

Université Paris Descartes

ECOLE DOCTORALE

MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE ET ENVIRONNEMENT

UMR 8601 – Equipe Isabelle Artaud

Outils chimiques pour l'étude et la compréhension du rôle du sulfure d'hydrogène en biologie

Par Thomas ROGER

Thèse de doctorat de Chimie

Présentée et soutenue publiquement le 13/12/2013

Devant un jury composé de:

Dr. Mandon Dominique – Rapporteur

Dr. Bernard Boitrel – Rapporteur

Dr. Pascale Delangle

Dr. Frédéric Bouillaud

Dr. Erwan Galardon – Directeur de thèse



REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué à l'UFR biomédicale des Saints-Pères de l'université Paris Descartes, au sein du laboratoire de chimie et biochimie pharmacologiques et toxicologiques (LCBPT) sous la direction du Dr. Erwan Galardon que je remercie pour m'avoir encadré durant ma thèse, de m'avoir fait partager sa rigueur, son sens critique et de m'avoir poussé toujours plus loin.

Je remercie les membres du jury les Dr. Dominique Mandon, Dr. Bernard Boitrel, Dr. Pascale Delangle et le Dr. Frédéric Bouillaud d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci également aux personnes avec qui j'ai collaborées, à savoir le Dr. Frédéric Bouillaud et Céline Ransy, les laboratoires Servier, l'équipe du Pr. Alain Tomas, et le Dr. Françoise Raynaud.

Je souhaite aussi remercier les autres membres de l'équipe, en commençant par le Dr. Isabelle Artaud, à qui j'adresse tous mes vœux pour un prompt rétablissement, qui a été là pour m'encourager et m'ouvrir de nouveaux horizons professionnels. Je n'oublie bien sûr pas les Dr. Rodolphe Alves de Souza, Anas Allam & Dominique Padovani, trio de choc et correcteurs hors pairs, ainsi que Sandy Compain pour ses relectures de dernière minute et les discussions culinaires. Merci à Assia Hessani qui m'a fait partager sa bonne humeur, et qui a su faire preuve de patience et de persévérance, qualités nécessaires pour sortir mes produits !

Evidemment, un grand merci au laboratoire dans son ensemble, en commençant par mes correcteurs Emilie euh...non, Aurélie (!), Tinetine, Citrate, Cindy, Siasia, 'Nounet, Dodolphe, et le Créateur. Un clin d'œil à Lolo et Tuture, Hamid, Arnaud et Lilou, Pascalou, Andrea, à ceux partis avant moi, Laurence, Mickey, Lofti et Jérôme (n'oublie pas de chanter...), aux stagiaires Blinette, Caca et Lotlotte et bien sûr à Peter et Morgane pour m'avoir fait aimer la chimie.

Je termine enfin ces remerciements par la personne sans qui rien n'aurait été possible, ma future femme FANG Kexin, 爱你一辈子.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	2
Table des matières	3
Table des abréviations	6
Chapitre I : Introduction générale	7
I H ₂ S : Polluant environnemental	7
II Les transmetteurs gazeux	8
1. Historique	9
2. NO & CO	10
III H ₂ S : le troisième transmetteur gazeux	13
1. Propriétés physicochimiques	13
2. Biosynthèse chez les mammifères	15
3. Catabolisme	22
4. Effets biologiques	25
5. Mécanismes d'action	27
IV Outils moléculaires pour l'étude d'H ₂ S	36
1. Détecter et quantifier H ₂ S	37
2. Libérer du sulfure d'hydrogène : les donneurs	50
V Objectifs de thèse	56
Chapitre II : Sondes à sulfure d'hydrogène	58

I	Sondes basées sur le ruthénium _____	59
1.	Principe	59
2.	Synthèse	60
3.	Études de réactivité	62
4.	Conclusion	68
II	Sonde basée sur le cobalt _____	68
1.	Principe	68
2.	Synthèse	70
3.	Études de réactivité	77
III	Conclusion du chapitre II : Sondes à sulfure d'hydrogène _____	82
Chapitre III : Synthèse d'un complexe Fe-SH comportant une liaison hydrogène		83
I	Chimie de coordination d'H ₂ S _____	83
II	Réactivité des complexes III-1 et III-2 avec H ₂ S _____	85
1.	Choix du complexe	85
2.	Synthèse	86
3.	Publication	88
III	Réactivité du complexe III-2 avec les thiols _____	101
1.	Avec l'éthanethiol.....	101
2.	Avec le thiophénol.....	101
IV	Conclusion du chapitre III : Synthèse d'un complexe Fe-SH comportant une liaison hydrogène _____	104

Chapitre IV : Donneurs lents d'H ₂ S	105
I Donneurs à zinc	105
II Donneurs de type dithiopéroxyanhydride	109
1. Publication	110
2. Études mécanistiques.....	115
III Conclusion du chapitre IV : Donneurs lents d'H ₂ S	118
Chapitre V : Conclusion générale et perspectives	119
I Conclusion générale	119
II Perspectives	123
Partie expérimentale	124

TABLE DES ABREVIATIONS

3-MST : 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	eq : Équivalent
ADT-OH : Anéthole dithiolethione	FAD : Flavine adenine dinucléotide
AIBN : Azobisisobutyronitrile	GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdien	GSH : Glutathion
AMS : Allyl méthylsulfure	GSSG : Glutathiondisulfure
ATP : Adénosine triphosphate	HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
bipy : 2,2'-Bipyridine	HMBC : Heteronuclear multiple bond correlation
CAT : Cystéine aminotransférase	HO : Hème oxygénase
CBS : Cystathionine- β -synthase	IBX : Acide 2-iodoxybenzoïque
Cco : Cytochrome c oxydase	LC50 : Median lethal concentration
cGMP : Guanosine monophosphate cyclique	MLCT : Transfert de charge métal vers ligand
COSY : 2D correlation spectroscopy	NBS : N-Bromosuccinimide
CSE : Cystathionine- γ -lyase	NOS : NO synthase
Cys : Cystéine	PBS : Phosphate buffer solution
DADS : Diallyldisulfure	PET : Transfert d'électron photoinduit
DAO : D-aminoacid oxidase	pH : Potentiel d'hydrogène
DAS : Diallylsulfure	PhSH : Thiophénol
DATS : Diallyltrisulfure	RMN : Résonance magnétique nucléaire
DCM : Dichlorométhane	RT : Température ambiante
DMF : Diméthylformamide	SAM : S-adénosylméthionine
DMSO : Diméthylsulfoxyde	sGC : Cyclase soluble
DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine	sl : Singulet large
DPA : Dipicolylamine	SQR : Sulfide quinone réductase
DPDS : Dipropyldisulfure	THF : Tétrahydrofurane
Dz : Dansyle	TPA : Tris(2-pyridylmethyl)amine
EDRF : Endothelium-derived relaxing factor	Trx : Thiorédoxine
en : Éthylènediamine	λ_{em} : Longueur d'onde d'émission
ep : Épaulement	λ_{ex} : Longueur d'onde d'excitation

I H₂S : Polluant environnemental

H₂S fut isolé pour la première fois par Carl Wilhelm Scheele,^[1] un brillant chimiste suédois du XVIII^e siècle qui fut le premier à identifier le tungstène, le molybdène, le barium, l'hydrogène et le chlore. Il l'obtint en 1777 lorsqu'il traita de la pyrite avec un acide minéral. Il nomma le gaz nauséabond qui s'échappait de la réaction « Schwefelluft » (air soufré).

Pendant plus de deux siècles, ce gaz, maintenant généralement appelé « sulfure d'hydrogène » ou « hydrogène sulfuré », a été considéré comme un polluant environnemental et est demeuré connu pour son odeur caractéristique d'œuf pourri ainsi que pour sa toxicité équivalente à cinq fois celle du monoxyde de carbone.^[1] Les êtres humains peuvent en effet détecter sa présence dans l'air à moins d'1 ppm, perdent connaissance à 500 ppm et une inspiration d'une concentration supérieure peut se révéler mortelle, comme visible sur le Tableau A1.^[2]

Concentration of H ₂ S ppm	mg m ⁻³	Physiological responses
0.003–0.02	0.0042–0.028	Odor threshold
3–10	4–14	Obvious unpleasant odor
20–30	28–42	Strong offensive odor (“rotten eggs”)
30	42	Sickening sweet odor
50	70	Conjunctival irritation
50–100	70–140	Irritation of respiratory tract
100–200	140–280	Loss of smell (olfactory fatigue) ^b
150–200	210–280	Olfactory paralysis ^b
250–500	350–700	Pulmonary edema
500	700	Anxiety, headache, ataxia, dizziness, stimulation of respiration, amnesia, unconsciousness (“knockdown”)
500–1000	700–1400	Respiratory paralysis leading to death, immediate collapse, neural paralysis, cardiac arrhythmias, death

Tableau A1 : Réponses physiologiques à différentes concentrations d'H₂S^[2]

Cette dernière propriété a mené à classer H₂S dans les armes chimiques potentielles et plus récemment, le scandale de l'algue verte sur les côtes bretonnes en 2009 a rappelé au

grand public que les émanations d'H₂S, alors qualifié de « poison brutal », pouvaient entraîner la mort d'un cheval et la perte de conscience de son cavalier.^[3]

Malgré cette toxicité, des organismes ont su s'adapter aux milieux riches en sulfure d'hydrogène, comme des bactéries présentes dans les boues en anoxie,^[4] ou bien encore des coquillages^[5] et des vers marins géants qui réussissent même à en tirer avantage, l'utilisant alors en tant que source d'énergie.^[6]

Des voies de biosynthèse du sulfure d'hydrogène sont aussi connues depuis plusieurs décennies chez les mammifères, mais ce n'est qu'au début du 21^{ème} siècle qu'on lui a attribué un rôle biologique : H₂S est un transmetteur gazeux.^[7]

II Les transmetteurs gazeux

En 2002, *Wang R.* définit un gasotransmetteur comme une molécule répondant aux critères suivants :^[8]

- i. Être un gaz, capable de libre diffusion à travers les membranes, c'est-à-dire de pénétrer dans les membranes sans utiliser de transporteurs,
- ii. Être synthétisé de manière endogène par les enzymes, et cette production doit être régulée,
- iii. Avoir des fonctions précises aux concentrations physiologiques,
- iv. Leurs effets cellulaires peuvent faire intervenir des seconds messagers, mais ils doivent avoir des cibles cellulaires ou moléculaires.

À ce jour, seuls les monoxydes d'azote et de carbone, ainsi que le sulfure d'hydrogène répondent à ces critères, mais d'autres molécules pourraient rejoindre cette famille, comme par exemple l'ammoniaque ou le dioxyde de soufre.

1. HISTORIQUE

Le monoxyde d'azote NO fut la première molécule à avoir atteint le statut de gasotransmetteur dans les années 1980. Il fut d'abord découvert comme le médiateur d'une fonction biologique grâce à l'utilisation de donneurs chimiques, sans que sa biosynthèse ne soit connue. À l'inverse, des synthèses endogènes étaient démontrées depuis fort longtemps pour le monoxyde de carbone et le sulfure d'hydrogène (découvertes respectivement en 1969^[9] et en 1982^[10]) avant que leur rôle en biologie ne soit établi. En effet, avant la découverte de NO, leur toxicité ne laissait pas présager un rôle physiologique.

Durant les années 1980, des études du groupe de *Furchgott* portant sur la vasorelaxation montrèrent que celle-ci n'était possible qu'en présence de la couche de cellules endothéliales, c'est-à-dire celles en contact avec la lumière du vaisseau.^[11] Il en conclut qu'un facteur transmettant le signal de la relaxation (EDRF) était nécessaire et que l'acétylcholine, qui était utilisée jusqu'alors, stimulait la production de ce facteur mais n'était pas la cause directe de la relaxation. Le groupe d'*Ignarro*, en 1987, mis en évidence la nature de ce facteur comme étant le monoxyde d'azote NO,^[12] en démontrant que les effets induits par des donneurs de NO étaient identiques à ceux observés avec l'EDRF. Ces travaux furent complétés en 1989 par le groupe de *Nathan* qui identifia NO comme étant aussi la substance responsable de l'effet cytotoxique des macrophages activés.^[13] Ces résultats pionniers furent rapidement suivis d'avancées considérables dans la compréhension des rôles biologiques de NO et des mécanismes sous-jacents, de sorte qu'il fut élu molécule de l'année 1992 par le magazine *Science*, et que les chercheurs l'ayant découvert se virent attribuer le prix Nobel en 1996.

Suite à ces travaux sur NO, et à des études démontrant que CO, comme NO, est capable d'activer la guanylate cyclase, le groupe de *Snyder* a proposé en 1993 que le monoxyde de carbone puisse lui aussi être un gasotransmetteur, notamment dans le cerveau qui contient une forte concentration d'ARNm d'une isoforme d'enzyme responsable la production de CO.^[14]

C'est aussi dans le cerveau que le sulfure d'hydrogène a pour la première fois été proposé comme appartenant à la famille des gasotransmetteurs par le groupe de *Kimura* en 1996, après y avoir mis en évidence sa synthèse endogène.^[7] Mais il a fallu attendre 2001 pour qu'un premier rôle physiologique – la vasorelaxation – ne lui soit attribué.^[15] Le groupe de *Snyder* en 2008 a finalement réussi à corréliser la production endogène d'H₂S à ses effets physiologiques en mettant en évidence une hypertension chez des souris où un gène codant pour une enzyme responsable de sa production était délété.^[16]

2. NO & CO

Le monoxyde d'azote est synthétisé à partir de L-arginine par les NO-synthases (NOS). Les NOS sont des enzymes héminiques qui existent sous trois isoformes : la nNOS (neuronale) et la eNOS (endothéliale) activées par la voie calcium-calmoduline, ainsi que la iNOS (inductible), activée par des pathogènes comme des cytokines pro-inflammatoires.^[17] La production de NO est décrite dans le schéma ci-dessous (Schéma A1).

