HS. S-nitrosoglutathione reduces the rate of embolization in humans. *Circulation* 1998;98:1372–5.
- Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991;21:361–74.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109–42.
- Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 1997;811:60–67; discussion 67–69.
- Morley D, Keefer LK. Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22:S3–9.

- Moynihan HA, Roberts SM, Weldon H, Allcock GH, Änggård EE, Warner TD. Synthesis and biological activity of the novel nitric oxide synthase inhibitor N $\omega$ '-hydroxy-N $\omega$ -methyl-L-arginine. *J Chem Soc* 1994;769–71.
- Mülsch A, Mordvintcev P, Vanin AF, Busse R. The potent vasodilating and guanylyl cyclase activating dinitrosyl-iron(II) complex is stored in a protein-bound form in vascular tissue and is released by thiols. *Febs Lett* 1991;294:252–6.
- Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 1986;78:1–5.
- 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;271:19180–5.
- Noble DR, Swift HR, Williams DLH. Nitric oxide release from S-nitrosoglutathione (GSNO). *Chem Commun* 1999:2317–8.
- Noble DR, Williams DLH. Structure–Reactivity Studies of the Cu<sup>2+</sup>-Catalyzed Decomposition of Four S-Nitrosothiols Based around the S-Nitrosocysteine/S-Nitrosoglutathione Structures. *Nitric Oxide* 2000;4:392–8.
- Noiva R, Lennarz WJ. Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1992;267:3553–6.
- Nossaman BD, Pankey EA, Badejo AR Jr, Casey DB, Uppu S, Murthy SN, et al. Analysis of responses to glyceryl trinitrate and sodium nitrite in the intact chest rat. *Nitric Oxide* 2012;26:223–8.
- Okuda M, Inoue N, Azumi H, Seno T, Sumi Y, Hirata Ki, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yodoi J, Yokoyama M. Expression of glutaredoxin in human coronary arteries: its potential role in antioxidant protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1483–7.
- Ondrias K, Stasko A, Cacanyiova S, Sulova Z, Krizanova O, Kristek F, et al. H(2)S and HS(-) donor NaHS releases nitric oxide from nitrosothiols, metal nitrosyl complex, brain homogenate and murine L1210 leukaemia cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 2008;457:271–9.
- Oppermann U. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:293–322.
- Orie NN, Vallance P, Jones DP, Moore KP. S-nitroso-albumin carries a thiol-labile pool of nitric oxide, which causes venodilation in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(2):H916-23

- Orlowski M, Meister A.  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide: a new convenient substrate for determination and study of L- and D- $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activities. *Biochim Biophys Acta* 1963;73:679–81.
- Ozawa K, Whalen EJ, Nelson CD, Mu Y, Hess DT, Lefkowitz RJ, et al. S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol Cell* 2008;31:395–405.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 2007;87:315–424.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524–6.
- Pan JL, Bardwell JCA. The origami of thioredoxin-like folds. *Protein Sci Publ Protein Soc* 2006;15:2217–27.
- Papoz L, Warnet JM, Péquignot G, Eschwege E, Claude JR, Schwartz D. Alcohol consumption in a healthy population. Relationship to gamma-glutamyl transferase activity and mean corpuscular volume. *J Am Med Assoc* 1981;245:1748–51.
- Parent M, Dupuis F, Maincent P, Vigneron C, Leroy P, Boudier A. [Which future in cardiovascular therapy for nitric oxide and its derivatives?]. *Ann Pharm Françaises* 2013a;71:84–94.
- Pawloski JR, Swaminathan RV, Stamler JS. Cell-Free and Erythrocytic S-Nitrosohemoglobin Inhibits Human Platelet Aggregation. *Circulation* 1998;97:263–7.
- Pereira Ade C, Ford PC, da Silva RS, Bendhack LM. Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases NO in a tissue and enzyme-dependent way. *Nitric Oxide*. 2011;24:192–8
- Prescott LF, Illingworth RN, Critchley JA, Stewart MJ, Adam RD, Proudfoot AT. Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Br Med J* 1979;2:1097–100.
- Raj L. Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens Greenwich Conn* 2006;8:30–9.
- Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9539–44.
- Ramsay B, Radomski M, De Belder A, Martin JF, Lopez-Jaramillo P. Systemic effects of S-nitroso-glutathione in the human following intravenous infusion. *Br J Clin Pharmacol* 1995;40:101–2.
- Rao DN, Elguindi S, O'Brien PJ. Reductive metabolism of nitroprusside in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1991;286:30–7.



- Raturi A, Mutus B. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Radic Biol Med* 2007;43:62–70.
- Ravi K, Brennan LA, Levic S, Ross PA, Black SM. S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2619–24.
- Ricardo KFS, Shishido SM, de Oliveira MG, Krieger MH. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide* 2002;7:57–66.
- Richard V, Vercauteren M, Gomez E, Thuillez C. [New pharmacological approaches in heart failure: should we treat the endothelium?]. *Therapie* 2009;64:93–100.
- Riego JA, Broniowska KA, Kettenhofen NJ, Hogg N. Activation and inhibition of soluble guanylyl cyclase by S-nitrosocysteine: involvement of amino acid transport system L. *Free Radic Biol Med* 2009;47:269–74.
- Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2006;86:391–7.
- Rollason JG, Pincherle G, Robinson D. Serum gamma glutamyl transpeptidase in relation to alcohol consumption. *Clin Chim Acta* 1972;39:75–80.
- Root P, Sliskovic I, Mutus B. Platelet cell-surface protein disulphide-isomerase mediated S-nitrosoglutathione consumption. *Biochem J* 2004;382:575–80.
- Rossoni G, Manfredi B, Del Soldato P, Berti F. The nitric oxide-releasing naproxen derivative displays cardioprotection in perfused rabbit heart submitted to ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:555–62.
- Roy B, du Moulinet d'Hardemare A, Fontecave M. New Thionitrites: Synthesis, Stability, and Nitric Oxide Generation. *J Org Chem* 1994;59:7019–26.
- 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;579:4119–24.
- Sarr M, Lobysheva I, Diallo AS, Stoclet J-C, Schini-Kerth VB, Muller B. Formation of releasable NO stores by S-nitrosoglutathione in arteries exhibiting tolerance to glyceryl-trinitrate. *Eur J Pharmacol* 2005;513:119–23.

- Scharfstein JS, Keaney JF Jr, Slivka A, Welch GN, Vita JA, Stamler JS, et al. In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. *J Clin Invest* 1994;94:1432–9.
- Schini VB, Vanhoutte PM. Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle. *Eur Heart J* 1993;14:16–21.
- Schonhoff CM, Gaston B, Mannick JB. Nitrosylation of Cytochrome c during Apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:18265–70.
- Seabra AB, da Rocha LL, Eberlin MN, de Oliveira MG. 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.
- Selemidis S, Dusting GJ, Peshavariya H, Kemp-Harper BK, Drummond GR. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2007;75:349–58.
- Sengupta R, Holmgren A. The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:689–700.
- Sengupta R, Holmgren A. Thioredoxin and thioredoxin reductase in relation to reversible S-nitrosylation. *Antioxidants Redox Signal* 2013;18:259–69.
- Sengupta R, Ryter SW, Zuckerbraun BS, Tzeng E, Billiar TR, Stoyanovsky DA. Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. *Biochemistry* 2007;46:8472–83.
- Seth D, Stamler JS. The SNO-proteome: causation and classifications. *Curr Opin Chem Biol* 2011;15:129–36.
- Shekhter AB, Rudenko TG, Serezhenkov VA, Vanin AF. [Dinitrosyl-iron complexes with cysteine or glutathione accelerate skin wound healing in animals]. *Biofizika* 2007;52:539–47.
- Simon DI, Stamler JS, Jaraki O, Keaney JF, Osborne JA, Francis SA, et al. Antiplatelet properties of protein S-nitrosothiols derived from nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. *Arter Thromb* 1993;13:791–9.
- Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B. Photosensitized decomposition of S-nitrosothiols and 2-methyl-2-nitrosopropane. Possible use for site-directed nitric oxide production. *Febs Lett* 1995;360:47–51.
- Sliskovic I, Raturi A, Mutus B. Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 2005;280:8733–41.