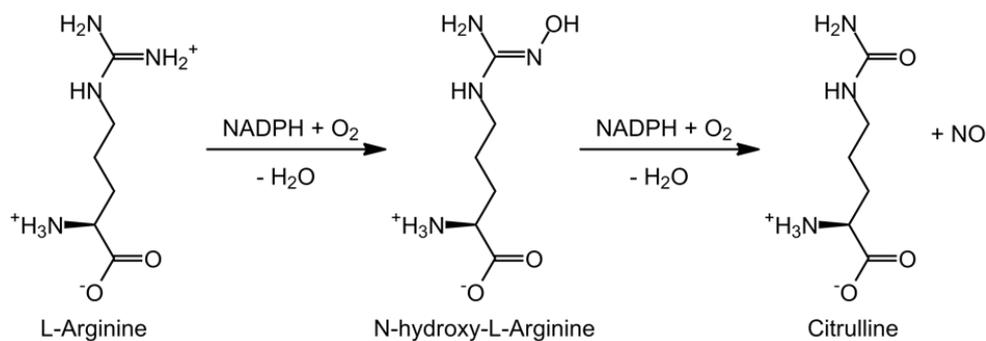


Schéma A1 : Production de monoxyde d'azote par les NO-synthases

Ce sont aussi des enzymes héminiques, les hèmes oxygénases (HO), qui sont responsables de la production du monoxyde de carbone. Ces enzymes existent sous plusieurs isoformes, les deux principales étant les HO-1 et HO-2. HO-1 est une enzyme induite lors de stress cellulaire alors que HO-2 est constitutive et activée par la voie calcium-calmoduline. L'activité des HO consiste à dégrader la forme ferrique des hèmes en biliverdine. Dans un

premier temps, l'hème est oxydé en verdohème, libérant CO (schéma A2). Le verdohème est ensuite oxydé en biliverdine et le fer est finalement relargué.

Contrairement à la citrulline formée par la NOS, qui n'a aucun rôle biologique connu, les hèmes oxygénases, en plus de produire le monoxyde de carbone, jouent un rôle dans l'homéostasie du fer en le recyclant. De plus la biliverdine est elle-même rapidement réduite en bilirubine (Schéma A2), un composé biologiquement actif, principalement décrit comme un antioxydant,^[18] mais aussi supposé être anti-mutagène.^[19]

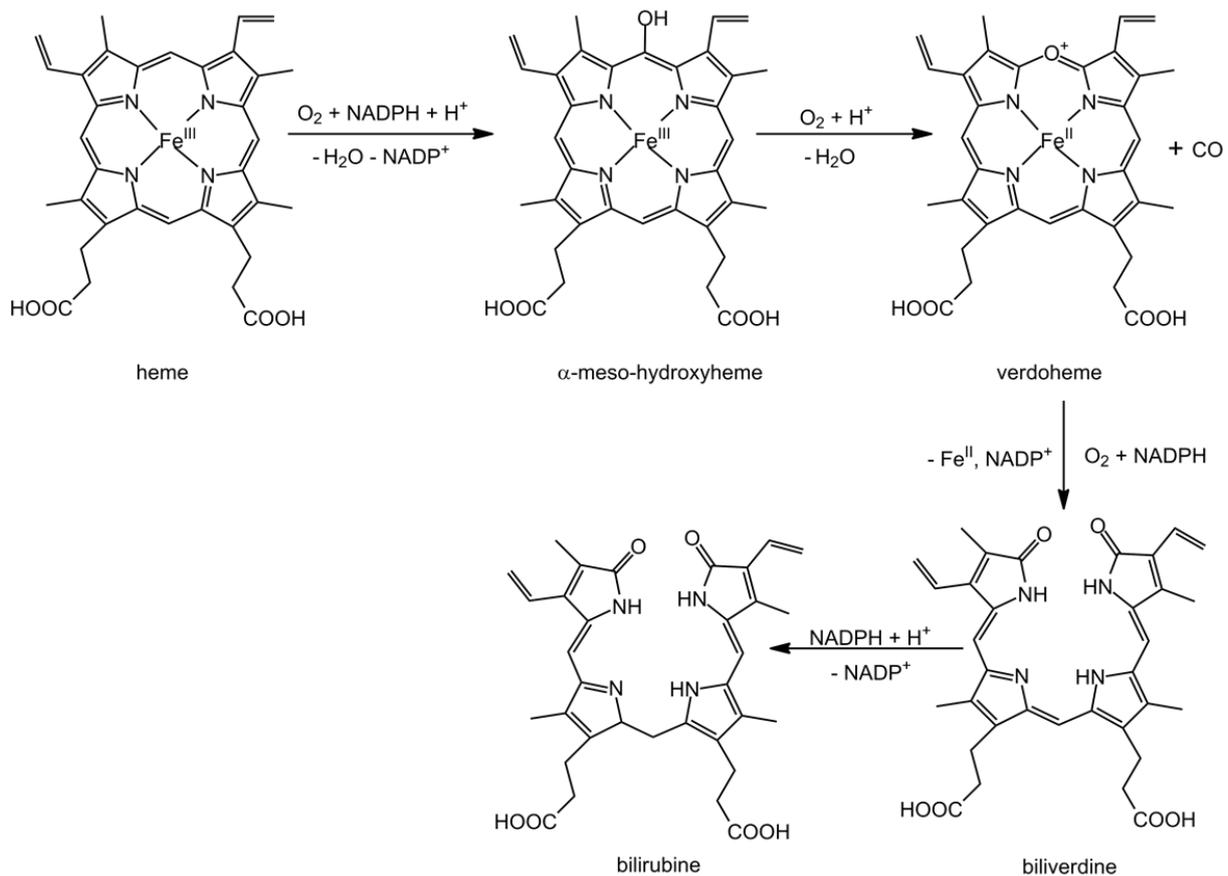


Schéma A2 : Production de CO par dégradation de l'hème b des globules rouges ; oxydation du verdohème en biliverdine par l'hème oxygénase et réduction en bilirubine par la biliverdin reductase

Il est bien évidemment hors du cadre de ce manuscrit de nous intéresser aux effets physiologiques de NO et CO. Nous nous contenterons de discuter brièvement d'une de leurs propriétés majeures, que l'on retrouvera par la suite pour H₂S : leur activité vasorelaxante.

En effet, les deux molécules possèdent une cible commune : la guanylate cyclase soluble (sGC), une autre hémoprotéine. Celle-ci peut être activée par les deux gasotransmetteurs afin d'augmenter la concentration intracellulaire du second messenger guanosine monophosphate cyclique (cGMP), ce qui a pour effet de déclencher une cascade de processus impliqués dans la contraction musculaire (Schéma A3).^[20]

Le fait que ces gasotransmetteurs partagent au moins une cible commune pose la question d'une régulation croisée, une question que l'on retrouvera par la suite avec H₂S.

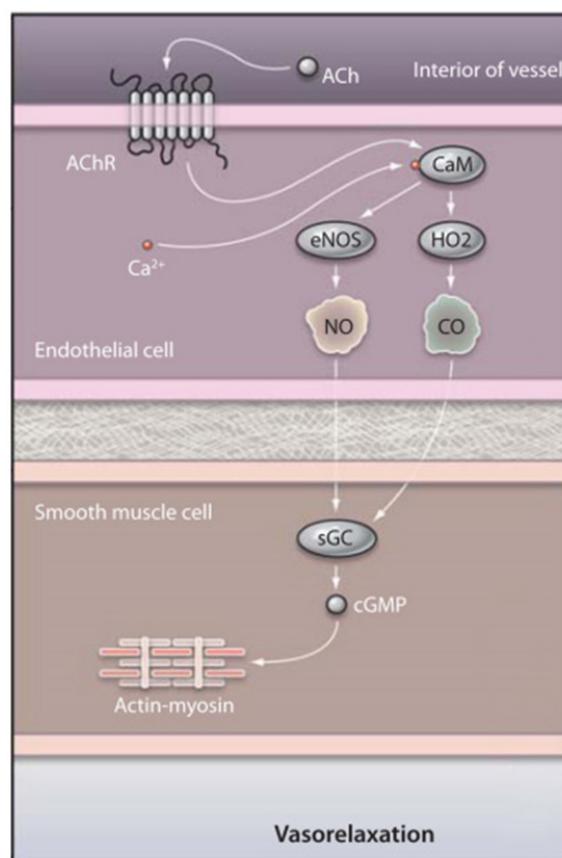


Schéma A3 : Voie de signalisation utilisée par NO et CO pour aboutir à la vasorelaxation après stimulation des récepteurs à acétylcholine^[21]

III H₂S : le troisième transmetteur gazeux

Avant de nous intéresser à son implication en biologie, nous allons tout d'abord présenter quelques propriétés physicochimiques d'H₂S.

1. PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES

Le sulfure d'hydrogène est un gaz incolore à l'odeur caractéristique d'œuf pourri. Comme on peut s'y attendre en observant la position de l'atome de soufre dans le tableau de Mendeleiev, H₂S est moins polaire et plus acide que la molécule d'eau possédant la même structure électronique de valence. H₂S étant hydrophobe, il peut diffuser librement à travers les membranes,^[22] ce qui est une des propriétés nécessaires pour être un gasotransmetteur.

Il possède aussi deux pKas, le premier est proche du pH physiologique avec une valeur de 6.98 à 293 K,^[23] ce qui lui permet d'exister sous deux formes majoritaires en solution à pH 7.4 : H₂S et HS⁻. La troisième forme, dianionique, a un pKa au moins supérieur à 14 (Schéma A4). Il est estimé à environ 18.5, mais il est difficile de confirmer cette valeur, à cause de la contamination par des polysulfures pendant les mesures.^[24] Dans tous les cas, à pH physiologique, cette forme est presque exclusivement atteignable en chimie de coordination, comme dans les clusters fer-soufre par exemple. Ce premier pKa proche du pH biologique est un avantage pratique, car on peut remplacer H₂S gazeux par sa forme saline NaSH plus facile à manipuler, dès lors qu'on travaille en solution tamponnée. Il est aussi possible d'utiliser le sel de la forme dianionique Na₂S, en prêtant toutefois attention à maîtriser le pH du milieu, celui-ci risquant de s'alcaliniser. *Dans la suite de ce manuscrit, nous utiliserons indistinctement « sulfure d'hydrogène » ou « sulfures » pour dénommer l'ensemble des espèces présentes dans les milieux tamponnés ou biologiques, et nous utiliserons le terme « hydrosulfure » pour l'espèce HS⁻ utilisée dans un solvant apolaire.*

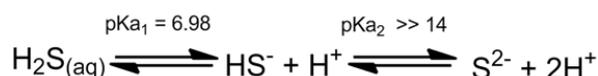


Schéma A4 : Équilibres acido-basiques du sulfure d'hydrogène en milieu aqueux

C'est cette notion d'équilibre acido-basique qui ajoute un degré de complexité supplémentaire à l'étude d'H₂S, par rapport aux deux autres gasotransmetteurs NO et CO. En effet, la forme neutre lipophile est relativement inerte chimiquement mais peut diffuser, alors que la forme anionique est polaire et plus réactive mais ne peut pas librement passer les membranes.

A l'image des thiols, H₂S est un réducteur. Il est souvent considéré comme un réducteur faible dans la littérature en comparaison des thiols biologiques comme le glutathion ou la cystéine sur la base du potentiel standard du couple $\text{H}_2\text{S} = \text{S}^0 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$ ($E_0' = 170 \text{ mV}$ ^[25] contre -200 à -300 mV respectivement pour $2 \text{RSH} = \text{RSSR} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$). Cependant, bien que le couple H₂S/HSSH soit régulièrement cité d'un point de vue mécanistique, son potentiel n'a jamais été déterminé. H₂S peut donc jouer un rôle antioxydant en réduisant des oxydants biologiques puissants à un ou deux électrons, mais comme ces réactions sont similaires à celles connues pour les thiols, nous nous contenterons de les présenter dans les tableaux suivants (Tableaux A2 et A3).^[26]

Oxidants	$k \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$	Conditions
O ₂ ⁻	1.5×10^6 $(6.5 \pm 0.9) \times 10^4$	pH 7.8 pH 7.8 and 25 °C
H ₂ O ₂	0.73 ± 0.03 1.22 ~1	pH 7.4 and 37 °C pH 7.4 and 25 °C ^a pH 7.8
HOCl/ ⁻ OCl	2×10^9 $(8 \pm 3) \times 10^7$	pH 7.4, 25 °C and ionic strength 1.0 M pH 7.4 and 37 °C
ONOOH/ONOO ⁻	$(4.8 \pm 1.4) \times 10^3$ $(8 \pm 2) \times 10^3$ $(3.3 \pm 0.4) \times 10^3$	pH 7.4 and 37 °C pH 7.4 and 37 °C pH 7.4 and 23 °C
·OH	1.5×10^{10} 9.0×10^9	pH 6 pH 10.5
·NO ₂	$(3.0 \pm 0.3) \times 10^6$ $(1.2 \pm 0.1) \times 10^7$	pH 6 and 25 °C pH 7.5 and 25 °C
CO ₃ ⁻	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^8$	pH 7.0 and 20 ± 2 °C

Tableau A2 : Constantes de vitesse de réactions d'H₂S avec différents oxydants

	Hydrogen sulfide (pK _a 7.0)	Cysteine (pK _a 8.1–8.4)	Glutathione (pK _a 8.6–9.2)
<i>Two-electron oxidants</i>			
Peroxynitrite	4.8 × 10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) This work	4.5 × 10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) [78]	1.3 × 10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) [50,66]
Hydrogen peroxide	0.73 M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) This work	2.9 M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) [79]	0.87 M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) [79]
Hypochlorite	8 × 10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) This work	3.2 × 10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 25 °C) [46]	≥ 10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 25 °C) [80]
TauCl	303 M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) This work	205 M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 24 °C) [22]	115 M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.4, 24 °C) [22]
<i>One-electron oxidants</i>			
*NO ₂	1.2 × 10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.5, 25 °C) This work	5.0 × 10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.0) [27]	2.0 × 10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.0) [27]
HO*	1.5 × 10 ¹⁰ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 6) [36]	3.5 × 10 ¹⁰ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.0) [36]	2.3 × 10 ¹⁰ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 6.8) [36]
CO ₃ ⁻	2.0 × 10 ⁸ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.0) [40]	4.6 × 10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.0) [36]	5.3 × 10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹ (pH 7.0) [36]

Tableau A3 : Comparaison des constantes de vitesse de réactions entre H₂S, la cystéine ou le glutathion avec différents oxydants à un ou deux électrons

2. BIOSYNTHESE CHEZ LES MAMMIFERES

Le métabolisme des dérivés soufrés procure à la cellule d'importants métabolites tels que la S-adénosylméthionine (SAM),^[27] le glutathion,^[28] la taurine,^[29] la cystéine^[10] ou bien encore le sulfure d'hydrogène (Schéma A5).^[7, 30]

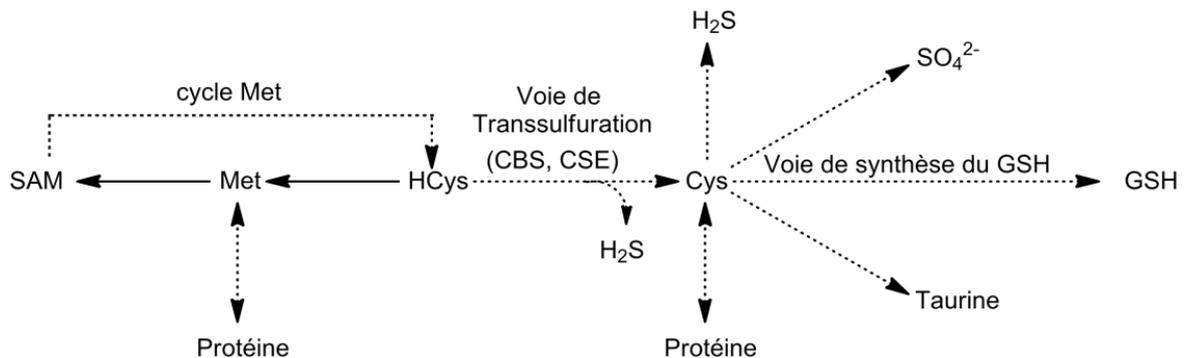


Schéma A5 : Principales voies de métabolisation d'acides aminés soufrés

Les séquences métaboliques ubiquitaires dans la plupart des tissus animaux qui aboutissent à la formation de ces composés partent de la méthionine. Elle régule ces différents systèmes et influence l'homéostasie rédox de la cellule *via* le métabolisme du soufre et la voie de transsulfuration.