- 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.
- Snyder AH, McPherson ME, Hunt JF, Johnson M, Stamler JS, Gaston B. Acute effects of aerosolized S-nitrosoglutathione in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:922–6.
- Sogo N, Campanella C, Webb DJ, Megson IL. S-nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: therapeutic potential in bypass surgery. *Br J Pharmacol* 2000;131:1236–44.
- Souza JM, Peluffo G, Radi R. Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free Radic Biol Med* 2008;45:357–66.
- Staab CA, Alander J, Morgenstern R, Grafström RC, Höög J-O. The Janus face of alcohol dehydrogenase 3. *Chem Biol Interact* 2009;178:29–35.
- Staab CA, Hartmanová T, El-Hawari Y, Ebert B, Kisiela M, Wsol V, et al. Studies on reduction of S-nitrosoglutathione by human carbonyl reductases 1 and 3. *Chem Biol Interact* 2011;191:95–103.
- Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita 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* 1992c;89:7674–7.
- Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, et al. Blood Flow Regulation by S-Nitrosohemoglobin in the Physiological Oxygen Gradient. *Science* 1997b;276:2034–7.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992a;89:444–8.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992b;258:1898–902.
- Stamler JS, Toone EJ, Lipton SA, Sucher NJ. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* 1997a;18:691–6.
- Stoyanovsky DA, Tyurina YY, Tyurin VA, Anand D, Mandavia DN, Gius D, et al. Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein S-nitrosothiols. *J Am Chem Soc* 2005;127:15815–23.
- Straub AC, Lohman AW, Billaud M, Johnstone SR, Dwyer ST, Lee MY, et al. Endothelial cell expression of haemoglobin  $\alpha$  regulates nitric oxide signalling. *Nature* 2012;491:473–7.

- Styś T, Styś A, Paczwa P, Szczepańska-Sadowska E, Lipkowski AW. Decreased hypotensive responsiveness to nitric oxide donor S-nitroso N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) in spontaneously hypertensive (SHR) rats. *J Physiol Pharmacol* 1998;49:37–49.
- Sun X, Qiu J, Strong SA, Green LS, Wasley JWF, Blonder JP, et al. Discovery of potent and novel S-nitrosoglutathione reductase inhibitors devoid of cytochrome P450 activities. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21:5849–53.
- Suschek CV, Bonmann E, Kapsokefalou A, Hemmrich K, Kleinert H, Förstermann U, et al. Revisiting an old antimicrobial drug: amphotericin B induces interleukin-1-converting enzyme as the main factor for inducible nitric-oxide synthase expression in activated endothelia. *Mol Pharmacol* 2002;62:936–46.
- Swift HR, Williams DLH. Decomposition of S-nitrosothiols by mercury(II) and silver salts. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1997:1933–5.
- Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem* 2004;76:1825–45.
- Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schömig E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007 ;298:49–60.
- Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens* 2011;34:5–14.
- Tsikas D, Denker K, Frölich JC. Artifact-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;915:107–16.
- Tsikas D, Sandmann J, Rossa S, Gutzki FM, Frölich JC. 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;270:231–41.
- Tsikas D, Schmidt M, Böhmer A, Zoerner AA, Gutzki FM, Jordan J. UPLC-MS/MS measurement of S-nitrosoglutathione (GSNO) in human plasma solves the S-nitrosothiol concentration enigma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;927:147–57
- Tsikas D. Potential problems and pitfalls with the use of S-nitrosoglutathione and other S-nitrosothiols in physiology-oriented basic science. *J Physiol* 2012;590:6247–6248; author reply 6249–50.