2.1. LA VOIE DE TRANSSULFURATION

La voie de transsulfuration est composée de deux enzymes, la cystathionine- β -synthase et la cystathionine- γ -lyase, et a pour rôle principal le catabolisme de l'homocystéine, une molécule associée aux maladies cardiovasculaires, aux accidents vasculaires cérébraux et aux défauts du tube neural.^[31] De plus, des concentrations élevées d'homocystéine peuvent favoriser la prolifération de certaines cellules tumorales et conduire à une augmentation dommageable du stress oxydant.^[32] Des études de flux cellulaire ont montré que la cystéine produite par la voie de transsulfuration sera utilisée à 50% pour former du glutathion.^[33]

Ce sont ces deux enzymes qui sont essentiellement responsables de la biosynthèse du sulfure d'hydrogène à partir de cystéine ou d'homocystéine, dans le cerveau pour la CBS et dans le système périphérique pour la CSE (Schéma A6).^[34]

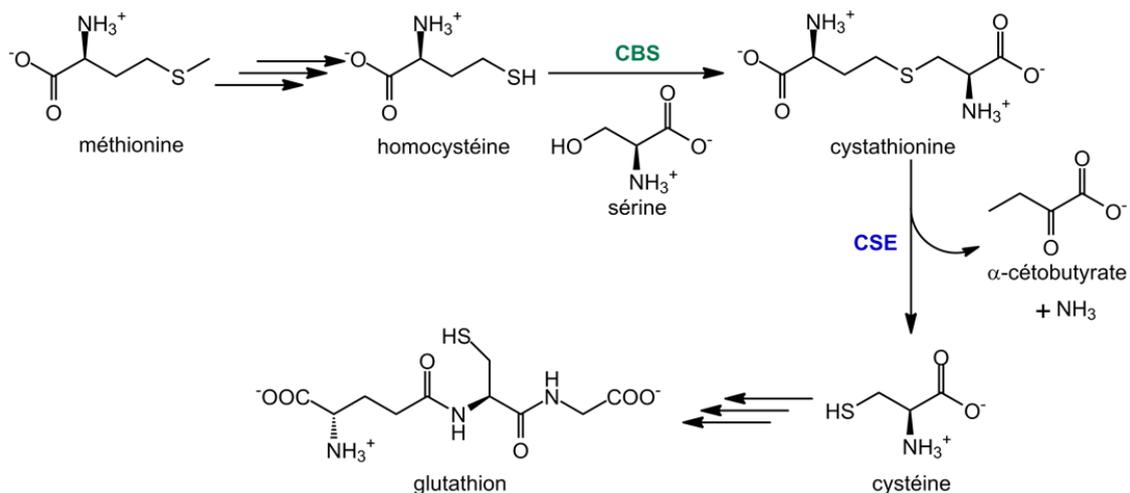


Schéma A6 : Métabolisme d'acides aminés soufrés par la CBS et la CSE

2.1.1. La cystathionine- β -synthase (CBS)

La CBS est une enzyme héminique à phosphate de pyridoxal (PLP) contenant un domaine de fixation à l'hème dans sa partie N-terminale de même qu'une répétition en tandem de « domaines CBS » dans sa partie C-terminale. L'hème apparaît comme un senseur rédox alors que les « domaines CBS » agissent comme un inhibiteur de la fonction enzymatique puisque leur délétion conduit à une forme plus active de l'enzyme.^[35] Ainsi, l'hème à l'état ferreux peut fixer les monoxydes d'azote (NO) et de carbone (CO), conduisant à une inhibition de l'activité enzymatique.^[36] Cette inhibition est réversible par oxydation en présence d'oxygène de l'hème ferreux en hème ferrique,^[37] suggérant une implication de la CBS dans une régulation croisée des différents neuromédiateurs. Les « domaines CBS » de la portion C-terminale peuvent quant à eux lier la SAM qui d'une part stabilise l'enzyme et d'autre part agit comme un activateur allostérique de la CBS.^[38]

La réaction canonique catalysée par la CBS est la substitution en β de la sérine par l'homocystéine pour former la cystathionine. Des études biochimiques et structurales ont permis de mettre en évidence le rôle de différents résidus du site actif de la CBS dans la formation des différents intermédiaires rencontrés au cours de cette réaction (Schéma A7).^[38d]

La réaction est initiée par la fixation de la sérine au site actif et la formation concomitante d'une aldimine externe [I]. Cette dernière est déprotonée par une lysine adjacente pour former le composé [II] qui est déshydraté selon un mécanisme classique des enzymes à PLP faisant intervenir la forme quinoïde [III] pour former l'aminoacrylate [IV]. Enfin, la réaction de condensation de l'homocystéine sur l'aminoacrylate forme la cystathionine, libérée par reformation de l'aldimine interne de départ.

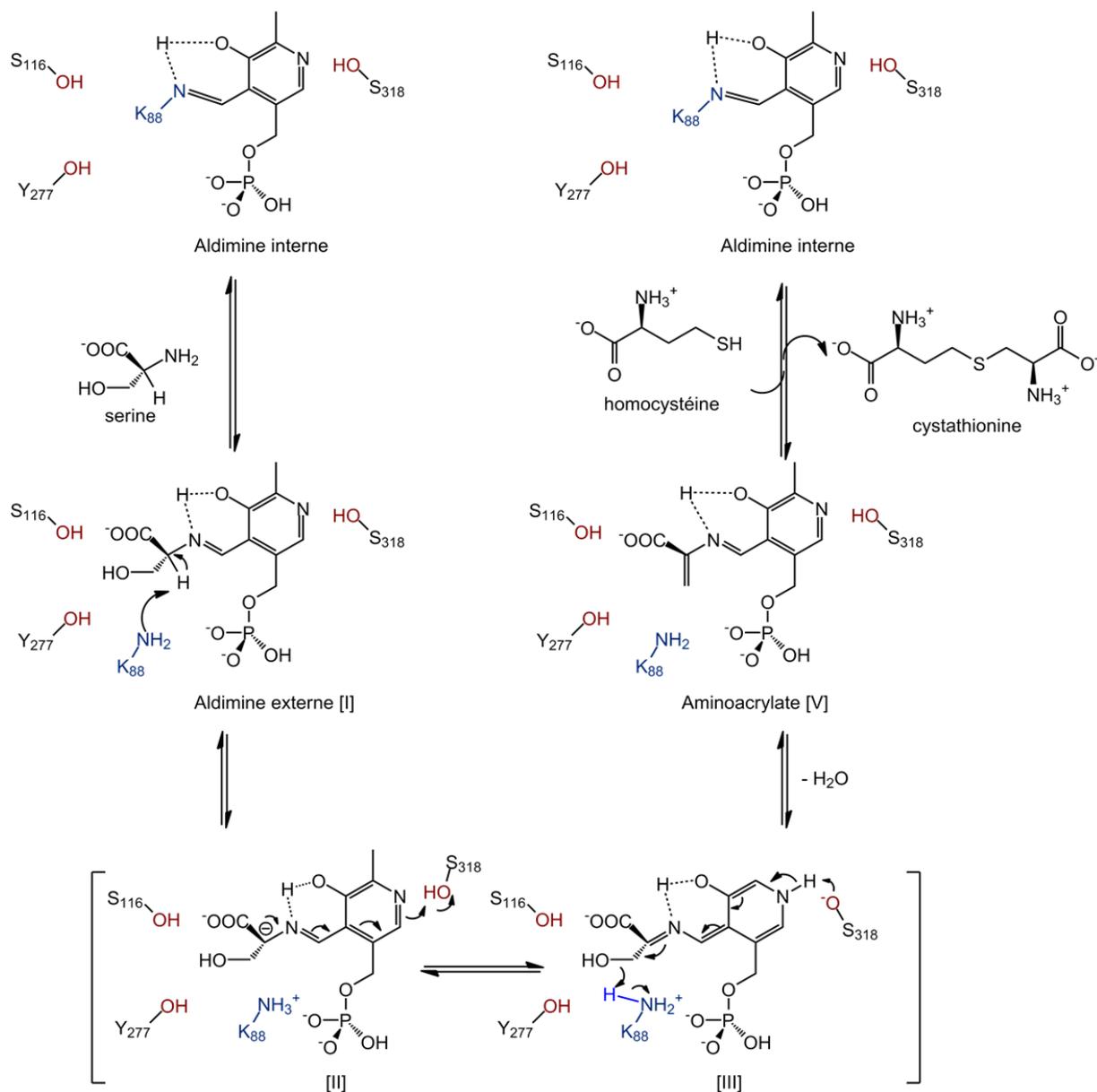


Schéma A7 : Mécanisme la réaction canonique de la CBS^[38d]

En substituant la sérine par la cystéine, la CBS peut produire du H₂S par des réactions de substitution en β de la cystéine avec différents thiols.^[39] Il a été mis en évidence que cette production de sulfure d'hydrogène s'effectuait principalement par réaction avec l'homocystéine (Schéma A8, réaction 1), pour produire la cystathionine. La réaction de substitution avec une autre cystéine (Schéma A8, réaction 2) conduisant à la lanthionine, de même que l'hydrolyse de l'intermédiaire aminoacrylate pour former de la sérine

(Schéma A8, réaction 3) sont quant à elles minoritaires.^[34b] Une comparaison des paramètres cinétiques (V_{max} , K_M , K_i) observés pour la réaction canonique et la réaction de substitution en β de la cystéine par l'homocystéine révèle que cette dernière représente une source alternative non-négligeable à la voie de transsulfuration classique pour produire de la cystathionine, en présence de SAM.^[34b] Par conséquent, la SAM est un facteur crucial pour réguler la production d' H_2S par la CBS sans pour autant affecter le devenir de la voie de transsulfuration. Ainsi, en absence de ce régulateur allostérique, la cystathionine est majoritairement produite par la réaction de condensation de la sérine et de l'homocystéine.^[40]

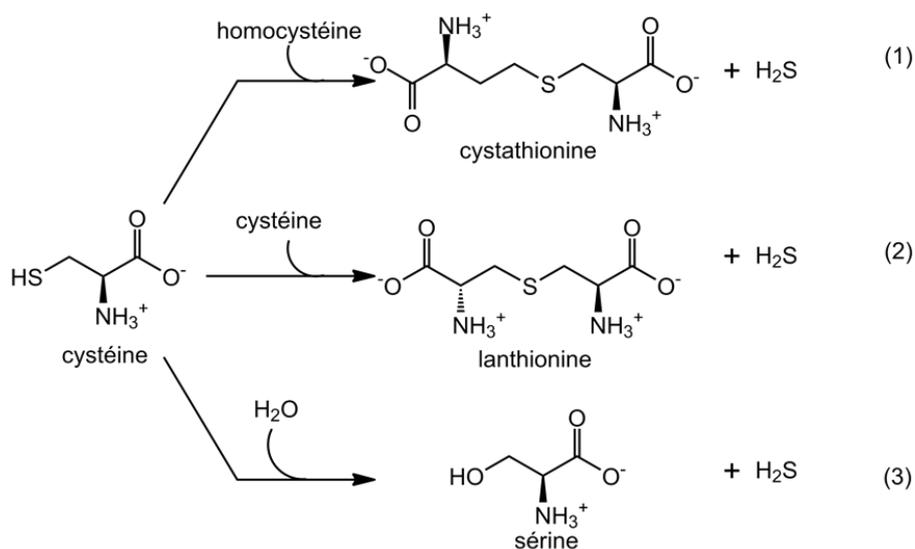


Schéma A8 : Biosynthèse d' H_2S par la CBS

2.1.2. La cystathionine- γ -lyase (CSE)

La CSE est la seconde enzyme PLP-dépendante de la voie de transsulfuration. Elle reçoit la cystathionine de la CBS et la convertit *via* une réaction d'élimination en γ en cystéine, en α -cétobutyrate et en ammoniac (Schéma A9).^[34a]

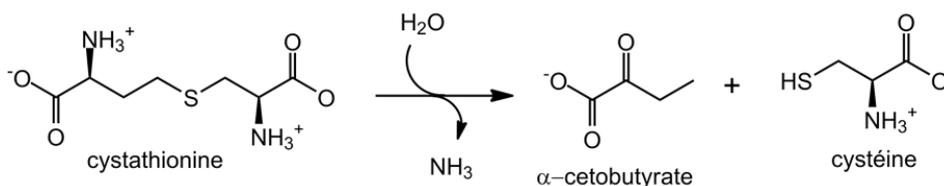


Schéma A9 : Réaction canonique de la CSE

Cette enzyme homotétramérique a été montrée comme étant la principale source de production d'H₂S dans le système périphérique chez les mammifères. Ainsi, des souris knockout n'exprimant pas la CSE présentent une diminution de 80% de la concentration d'H₂S dans le sang.^[16] De manière intéressante, la même étude montre que ces souris exhibent des concentrations élevées d'homocystéine, mettant pour la première fois en évidence un rôle de la CSE dans le catabolisme de l'homocystéine.

Les réactions catalysées par la CSE ne se limitent pas à des réactions d'élimination ou de substitution en γ ,^[34a] et plusieurs réactions utilisent la cystéine et/ou l'homocystéine pour produire du sulfure d'hydrogène selon les réactions décrites dans le Schéma A10. Parmi celles-ci, la plus importante est l'élimination en α,β de la cystéine avec la production concomitante de pyruvate et d'ammoniaque (Schéma A10, réaction 5).

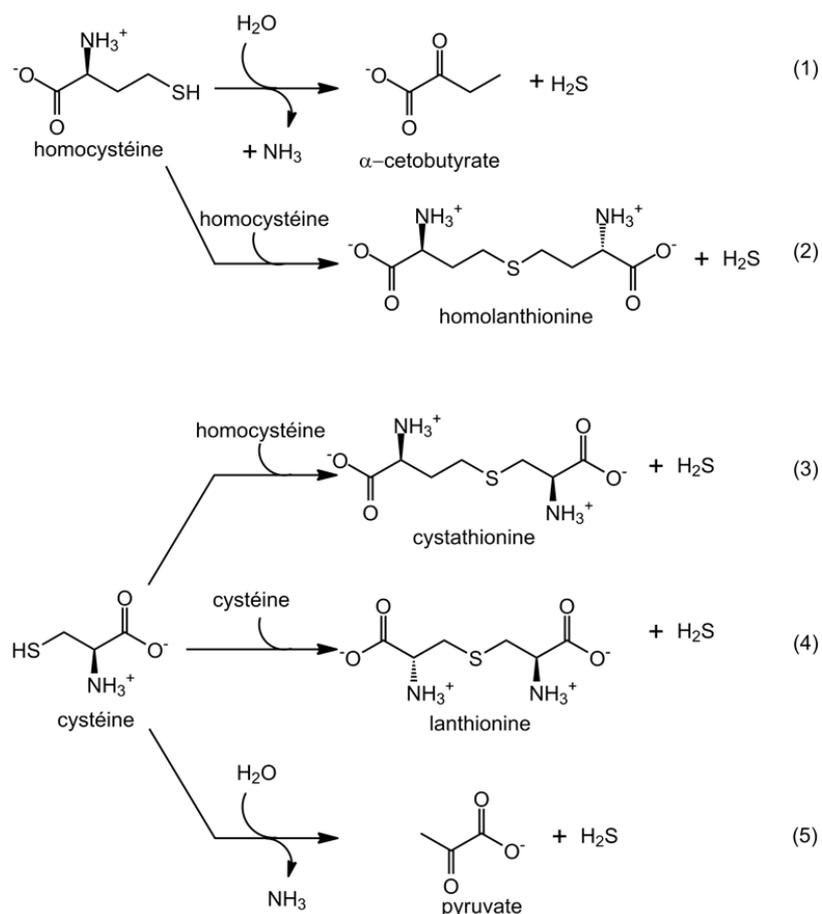


Schéma A10 : Biosynthèse d'H₂S par la CSE

2.2. LA 3-MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE (3-MST)

En dehors des deux enzymes impliquées dans la transsulfuration, une troisième enzyme produisant du sulfure d'hydrogène a été mise en évidence chez les mammifères. Celle-ci est mitochondriale et impliquée dans le cerveau.^[41] La 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase (3-MST) est une enzyme appartenant à la famille des sulfurtransférases possédant 60% d'homologie de séquence avec la rhodanèse. Le substrat d'intérêt, le 3-mercaptopyruvate, est formé en même temps que du glutamate à partir de cystéine et d' α -cétoglutarate par une enzyme PLP-dépendante, la cystéine aminotransférase (CAT), ou à partir de D-cystéine par la D-aminoacid oxidase (DAO), une enzyme présente dans les peroxysomes (Schéma A11).^[42] La 3-MST, qui présente une cystéine libre au site actif (3-MST—Cys—SH), réagit avec la fonction thiol du 3-mercaptopyruvate pour former du pyruvate et le persulfure 3-MST—Cys—SSH, mis en évidence par la réaction classique avec du cyanure pour former du thiocyanate.^[43] Le sulfure d'hydrogène est ensuite libéré par réaction avec des dithiols comme la thiorédoxine et l'acide dihydrolipoïque^[44] ou, moins efficacement, par des monothiols tels que la cystéine, l'homocystéine ou le glutathion.^[45] Le groupe de *Nagahara* a de plus montré que les oxydants inhibaient l'enzyme par formation de pont disulfure et/ou du dérivé sulfénate de la cystéine et que la thiorédoxine restaurait son activité, démontrant ainsi un contrôle rédox de la 3-MST.^[46]

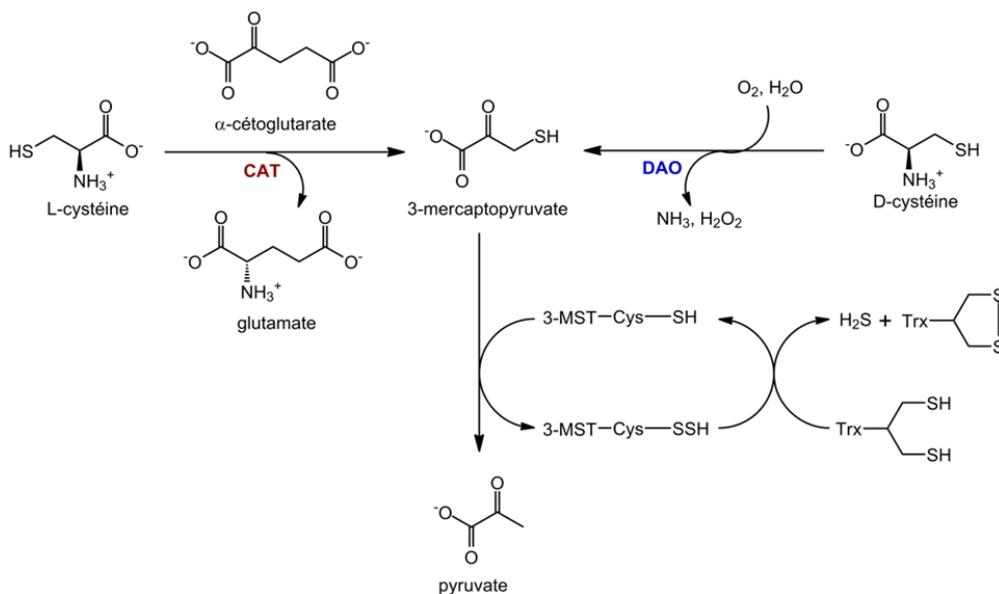


Schéma A11 : Production mitochondriale d'H₂S par les enzymes CAT/3-MST ou DAO/3-MST avec la thiorédoxine (Trx)

3. CATABOLISME

Après avoir passé en revue les différentes méthodes permettant aux mammifères de produire H₂S, nous nous intéresserons à son catabolisme. En effet, bien que le sulfure d'hydrogène puisse intervenir dans de nombreux effets biologiques, il reste une molécule toxique, ce qui implique une régulation efficace de sa concentration. Les études du groupe de *Banerjee* ont montré que la production d'H₂S était rapide et en flux continu (plusieurs millimoles par jour pour un être humain de 70 kg), suggérant une dégradation rapide par des unités de détoxification efficaces.^[47] L'étude d'organismes vivant dans des milieux riches en H₂S et qui ont dû développer de tels processus de défense, comme le ver *Arenicola marina*, a mené à l'identification et à la définition de « l'unité d'oxydation du sulfure », aussi mise en évidence chez les mammifères.^[48] Elle est, chez ces derniers, localisée au niveau des mitochondries de la plupart des organes (foie, cœur, reins), à l'exception des cellules du système nerveux central,^[49] qui met probablement en œuvre d'autres voies d'élimination du sulfure d'hydrogène.^[50]

Le principal mécanisme d'élimination d'H₂S dans la mitochondrie, sous forme de thiosulfate S₂O₃²⁻ et de sulfate SO₄²⁻, a pour première étape une enzyme transmembranaire : la sulfide quinone reductase ou SQR.

3.1. PREMIERE ETAPE D'OXYDATION MITOCHONDRIALE D'H₂S : LA SQR

Alors que les SQR bactériennes oxydent le sulfure d'hydrogène en polysulfures,^[51] les SQR des eucaryotes empruntent une voie différente.

Le groupe de *Jorns* est à ce jour le seul à avoir purifié l'enzyme SQR humaine, et le mécanisme proposé de l'enzyme est présenté dans le Schéma A12.^[52] Celui-ci suggère la sulfhydratation de la Cys379 suivie de l'attaque de la Cys201 sur le cofacteur FAD. S'ensuit l'attaque d'un nucléophile sur le soufre distal de la thioCys379 et la réoxydation de la SQR avec libération du cofacteur FADH₂. Ce dernier est alors réoxydé par le coenzyme Q.^[52]

mononucléaire à fer non-héminique (ETHE1) ou par une enzyme à cofacteur molybdoptéridine (sulfite oxydase).

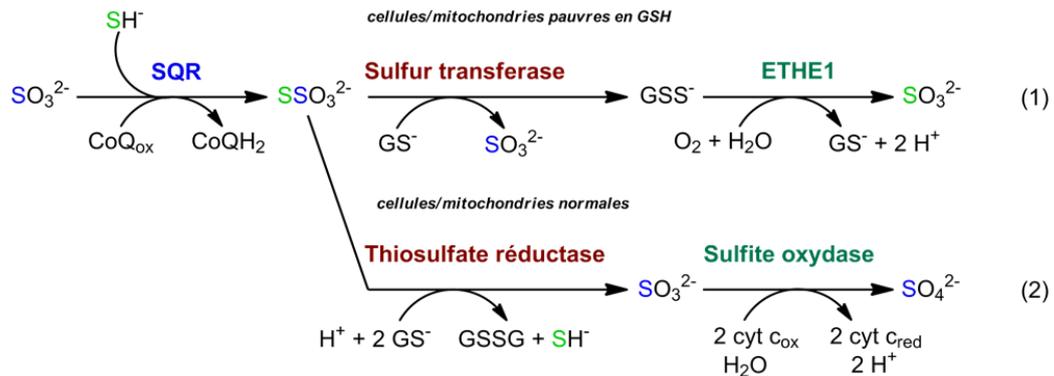


Schéma A13 : Voie d'oxydation des sulfures vue par Jorns et al.^[52]

3.3. SYSTEME D'OXYDATION MITOCHONDRIALE D'H₂S SELON BANERJEE ET AL.

Le groupe de *Banerjee* a proposé une hypothèse différente, utilisant le glutathion GSH comme accepteur du soufre de la SQR, pour former GSSH.^[53] Cette proposition est basée cette fois sur l'activité de l'enzyme ETHE1, purifiée par le groupe, qui présente en effet une affinité plus importante avec GSSH qu'avec d'autres substrats potentiels comme le persulfure du coenzyme A, la thiocystéine, le glutathion réduit ou le thiosulfate. Le GSSH ainsi formé par la SQR servirait de substrat à ETHE1, résultant globalement en une oxydation d'H₂S en sulfite. (Schéma A14).

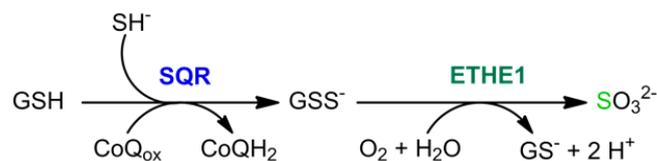


Schéma A14 : Formation du sulfite par le système proposé par Banerjee et al.^[53]

Ce sulfite pourrait être par la suite oxydé en sulfate par la sulfite oxydase, comme vu précédemment dans le système proposé par *Jorns et al.*,^[52] ou en thiosulfate par une rhodanèse

cataylsant alors une réaction inverse de sa réaction classique, c'est-à-dire par réaction du sulfite avec un persulfure pour former le thiol correspondant et SSO_3^{2-} (Schéma A15).

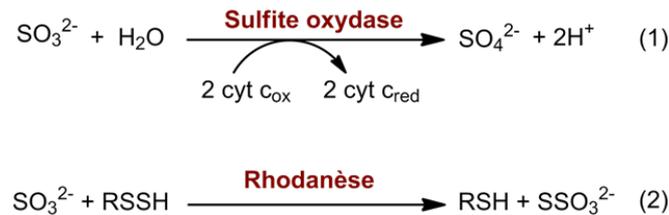


Schéma A15 : Deux voies d'oxydation du sulfite en sulfate ou thiosulfate selon Banerjee et al.^[53]

Aucune proposition n'est toutefois formulée quant au donneur de soufre nécessaire pour cette étape, ni sur la régulation des voies sulfite oxydase/rhodanèse.

Si elle a l'avantage d'être plus simple, cette hypothèse est néanmoins contredite par le fait que le glutathion est un mauvais substrat de la SQR,^[52] alors que la forte activité dioxygénase de ETHE1 vis-à-vis du persulfure du glutathion démontrée par Banerjee et al. va dans le même sens que l'hypothèse formulée par le groupe de Jorns.

4. EFFETS BIOLOGIQUES

Finalement, dans ce paragraphe, nous allons très brièvement présenter les principaux effets physiologiques attribués à H_2S . Bien que certains soient maintenant assez bien établis, d'autres nécessitent de plus amples investigations, en particulier en raison des fortes concentrations en H_2S auxquelles ils ont été observés. Il est à noter que plusieurs de ces effets sont communs à NO et CO.

4.1. VASORELAXATION

Il est maintenant clair que le sulfure d'hydrogène, tout comme les deux autres gasotransmetteurs NO et CO, joue un rôle important dans la régulation endothélium-dépendante des fonctions vasculaires. Les mécanismes de cette régulation ne sont pas encore

clairement établis, et même s'il a été proposé qu'H₂S puisse agir en favorisant l'ouverture des canaux potassiques ATP dépendants,^[15] il a récemment été mis en évidence qu'il pourrait aussi agir comme inhibiteur de l'activité phosphodiesterase PDE5A, une enzyme chargée de la dégradation de la cGMP : ainsi, il a été montré que les activités vasorelaxantes de NO et H₂S sont mutuellement dépendantes, le monoxyde d'azote activant la synthèse de la cGMP et le sulfure d'hydrogène contrôlant sa dégradation.^[54]

4.2. EFFET PRO-ANGIOGENIQUE

Ces effets d'H₂S sur le système vasculaire se retrouvent aussi dans la découverte qu'H₂S est un médiateur de l'angiogénèse.^[55] Cet effet pro-angiogénique peut être à la fois bénéfique, par exemple dans le rétablissement du flux sanguin dans des tissus ischémiques^[56] mais aussi délétère dans le rôle qu'il joue dans le développement de certains cancers comme celui du colon, dans lequel la CSE semble être fortement surexprimée.^[57]

4.3. ROLE DANS LA BIOENERGETIQUE CELLULAIRE : H₂S ET MITOCHONDRIES

En plus des effets pro-angiogéniques d'H₂S, il semblerait que son implication dans certains cancers provienne de sa faculté à interagir avec la chaîne respiratoire mitochondriale.