- Tullett JM, Rees DD, Shuker DE, Gescher A. Lack of correlation between the observed stability and pharmacological properties of S-nitroso derivatives of glutathione and cysteine-related peptides. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1239–47.
- Turko IV, Murad F. Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* 2002;54:619–34.
- Turnbull CM, Rossi AG, Megson IL. Therapeutic effects of nitric oxide-aspirin hybrid drugs. *Expert Opin Ther Targets* 2006;10:911–22.
- Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res* 2003;59:488–500.
- Ulman A. « An Introduction to Ultrathin Organic Films : From Langmuir-Blodgett to self-assembly » ; Academic Press, London 1991, Xxiii.
- Vanin AF, Mokh VP, Serezhenkov VA, Chazov EI. Vasorelaxing activity of stable powder preparations of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands. *Nitric Oxide* 2007;16:322–30.
- Vanin AF. Dinitrosyl iron complexes and S-nitrosothiols are two possible forms for stabilization and transport of nitric oxide in biological systems. *Biochem Biokhimiia* 1998;63:782–93.
- Veleparampil MM, Aravind UK, Aravindakumar CT. Decomposition of S-Nitrosothiols Induced by UV and Sunlight. *Adv Phys Chem* 2009;2009:1–6.
- Vetrovsky P, Boucher J-L, Schott C, Beranova P, Chalupsky K, Callizot N, et al. Involvement of NO in the endothelium-independent relaxing effects of N(omega)-hydroxy-L-arginine and other compounds bearing a C=NOH function in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:823–30.
- Walshe JM. Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *Am J Med* 1956;21:487–95.
- Wang K, Wen Z, Zhang W, Xian M, Cheng JP, Wang PG. Equilibrium and kinetics studies of transnitrosation between S-nitrosothiols and thiols. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:433–6.
- Warnecke A, Luessen P, Sandmann J, Ikic M, Rossa S, Gutzki F-M, et al. Application of a stable-isotope dilution technique to study the pharmacokinetics of human <sup>15</sup>N-labelled S-nitrosoalbumin in the rat: possible mechanistic and biological implications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:1375–87.
- White CR, Frangos JA. The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2007;362:1459–67.

- Williams DLH. The Chemistry of S-Nitrosothiols. *Accounts Chem Res* 1999;32:869–76.
- Woycechowsky KJ, Wittrup KD, Raines RT. A small-molecule catalyst of protein folding in vitro and in vivo. *Chem Biol* 1999;6:871–9.
- Wu X, Du L, Xu X, Tan L, Li R. Increased nitrosoglutathione reductase activity in hypoxic pulmonary hypertension in mice. *J Pharmacol Sci* 2010;113:32–40.
- Zagli G, Patacchini R, Trevisani M, Abbate R, Cinotti S, Gensini GF, et al. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation. *Eur J Pharmacol* 2007;559:65–8.
- Zai A, Rudd MA, Scribner AW, Loscalzo J. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J Clin Invest* 1999;103:393–9.
- Zhang X, Huang B, Zhang L, Zhang Y, Zhao Y, Guo X, et al. SNObase, a database for S-nitrosation modification. *Protein Cell* 2012;3:929–33.
- Zhang Y, Hogg N. The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7891–6.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *Embo J* 2001;20:6008–16.
- Zheng M-Q, Tang K, Zimmerman MC, Liu L, Xie B, Rozanski GJ. Role of gamma-glutamyl transpeptidase in redox regulation of K<sup>+</sup> channel remodeling in postmyocardial infarction rat hearts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297:C253–262.

# **Résumé/Abstract**

## Evaluations physico-chimique, biochimique et pharmacologique de *S*-nitrosothiols : rôle des enzymes membranaires dans la libération de l'oxyde nitrique

L'objectif de notre travail a consisté en l'étude des mécanismes enzymatiques impliqués dans la libération de l'oxyde nitrique ( $\text{NO}$ ) à partir des *S*-nitrosothiols (RSNO) et dans leurs effets vasorelaxants. Notre intérêt porte sur deux enzymes membranaires : la  $\gamma$ -glutamyltransférase (GGT) et la protéine disulfure isomérase (PDI) car elles jouent un rôle prépondérant dans la dénitrification des RSNO et dans le passage du  $\text{NO}$  vers le compartiment cytosolique. Nous avons choisi d'étudier la dénitrification de deux RSNO : le *S*-nitrosoglutathion (GSNO), un mononitrosothiol endogène de faible masse moléculaire et la *S,S'*-dinitrosobucillamine ( $\text{BUC}(\text{NO})_2$ ), un dinitrosothiol non décrit dans la littérature.