H₂S peut en effet, comme nous le verrons par la suite, inhiber la cytochrome c oxydase, aussi appelée complexe IV de la chaîne respiratoire, comme les autres gasotransmetteurs. La réduction de la respiration mitochondriale conduit à une baisse du métabolisme cellulaire, et le groupe de *Roth* avait ainsi induit une hibernation réversible chez des souris par inhalation de H₂S.^[58] Malheureusement, l'espoir thérapeutique suscité par cette découverte fut de courte durée, étant donné que le processus n'est pas applicable aux grands mammifères. Mais surtout, et en cela H₂S est unique parmi les gasotransmetteurs, il peut aussi agir en tant que substrat de la chaîne respiratoire mitochondriale, en fournissant des électrons au coenzyme Q à travers l'activité SQR décrite au préalable. Ainsi, l'addition de faibles concentrations de sulfure d'hydrogène conduit à une augmentation de la fonction mitochondriale de plusieurs types de cellules, en particulier des cellules cancéreuses du colon.

Enfin, l'activité de la dioxygénase mitochondriale ETHE1 nécessitant du dioxygène, elle pourrait être une des voies faisant intervenir le sulfure d'hydrogène comme senseur de l'hypoxie et ainsi protéger les cellules contre des dégâts liés à la déplétion en oxygène.^[59]

4.4. EFFETS DIVERS

De nombreuses autres fonctions physiologiques ont été proposées pour H₂S, telles que des effets anti-inflammatoires, antioxydants, anti-apoptotiques, antiagrégants, cardioprotecteurs, etc.^[60]

5. MECANISMES D'ACTION

Il est pour le moment trop tôt pour essayer de rationaliser les mécanismes moléculaires d'action du sulfure d'hydrogène en biologie. Cependant, quelques réactions l'impliquant et ayant des effets importants en biologie ont été décrites et c'est à celles-ci que nous allons maintenant nous intéresser.

5.1. LA SULFHYDRATION

5.1.1. Sulfhydration des protéines

C'est en 2009 que le groupe de *Snyder* a fait les premiers pas vers la compréhension de ces mécanismes moléculaires en introduisant une nouvelle modification post-traductionnelle sous le terme de « sulfhydration ».^[61] L'appellation en elle-même a été contestée et il a été proposé de la remplacer par le mot « sulfuration », qui respecte mieux les règles de nomenclature UIPAC.^[62] Le terme d'origine a cependant persisté et est désormais attribué à la réaction présentée ci-dessous qui consiste en la transformation d'une cystéine protéique en thiocystéine, son analogue persulfure (Schéma A16) :

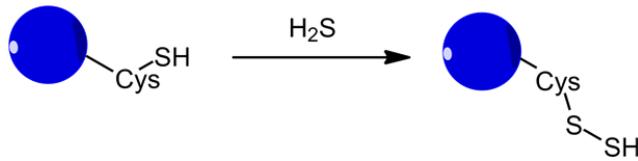


Schéma A16 : Principe de la sulfhydration des protéines

Cependant, cette réaction n'est pas équilibrée et devrait être écrite comme suit (Schéma A17) :

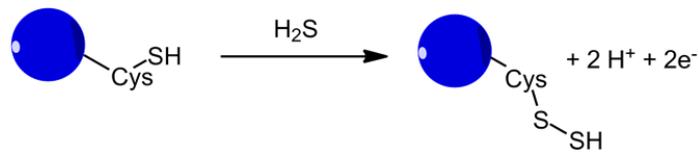


Schéma A17 : Equation équilibrée de la sulfhydration des protéines

Bien que le(s) mécanisme(s) n'ai(en)t pas encore été clairement identifié(s), la réaction doit mettre en jeu un oxydant ou un dérivé oxydé de thiol. Nous pouvons proposer plusieurs mécanismes, présentés dans le Schéma A18.

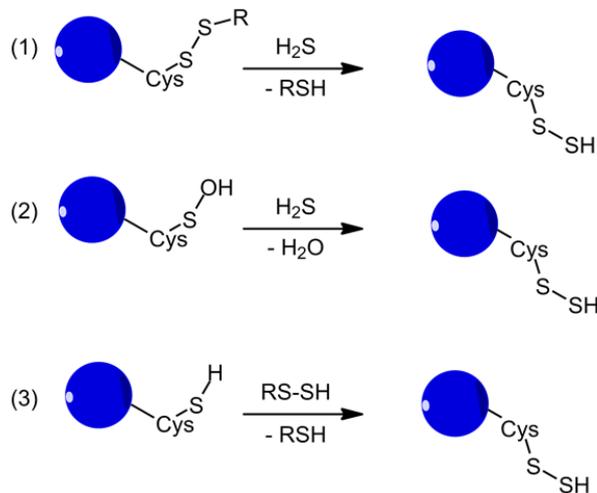


Schéma A18 : Propositions de mécanismes pour la sulfhydration des protéines

L'équation (1) met en jeu un disulfure et H_2S , comme pour la réaction d'échange thiol/disulfure. Bien qu'il ait été montré que la réduction d'un disulfure n'est pas favorable dans les milieux biologiques en raison du pouvoir réducteur insuffisant du sulfure d'hydrogène,^[63]

d'autres études ont montré qu'il était pourtant capable de réduire un pont disulfure de la papaine^[64] et de réduire le pont Cys1045-Cys1024 du récepteur vasculaire du facteur de croissance endothélial VEGFR2 résultant en son activation,^[65] sans que des persulfures ne soient toutefois mis en évidence. Cette réaction est aussi proposée lors de la première étape du cycle catalytique de la SQR humaine décrit précédemment.

L'équation (2) propose une réaction analogue, après oxydation de la cystéine en son analogue acide sulfénique par un oxydant tel que l'eau oxygénée. Ce mécanisme pourrait en particulier intervenir dans la phosphatase PTP1B, qui comporte une cystéine sensible à H₂O₂, la protéine étant quant à elle sulfhydratée et inhibée en présence de H₂S.^[66]

L'équation (3) consiste à l'opposé en la réaction d'une cystéine protéique sur un persulfure de faible poids moléculaire, comme celui du glutathion GSSH par exemple.

L'analogie de la sulfhydratation avec la nitrosylation, une autre modification post-traductionnelle dont l'importance est maintenant bien établie, est évidente.^[67] Cette dernière consiste en effet en la formation de nitrosothiols par des dérivés oxydés du monoxyde d'azote (Schéma A19).

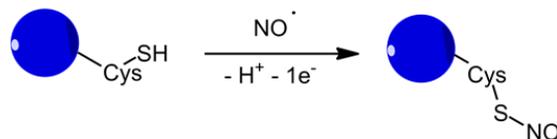


Schéma A19 : Principe de la nitrosylation par des dérivés de NO

Il est même possible d'écrire un mécanisme de sulfhydratation à partir de la cystéine nitrosylée aboutissant à la libération de HNO, et établissant ainsi un lien éventuel entre les deux gasotransmetteurs. La sulfhydratation et la nitrosylation modulent toutes les deux l'activité des enzymes concernées et ont en général un effet opposé. On peut par exemple citer la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) pour laquelle la nitrosylation de la Cys150 aboutit à l'inhibition de l'enzyme alors que sa sulfhydratation conduit à une augmentation de l'activité de 700%.^[68] Des résultats similaires ont été obtenus par l'équipe de Snyder en 2013 à propos de l'ubiquitine ligase Parkin et de son activité neuroprotectrice. Encore une fois,

l'enzyme est inhibée par la nitrosylation et activée par la sulfhydratation. De plus, une augmentation de la forme nitrosylée et une diminution de la forme sulfhydratée ont été constatées dans les cerveaux de patients souffrant de la maladie de Parkinson, renforçant l'hypothèse de régulation croisée abordée plus haut et suggérant un intérêt thérapeutique de molécules libérant H₂S.^[69]

Enfin, il ne faut pas non plus oublier qu'en plus de moduler des activités enzymatiques, la sulfhydratation peut servir de réserve de sulfure d'hydrogène, sous une forme non-toxique et immédiatement disponible. En effet, la réaction décrite dans l'équation (1) du Schéma A18 est réversible et peut aboutir à la libération de sulfure d'hydrogène comme illustré dans le schéma suivant (Schéma A20).

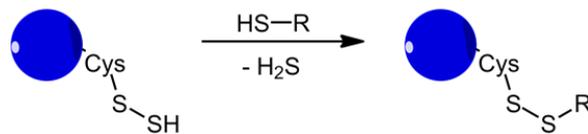


Schéma A20 : Exemple de libération de sulfure d'hydrogène par réaction d'un thiol sur un persulfure

5.1.2. Sulfhydratation d'électrophiles

Mais la sulfhydratation ne concerne pas que les protéines, comme l'a montré le groupe de *Akaike* en 2012, qui a pour la première fois utilisé le terme de « sulfhydratation d'électrophile ».^[70] L'appellation est encore une fois abusive puisque seule une des réactions décrite dans leur travail mérite cette dénomination. Il a été montré qu'H₂S peut réagir avec des électrophiles nitrés comme des acides gras nitro-substitués, ou avec des accepteurs de Michael comme les quinones pour former des liaisons C—S.^[70] Ces travaux présentent aussi la réactivité de la 8-Nitro-cGMP vis-à-vis d'H₂S (Schéma A21), qui reste une des « sulfhydrations » d'électrophiles les plus originales.

La guanosine monophosphate cyclique (cGMP) est un messager secondaire synthétisé par la guanylate cyclase, une enzyme régulée par les monoxydes d'azote et de carbone. NO

régule aussi la production de son dérivé nitré en position 8 dans les cellules inflammées, celui-ci jouant aussi le rôle de messenger.^[71]

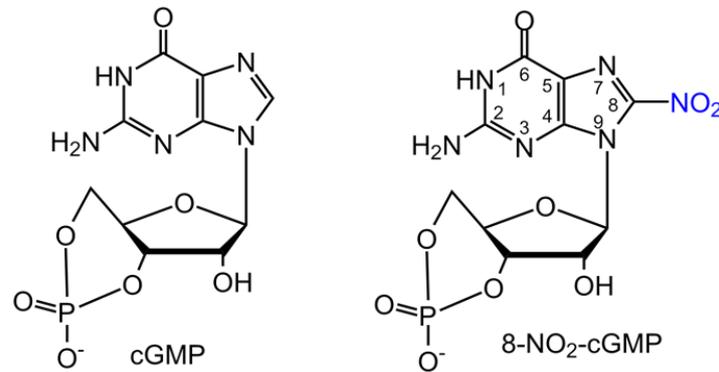


Schéma A21 : Structures de la cGMP et de son dérivé nitré en position 8

La 8-NO₂-cGMP a été montrée comme exerçant un effet antioxydant, entre autres par réaction avec une des cystéines de la protéine Keap1, conduisant au thioéther correspondant selon un procédé nommé « S-guanylation » (Schéma A22).^[72] Cette modification permet la translocation du facteur de transcription Nrf2 dans le noyau conduisant à l'expression de diverses enzymes anti-oxydantes.

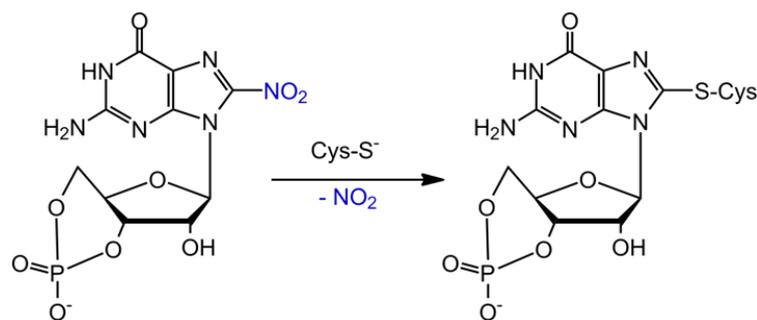


Schéma A22 : S-Guanylation des cystéines^[72]

La 8-NO₂-cGMP réagirait dans les cellules de manière similaire avec le sulfure d'hydrogène, pour former le dérivé 8-SH-cGMP. *In vitro*, la réaction nécessite cependant une catalyse par des métaux/métalloprotéines et de la cystéine, comme on peut le voir sur le

diagramme ci-dessous (Figure A1). Bien que le mécanisme reste à élucider, plusieurs hypothèses, dont celle mettant en jeu la formation d'un intermédiaire persulfure peuvent être proposées. La formation de 8-SH-cGMP à partir d'H₂S a été proposée comme une régulation de l'activité du composé nitré de départ, renforçant l'hypothèse d'une signalisation croisée entre les deux gasotransmetteurs H₂S et NO.