Nous avons synthétisé ces deux RSNO et nous avons vérifié la nature du produit obtenu par une caractérisation physico-chimique complète (UV-visible,  $^1\text{H}$  RMN, IR, CLHP-SM, analyse thermique). Ces différentes analyses ont montré que les produits, GSNO et  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ , issus de nos synthèses présentent une pureté élevée (> 97 %) avec un niveau faible d'impuretés permettant leur utilisation dans des expérimentations biologiques. Les effets vasorelaxants des RSNO ainsi que l'implication de la GGT et de la PDI, ont été évalués. Tout d'abord, nos résultats montrent que la GGT et la PDI purifiées sont capables de dénitrifier *in vitro* le GSNO avec une production simultanée de  $\text{NO}$ . Le modèle *ex vivo* d'anneau aortique isolé de rat Wistar mâle nous a permis de démontrer que l'effet vasorelaxant de GSNO ( $\text{CE}_{50} = 3,2 \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  M) est dépendant de l'endothélium et de l'activité de la GGT et de la PDI. Concernant le  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ , ce dinitrosothiol est catabolisé *in vitro* par la PDI, est un vasorelaxant plus puissant que la plupart des mononitrosothiols décrits dans la littérature ( $\text{CE}_{50} = 2,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-8}$  M) et met en jeu l'activité de la PDI vasculaire.

En conclusion, nos travaux ont conduit à une meilleure compréhension des mécanismes enzymatiques impliqués dans les effets vasculaires des RSNO, ce qui permettra, dans un contexte pathologique, d'optimiser le choix de la meilleure RSNO à utiliser dans une finalité thérapeutique.

**Mots clés :** *S*-nitrosothiols, caractérisation physico-chimique,  $\gamma$ -glutamyltransférase, protéine disulfure isomérase, anneau d'aorte isolé, vasorelaxation.

## Physico-chemical, biochemical and pharmacological evaluations of *S*-nitrosothiols: role of membrane enzymes in the release of nitric oxide

The aim of our work was to evaluate the enzymatic pathways involved in the release of nitric oxide ( $\text{NO}$ ) and in the vasorelaxant effect of *S*-nitrosothiols (RSNO). We were interested in two membrane enzymes: the  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) and the protein disulfide isomerase (PDI), because they play an important role in RSNO denitrosation and in  $\text{NO}$  transport into the cytosolic compartment. Two RSNO were studied: *S*-nitrosoglutathione (GSNO), an endogenous mononitrosothiol, and *S,S'*-dinitrosobucillamine ( $\text{BUC}(\text{NO})_2$ ), a dinitrosothiol not yet described in the literature.

We synthesized RSNO and we structurally characterized these products by using UV-visible,  $^1\text{H}$  NMR, IR spectroscopy, HPLC-MS, and thermal analysis. The resulting data are consistent with the expected structure. Our products, GSNO and  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ , have a high purity (> 97 %) and a limited amount of impurities allowing their suitable use in biological experiments. The vasorelaxant effects of RSNO and the involvement of GGT and PDI were evaluated. The results indicate that purified GGT and PDI denitrosate GSNO *in vitro* with simultaneous  $\text{NO}$  production. Furthermore, we demonstrated by using an *ex vivo* model consisting in an aortic ring isolated from male Wistar rat that the vasorelaxant effect of GSNO ( $\text{EC}_{50} = 3,2 \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  M) was dependent on the endothelium and GGT and PDI activities. As concerns  $\text{BUC}(\text{NO})_2$ , this dinitrosothiol catabolized *in vitro* by PDI, is more potent ( $\text{EC}_{50} = 2,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-8}$  M) than the most of mononitrosothiols described in the literature. This vasorelaxation effect was dependent on PDI activity.

In conclusion, our data led to a better understanding of the enzymatic mechanisms involved in the vascular effects of RSNO, which will permit, in physiopathological context, to optimize the choice of the best RSNO for use in a therapeutic purpose.

**Key words:** *S*-nitrosothiols, physico-chemical characterization,  $\gamma$ -glutamyltransferase, protein disulfide isomerase, isolated aortic ring, vasorelaxation.