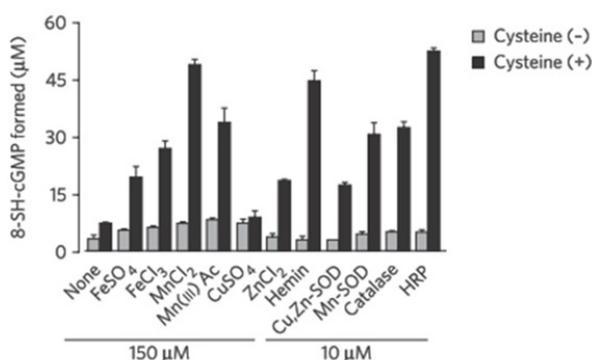


Figure A1 : Effet de la cystéine et des métaux sur la sulfhydratation de la 8-NO₂-cGMP^[70]

5.2. HSNO : CONFIRMATION DE LA CONNECTION H₂S-NO

En effet, NO, le premier transmetteur gazeux mis en évidence, et H₂S sont depuis longtemps suspectés d'interagir ensemble. L'hypothèse de la formation du dérivé HS-NO a été proposée en 2006 comme régulatrice de l'activité vasculaire de NO, bien que la molécule n'ait pas été identifiée.^[73] Ce n'est qu'en 2012 que HSNO fut généré par réaction du glutathion S-nitrosylé GSNO avec du sulfure d'hydrogène (Schéma A23) et caractérisé par des méthodes classiques comme l'infra-rouge, la spectrométrie de masse et la RMN.^[74]

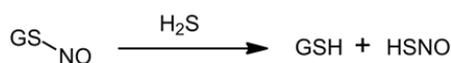


Schéma A23 : Formation d'HSNO à partir de GSNO^[74]

HSNO est très réactif. Il a en effet été montré par les mêmes auteurs qu'il agit *in vitro* comme donneur de NO^o, NO⁺ ou NO⁻ (Schéma A24).^[74]

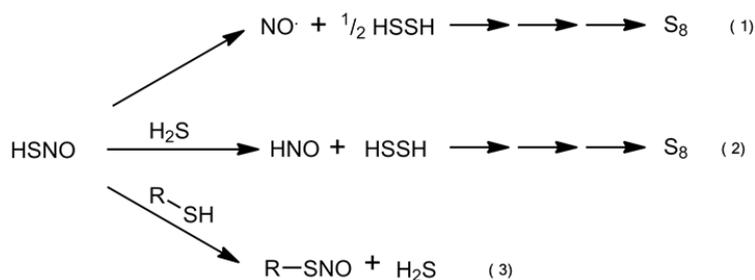


Schéma A24 : Métabolisme d'HSNO^[74]

Il a été mis en évidence au niveau cellulaire dans la formation de HNO (voie (2)), molécule supposée avoir un rôle cardioprotecteur,^[75] et dans la trans-nitrosylation (voie (3)), par réaction avec un thiol. HSNO étant une petite molécule non-chargée, il est naturellement perméable aux membranes, lui permettant ainsi d'atteindre une cible intracellulaire, contrairement aux donneurs de monoxyde d'azote CysNO et GSNO qui nécessitent un transporteur spécifique et une cascade de réactions.^[74, 76]

5.3. INTERACTION AVEC LES METALLOPROTEINES

Enfin, le sulfure d'hydrogène est aussi connu pour réagir avec les métalloprotéines, et c'est à cette propriété que nous allons nous intéresser pour clôturer cette partie.

5.3.1. Hémoprotéines

On peut rappeler ici que le sulfure d'hydrogène est un gaz toxique avec une LC50 estimée à 800 ppm pendant 5 min et, comme pour les gaz CO, NO et HCN, cette toxicité passe majoritairement par l'inhibition de la cytochrome c oxydase (Cco), le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale.^[77] Il s'agit de la dernière enzyme de cette chaîne respiratoire, catalysant la réduction du dioxygène en eau. Cette métalloprotéine possède treize sous-unités, et son site actif est composé de deux centres métalliques, un fer hémique (Fe_{a3}), et un cuivre dans un environnement constitué d'histidines (Cu_B).^[78]

Un modèle fonctionnel a été utilisé par le groupe de *Collman* afin de l'étudier plus précisément^[79] et les conclusions qu'il en a tirées sont qu'à forte concentration, le sulfure

d'hydrogène interagit de manière réversible avec la forme réduite de l'enzyme [Fe(II)-Cu(I)], le modèle semblant fixer deux molécules de gaz, l'une liée à l'hème ferreux, l'autre liée par liaison hydrogène à la première. A faibles concentrations, l'affinité du Fe(II) pour H₂S est trop faible pour observer une interaction, mais par contre la forme oxydée [Fe(III)-Cu(II)] de la Cco est quantitativement réduite. Les résultats ayant été obtenus sur un modèle, ils ne permettent pas de totalement rationaliser les effets de H₂S observés dans les tissus,^[80] puisque dans ces derniers en plus d'inhiber le complexe IV, H₂S joue le rôle de substrat de la chaîne mitochondriale.^[77b] Ils confirment néanmoins le fort pouvoir réducteur d'H₂S vis-à-vis des hémoprotéines Fe(III).

Ce pouvoir réducteur peut toutefois être modulé par l'environnement protéique du site héminique. On peut en effet le constater dans des études portant sur l'hémoglobine I du *Lucina pectinata*, un coquillage présent dans les boues riches en sulfure d'hydrogène, qui est capable de transporter le sulfure d'hydrogène jusqu'à atteindre des bactéries symbiotes où il sera oxydé pour fournir des électrons,^[5a] ou bien sur les hémoglobines tronquées des bactéries *Bacillus subtilis* et *Thermobifida fusca*,^[81] dont le rôle biologique reste à déterminer. Toutes possèdent un centre Fe(III) ayant une forte affinité pour le sulfure d'hydrogène. Cependant, les modes de coordination proposés sur le fer sont différents, avec dans le premier cas une coordination sous forme H₂S et dans le second cas sous forme HS⁻.

De manière inattendue, dans *Lucina pectinata*, la forme protonée H₂S est réductrice, et il s'agit d'un des mécanismes permettant sa dissociation. D'un autre côté, dans les hémoglobines tronquées des bactéries, le ligand HS⁻, normalement plus réducteur que son homologue protoné, ne conduit pas à la réduction du Fe(III).^[81] Des études de mutagenèse dirigée ont permis de faire la lumière sur ce phénomène en mettant en évidence que le ligand H₂S est déstabilisé par une glutamine du site actif, jouant le rôle d'accepteur de liaison hydrogène pour la *Lucina pectinata*, augmentant alors le pouvoir réducteur du ligand, alors que le ligand HS⁻ chez les bactéries *Bacillus subtilis* et *Thermobifida fusca* est stabilisé par un tryptophane jouant le rôle de donneur de liaison hydrogène, limitant ainsi la réduction du centre ferrique (Schéma A25).

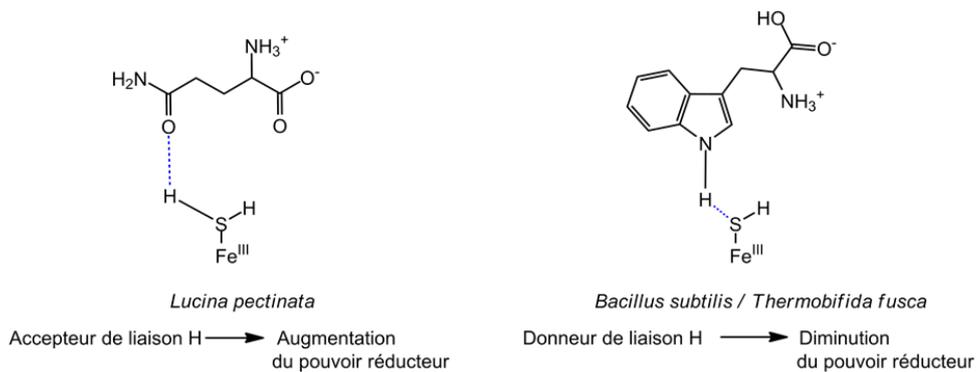


Schéma A25 : Sites actifs de l'hémoglobine I de *Lucina pectinata* et de l'hémoglobine tronquée des bactéries *Bacillus subtilis* et *Thermobifida fusca*

Mais H₂S ne réagit pas qu'avec les métaux dans les protéines héminiques, il peut aussi réagir directement avec l'hème sous certaines conditions. La réaction est alors une modification irréversible conduisant à la formation de sulfhèmes, tels que la sulfhémoglobine ou la sulfmyoglobine, celles-ci présentant une diminution significative de leur affinité pour l'oxygène.^[82]

La réaction peut s'effectuer après inhalation de sulfure d'hydrogène gazeux, mais aussi *via* une intoxication médicamenteuse, comme avec des sulfonamides. Il existe plusieurs isomères de sulfhèmes ; des études RMN ont été menées sur plusieurs d'entre elles et ont permis de proposer des structures,^[83] avant qu'une structure aux rayons X du dérivé le plus stable (Schéma A26) ne soit finalement obtenue en 1994.^[84]

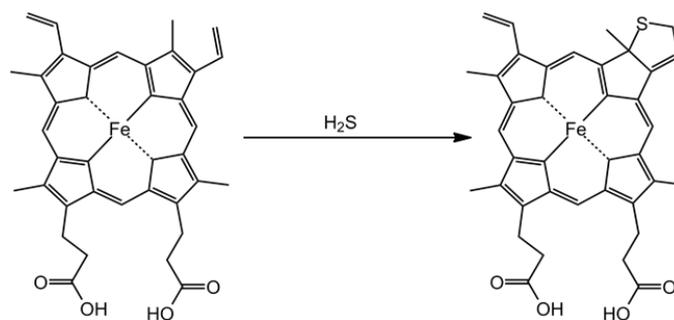


Schéma A26 : Formation du sulfhème le plus stable^[84]

La formation de sulfhème nécessite un intermédiaire ferryl de haut degré d'oxydation ($\text{Porp}^+\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ou $\text{PorpFe}^{\text{IV}}=\text{O}$) et des travaux préliminaires réalisés dans notre équipe ont permis de proposer le mécanisme illustré ci-dessous (Schéma A27).^[85]

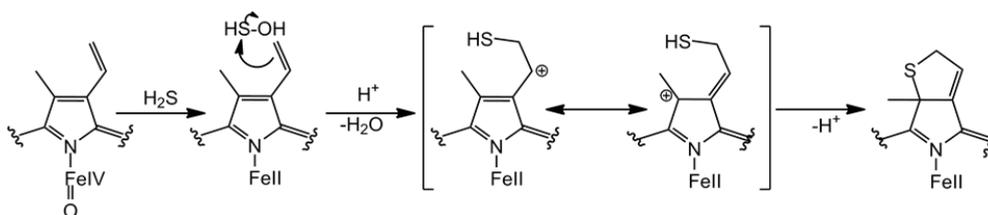


Schéma A27 : Mécanisme proposé pour la formation du sulfhème de la catalase^[85]

5.3.2. Métalloprotéines non-héminiques : enzymes à zinc

Bien que la majorité des études aient porté sur les hémoprotéines, H_2S peut aussi réagir avec d'autres métaux biologiques, comme le zinc. On sait tout d'abord qu' H_2S peut inhiber des enzymes à zinc comme des isoformes d'anhydrases carboniques,^[86] bien que la relevance biologique de cette inhibition reste à démontrer. Le cas des hémoglobines V1 et V2 des vers marins tubicoles géants *Riftia pachyptila* est plus intéressant. Comme pour l'hémoglobine I du coquillage *Lucina pectinata*, elles ont pour rôle de transporter le sulfure d'hydrogène vers les bactéries symbiotes.^[6, 87] Ces globines, qui coordinent aussi l'oxygène, lient le sulfure d'hydrogène par des ions zinc complexés par des histidines et des glutamates à l'extérieur de la structure globulaire plutôt que par coordination à l'hème. L'utilisation de ces ions pourrait permettre une adaptation permettant de limiter la formation de sulfhème dans ces globines transportant à la fois O_2 et H_2S .^[4]

IV Outils moléculaires pour l'étude d' H_2S

Maintenant que les principaux modes d'action du sulfure d'hydrogène ont été décrits, nous allons nous intéresser aux différentes méthodes chimiques utilisées pour assister les biologistes dans ces études. Nous allons dans un premier temps discuter des techniques permettant de détecter le sulfure d'hydrogène, puis nous nous intéresserons aux molécules capables d'en libérer de manière contrôlée dans les milieux biologiques tels que des cellules et

des tissus, étant donné l'importance de ces deux classes de composés dans la compréhension du rôle d'H₂S en biologie.

1. DETECTER ET QUANTIFIER H₂S

La difficulté à observer H₂S a provoqué un besoin de senseurs pour le détecter et le quantifier. Il s'agit d'un point essentiel dans l'étude de ses mécanismes d'action. De nombreux progrès ont été effectués depuis les premières méthodes dénaturantes, de sorte que la détection et la visualisation d'H₂S dans les cellules et les tissus est maintenant envisageable, même si la quantification en milieu complexe reste un défi. Afin d'illustrer ces propos, on peut suivre les discussions portant sur les concentrations d'H₂S circulant dans le sang ou le plasma, variant d'un facteur 10⁵ entre quelques nanomolaires et plusieurs centaines de micromolaires.^[88] Ces différences de valeurs peuvent être expliquées par les méthodes de dosage utilisées, que nous allons passer en revue en nous concentrant sur les plus utilisées.

1.1. QUANTIFIER H₂S : LE BLEU DE METHYLENE

La première méthode que nous aborderons est la détection au bleu de méthylène qui est une des plus utilisées pour détecter le sulfure d'hydrogène.^[89] Elle est très sensible (de l'ordre du nanomolaire), et facile à mettre en œuvre. H₂S réagit avec la N,N-diméthyl-*p*-phenylenediamine et FeCl₃ en milieu acide, formant ainsi le bleu de méthylène (Schéma A28). La forte coloration bleue ($\lambda_{\text{max}} = 670 \text{ nm}$) accompagnant sa formation dure jusqu'à 60 min. Malgré son succès dans de nombreuses études, cette méthode n'est cependant pas sélective d'H₂S. En effet, les conditions acides utilisées sont dénaturantes, et au final la quantification reflète la concentration en H₂S libre, à laquelle il faut ajouter le soufre dit « labile » (tel que celui présent dans les persulfures R-SSH), ainsi que le soufre dit « lié » (comme les sulfures provenant notamment de la destruction des clusters fer soufre). La courbe de calibration n'est pas non plus linéaire au-delà de 10 μM , à cause de la formation de dimères et trimères.^[90] Cependant, entre 2000 et 2010 plusieurs dizaines de déterminations de la concentration sanguine ou plasmatique d'H₂S ont été proposées avec cette technique, avec des valeurs allant

de $0.55^{[91]}$ à $298 \mu\text{M}^{[92]}$ Il est évident que l'utilisation de telles valeurs sans le moindre recul n'a pu que conduire à des résultats erronés lors des études physiologiques ; il paraît effectivement impossible d'atteindre de telles concentrations d'un gaz aussi nauséabond sans pouvoir détecter son odeur.

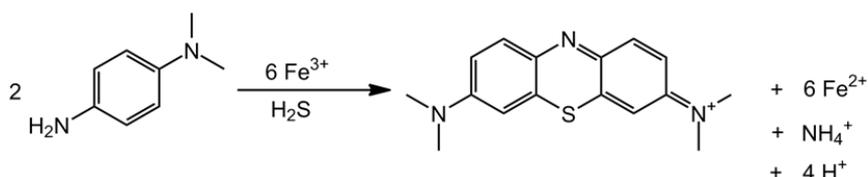


Schéma A28 : Détection par formation de bleu de méthylène

1.2. QUANTIFIER H₂S : ELECTRODE SÉLECTIVE À H₂S

Il a fallu attendre 2008, après une amélioration majeure des électrodes à ion sulfure^[93] qui nécessitaient jusqu'alors de travailler en conditions dénaturantes basiques, pour enfin obtenir des valeurs plus proches de la réalité.^[94] Il a ainsi été montré que dans tous les modèles animaux étudiés, la concentration de H₂S était sous le seuil de détection de la méthode (100 nM). Le principe de ce senseur est schématisé ci-dessous (Schéma A29). La sélectivité est obtenue à l'aide d'une membrane perméable uniquement aux molécules apolaires de petite taille, la détection se faisant par réoxydation du ferrocyanure (résultant de la réduction à pH 12 du ferricyanure par HS⁻) à l'électrode.

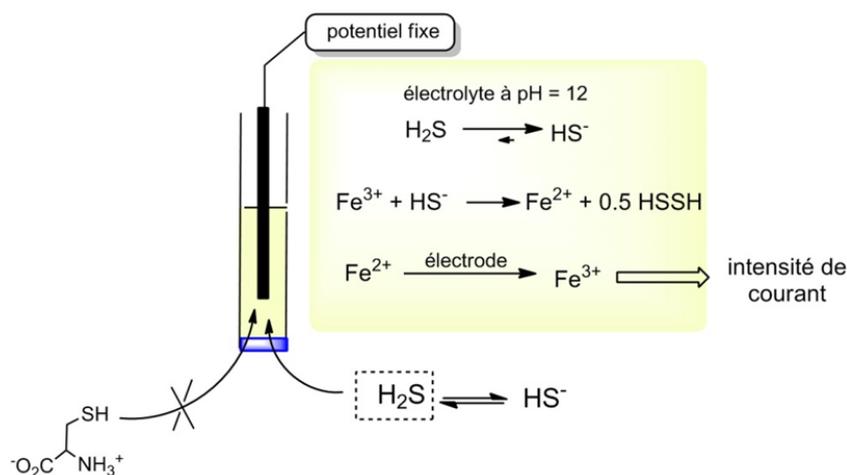


Schéma A29 : Principe de l'électrode sélective à H₂S

Cette technique présente deux inconvénients majeurs : sa faible sensibilité (de l'ordre du μM), ainsi que la nécessité de travailler en milieu liquide, qui empêche son utilisation sur des tissus. Elle a cependant permis un certain nombre d'avancées, en plus de la démonstration de l'absence de quantités détectables d' H_2S libre dans le sang ; c'est notamment cette méthode de détection qui a été utilisée pour démontrer que les effets vasodilatateurs de l'ail étaient liés à sa faculté de libérer H_2S .^[95]

1.3. VISUALISER H_2S : LES SONDES FLUORESCENTES

La dernière méthode que nous allons aborder est la détection par fluorescence. Cette dernière, qui est une technique sensible, facile à mettre en œuvre, et utilisable de façon routinière en microscopie pour de l'imagerie cellulaire ou tissulaire, a récemment été appliquée à la problématique H_2S . Au début des travaux décrits dans ce manuscrit, peu de publications s'intéressaient à la détection du sulfure d'hydrogène par fluorescence, et les sondes étaient simplistes. Cependant, ce domaine est devenu très actif à partir de 2011, avec la parution de la première molécule capable de détecter H_2S dans des cellules par le groupe de Chang,^[96] publication suivie par plusieurs dizaines d'autres depuis.

Développer une sonde efficace pour H_2S nécessite de remplir plusieurs conditions :

- Tout d'abord, les propriétés de fluorescence en présence et en absence d' H_2S doivent être différentes. Cette variation peut être une augmentation de l'intensité de fluorescence (sonde dite « off-on » ou « turn on »), une diminution de l'intensité de fluorescence (sonde dite « on-off » ou « turn off »), ou une variation des longueurs d'ondes d'excitation ou d'émission (sonde ratiométrique).

- Ensuite, cette sonde doit être sélective pour H_2S , et doit en particulier être inerte vis-à-vis des autres molécules soufrées présentes en biologie à des concentrations largement plus importantes (glutathion : 1-10 mM, cystéine : 100- 500 μM).

1.3.1. Principe général de la fluorescence

À température ambiante, une molécule occupe généralement l'état fondamental (S_0). Un photon d'énergie suffisante $h\nu_a$ est nécessaire pour passer de cet état S_0 à un état excité S_n^* . Suite à l'absorption de ce photon, la molécule perdra généralement de l'énergie pour se stabiliser au premier niveau d'énergie singulet disponible S_1 par un procédé appelé conversion interne.

C'est à partir de cet état fondamental S_1 que la molécule va pouvoir emprunter trois voies lui permettant de retourner à l'état fondamental S_0 , comme on peut le voir sur le diagramme de Jablonski ci-dessous (Schéma A30).

La première de ces voies, et celle qui va nous intéresser, est la fluorescence. Elle consiste en la transition de l'état S_1 à l'état S_0 par émission d'un photon d'énergie $h\nu_f$ nécessairement inférieure à l'énergie absorbée $h\nu_a$ en raison de la dissipation d'énergie avant la fluorescence. En pratique, cela signifie que la longueur d'onde observée (λ_{em}) sera supérieure à la longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}), la différence étant appelée déplacement de Stokes. On pourra noter que sa largeur dépendant notamment de la molécule et du solvant utilisé.

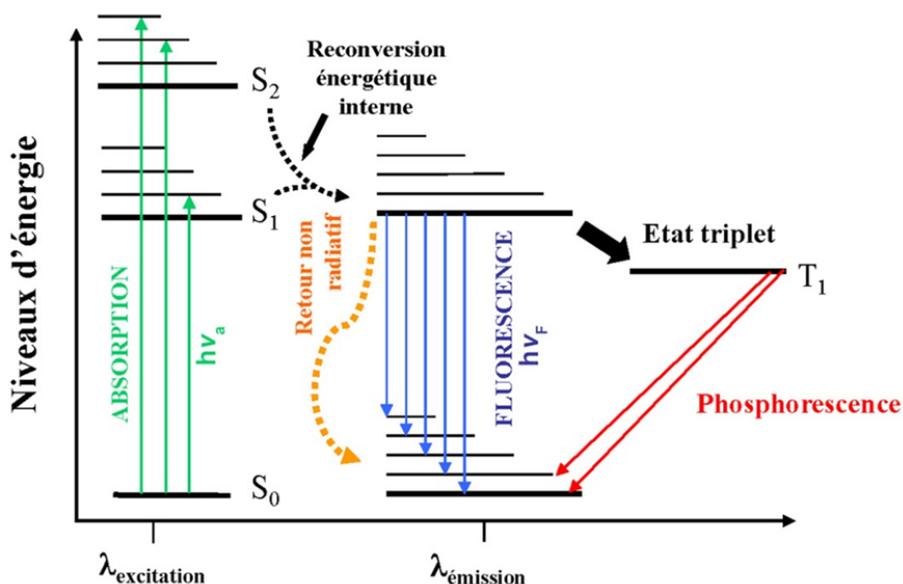


Schéma A30 : Diagramme de Jablonski^[97]

Les molécules fluorescentes sont généralement des molécules hétérocycliques conjuguées^[98] et leurs propriétés de fluorescence sont intimement liées à cette conjugaison. Ainsi, un élargissement du système π de la molécule conduit généralement à un déplacement du spectre de fluorescence vers les plus hautes longueurs d'ondes, ainsi qu'à une augmentation du rendement quantique de fluorescence qui rend compte de l'efficacité du transfert radiatif, et qui se reflète par une plus grande intensité de fluorescence du point de vue expérimental. Ceci offre une première approche vers l'un des pré-requis au développement d'une sonde fluorescente, à savoir la variation de l'intensité de cette dernière ou le déplacement de ses longueurs d'ondes d'excitation ou d'émission, en présence de la molécule d'intérêt.

1.3.2. Quenching

Une seconde stratégie permettant d'obtenir une variation de l'intensité de fluorescence d'un fluorophore est le quenching ou extinction de fluorescence en français. Plusieurs mécanismes conduisent à une diminution de la fluorescence d'un fluorophore et ceux-ci sont résumés dans le Tableau A4 ci-dessous:

Photophysical process	$M^* + Q \rightarrow$ products	Donor	Acceptor
Collision with a heavy atom (e.g., I^- , Br in CBr_4) ^{a)} or a paramagnetic species (e.g. O_2 , NO) ^{b)}	$M^* + Q \rightarrow M + Q + \text{heat}$		
Electron transfer	${}^1D^* + A \rightarrow D^{+\cdot} + A^{-\cdot}$ ${}^1A^* + D \rightarrow A^{-\cdot} + D^{+\cdot}$	${}^1D^*$ D	A ${}^1A^*$
Excimer formation	${}^1M^* + {}^1M \rightarrow {}^1(MM)^*$		
Exciplex formation	${}^1D^* + A \rightarrow {}^1(DA)^*$ ${}^1A^* + D \rightarrow {}^1(DA)^*$	${}^1D^*$ D	A ${}^1A^*$
Proton transfer	$AH^* + B \rightarrow A^{-\cdot} + BH^{+\cdot}$ $B^* + AH \rightarrow BH^{+\cdot} + A^{-\cdot}$	AH* AH	B B*
Energy transfer	${}^1D^* + {}^1A \rightarrow {}^1D + {}^1A^*$ ${}^3D^* + {}^1A \rightarrow {}^1D + {}^3A^*$ ${}^3D^* + {}^3A \rightarrow {}^1D + {}^3A^*$ ${}^1M^* + {}^1M \rightarrow {}^1M + {}^1M^*$	${}^1D^*$ ${}^3D^*$ ${}^3D^*$ ${}^1M^*$	1A 1A 3A 1M

Tableau A4 : Différents mécanismes intervenant dans le quenching^[98]

Le mode de quenching le plus utilisé dans le développement de senseurs fluorescents pour H_2S est sans conteste le transfert d'électron photoinduit (PET). Ce dernier consiste à placer un réducteur ou un oxydant à proximité du fluorophore dans la molécule. Ce groupement rédox

va alors interagir avec l'état excité du fluorophore, bloquant la transition radiative $S_1 \rightarrow S_0$ (Schéma A31).

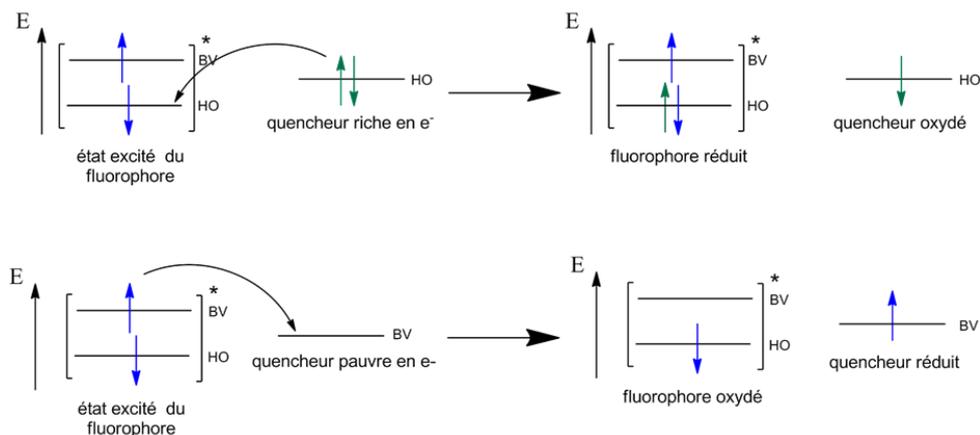


Schéma A31 : Principe du PET

1.3.3. Stratégies permettant une sélectivité vis-à-vis des thiols

Quatre grandes stratégies ont été utilisées pour développer des sondes fluorescentes sélectives au sulfure d'hydrogène :

- Le déplacement de ligand de complexes de coordination
- Le fort pouvoir réducteur d' H_2S
- L'utilisation du plus bas pK_a d' H_2S par rapport aux thiols
- La présence de 2 pK_a s successifs dans H_2S

Ces stratégies vont nous servir de fil conducteur pour présenter les molécules les plus intéressantes rapportées dans la littérature ces 3 dernières années.

a. Sondes par déplacement de ligand

Cette première stratégie tire parti de la forte affinité du sulfure d'hydrogène pour les cations métalliques. Les complexes de coordination réagissent donc aisément avec H_2S , pour

conduire à des espèces dont la nucléarité est parfois difficile à contrôler, et pouvant aller, si l'affinité des autres ligands pour le métal est faible, jusqu'à la formation de sulfures métalliques. Cette dernière réaction est d'autant plus favorable que ces sulfures sont en général très peu solubles ($K_{S_{MnS}} = 10^{-14}$ à $K_{S_{HgS}} = 10^{-53}$ M).

- Sonde basées sur le zinc(II)

Le laboratoire a été parmi les premiers groupes à s'intéresser au développement de sondes pour H_2S en milieu aqueux, basées sur la chimie de coordination. Ainsi, le complexe de zinc représenté ci-dessous basé sur un motif hydridotris(pyrazolyl)borate $Tp^{Ph,Me}$ et comportant un ligand thiolate coordonné au métal est fortement fluorescent.^[99] En présence d' H_2S , dans un mélange 50/50 HEPES (pH 7.4)/acétone, la fluorescence du complexe diminue, en raison de la substitution du thiolate peu fluorescent par le sulfure d'hydrogène (Schéma A32, Figure A2(A)).

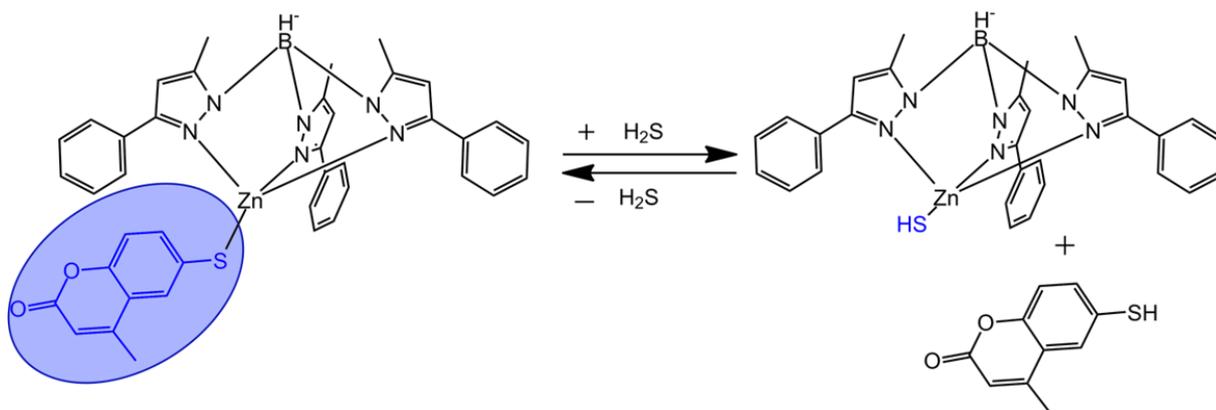


Schéma A32 : 1^{ère} sonde sélective à H_2S , complexe de zinc hydridotris(pyrazolyl)borate

Cette sonde est sélective pour H_2S ; en effet, ce dernier éteint la fluorescence (Figure A2(B), cuve a) après ajout de 5 eq, alors que les deux autres cuves restent luminescentes, et ce même après ajout de 100 eq CysSH ou de 100 eq GSH comme visible plus bas.

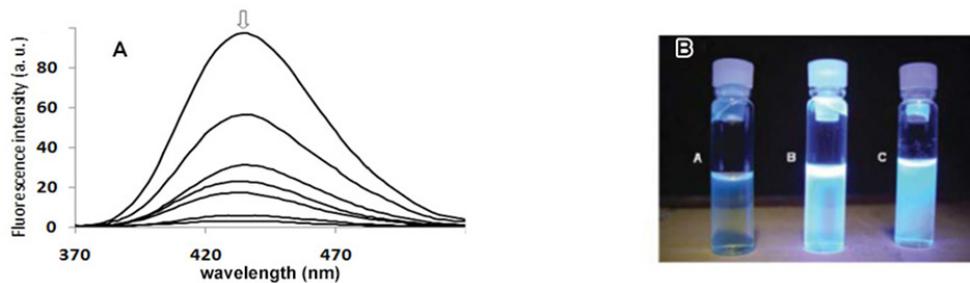


Figure A2 : **A :** Évolution de la fluorescence de la sonde basée sur le zinc après ajout de 0, 1, 2, 3, 4, 10 et 20 eq H₂S ;
B : Fluorescence de la sonde à zinc après addition de (a) 5 eq H₂S, (b) 100 eq CysSH, (c) 100 eq GSH^[99]

Cette sélectivité est probablement essentiellement liée à la différence de pKa entre H₂S et les thiols, le mécanisme réactionnel faisant intervenir la protonation du thiolate coordonné lors de la réaction d'échange de ligand, même si des composantes électrostatiques (la cavité du ligand Tp^{Ph,Me} étant apolaire) et/ou stériques peuvent aussi être impliquées.

Ce senseur présente cependant deux inconvénients majeurs : sa faible solubilité dans les tampons aqueux, et son appartenance au type turn-off qui offre une lecture moins aisée que les sondes turn-on. Malgré ces inconvénients, ce senseur à zinc était la seule sonde sélective décrite au début de cette thèse.

- Sondes basée sur le cuivre(II)

Une autre série de sondes a depuis été proposée dans la littérature, basée sur le Cu(II). En effet, ce dernier est un excellent quencheur de fluorescence, à la fois par PET, mais aussi par transfert d'énergie et « effet d'atome lourd ».^[100] Cette nouvelle famille s'appuie sur le principe utilisé par les sondes à iode^[101] ou à cyanure,^[102] à savoir la démétallation d'un ligand dont la fluorescence est éteinte par le cation paramagnétique, ce qui restaure son émission (sonde « turn on »),^[102] la formation de sulfure de cuivre CuS étant facilitée par son insolubilité ($K_{\text{CuS}} = 10^{-37} \text{M}$).

Par une étude systématique de diverses entités coordinantes,^[103] ce type de dérivés (Schéma A33) est passé d'une sonde ne présentant aucune sélectivité vis-à-vis des thiols avec un ligand dipicolylamine (DPA) à une sonde présentant une sélectivité importante avec un ligand cyclen. Par la suite, plusieurs senseurs basés sur le même principe ont été publiés.^[104]

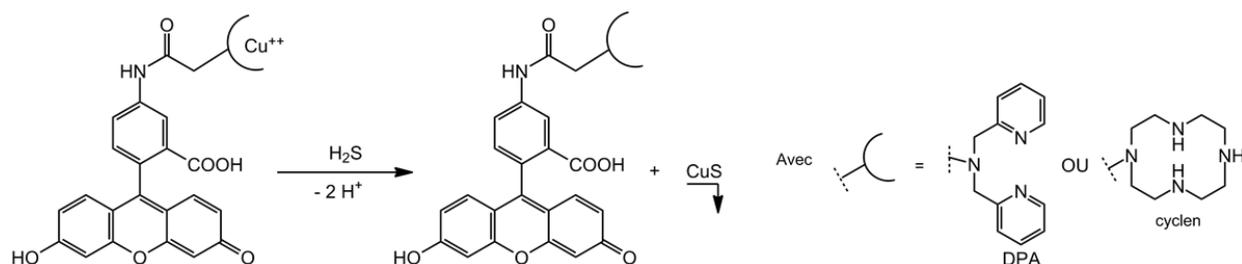


Schéma A33 : Principe des sondes à cuivre(II)^[103]

b. Sondes utilisant la réduction de groupements azotés

D'autres groupes ont trouvé des moyens différents d'exprimer la sélectivité en utilisant par exemple le fort pouvoir réducteur du sulfure d'hydrogène pour réduire des groupements azotés oxydés. H₂S est en particulier utilisé pour réduire des dérivés nitro-aromatiques^[105] ou bien des azotures pour de la glycochimie.^[106] Ceci a été mis à profit pour synthétiser de nombreuses sondes sélectives à H₂S, puisque les thiols ne sont pas capables d'effectuer cette réduction.

Le principe de ces senseurs est toujours le même : restaurer/augmenter la conjugaison de la molécule par réduction de groupement N₃, NO₂ ou NHOH en NH₂. La plupart des sondes comportent un azoture, car plus facile à introduire.

Le mécanisme est apparenté classiquement à la réduction des azotures par les phosphines selon une réaction analogue à la réaction de Staudinger (Schéma A34). L'anion hydrosulfure attaque sur l'atome d'azote terminal pour former un intermédiaire mercaptotriazane qui se réarrange pour libérer du diazote et former la thioamine correspondante. Cette dernière est ensuite aisément réduite pour former du persulfure d'hydrogène qui évoluera en soufre élémentaire et libérer ainsi l'amine formée.

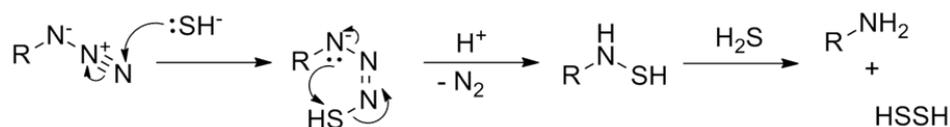


Schéma A34 : Mécanisme proposé pour la réduction de groupements azotés par H_2S

Les squelettes de choix vont ici être les dérivés de type coumarine^[107] ou rhodamine,^[96, 108] comme illustré dans le schéma ci-dessous (Schéma A35). Ce dernier présente la première sonde capable d'imager H_2S dans les cellules, basée sur une rhodamine,^[96] ainsi qu'une sonde basée sur une coumarine utilisée pour visualiser le sulfure d'hydrogène endogène dans des tissus cardiaques.^[107a]

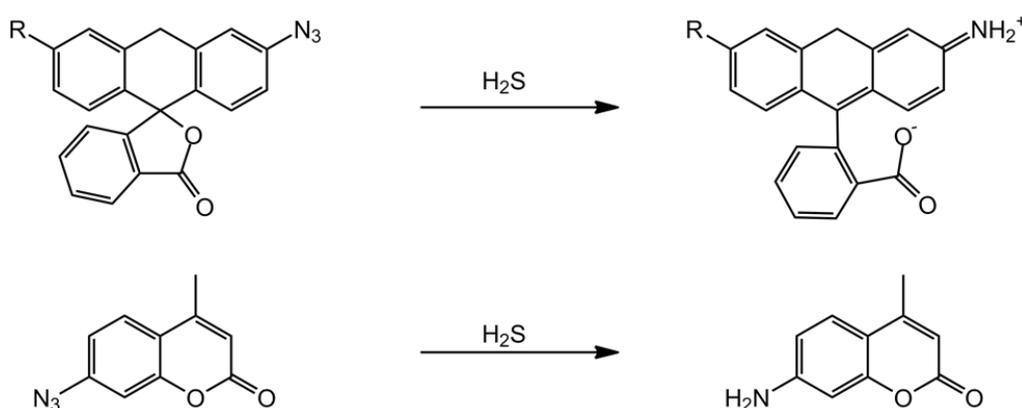


Schéma A35 : Principe des sondes à réduction de groupements azotés

On peut aussi trouver quelques exemples de sondes par réduction de groupement nitro^[107b, 109] et une sonde par réduction d'hydroxylamine publiée en 2012^[110] avec des mécanismes analogues.

c. Sondes basées sur la nucléophilie d' H_2S

Une autre classe de senseurs est basée sur le simple fait que le pKa d' H_2S (6.98) est plus bas que celui des thiols RSH (pKa_{CysSH} = 8.00 ; pKa_{GSH} = 8.66). Ceci implique en effet une plus

grande concentration de la forme nucléophile HS^- en solution par rapport à la forme RS^- à pH physiologique.

Quatre sondes ont été proposées sur ce principe. La première est une sonde ratiométrique, basée sur la modification du squelette conjugué de la molécule par addition d' H_2S au cycle indolénium,^[111] semblable à la deuxième où l'attaque d' H_2S sur une position pauvre en électrons aboutit à la rupture du système π et à une modification de la longueur d'onde d'émission (Schéma A36).^[112]

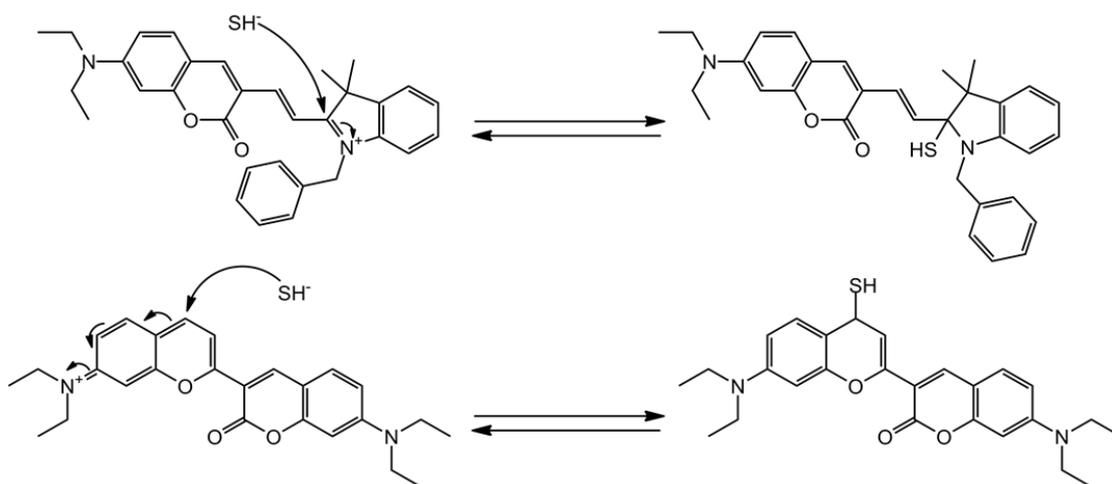


Schéma A36 : Sondes ratiométriques basées sur la nucléophilie du sulfure d'hydrogène par réarrangement du système π

Les deux autres utilisent la classique déprotection de dérivés de type tyrosine protégée par un groupement dinitrophényl (Schéma A37).^[113] Ce dernier joue dans ces sondes le rôle de quencheur, la fluorescence étant éteinte par un mécanisme de type PET vers cet aromatique, résultant au final en une sonde de type « turn on ».

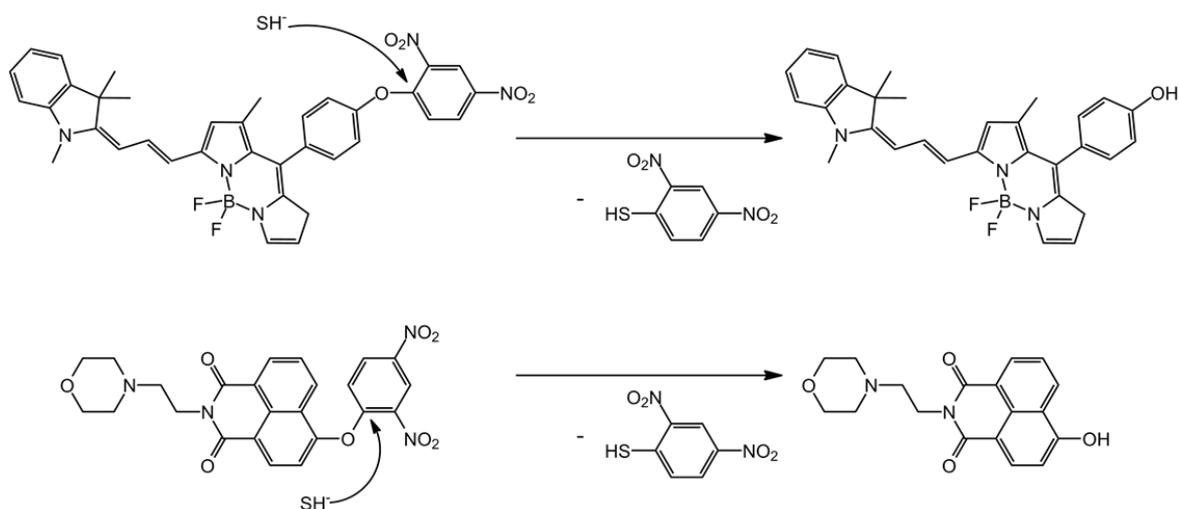


Schéma A37 : Sondes basées sur la nucléophilie du sulfure d'hydrogène avec libération de dinitrothiophénol

Ces sondes montrent toutes une très bonne sélectivité vis-à-vis des thiols tels que la cystéine, le glutathion ou l'homocystéine.

d. Sondes basées sur les deux pKas d'H₂S

Enfin, une dernière stratégie très élégante développée par plusieurs groupes s'appuie sur l'existence des deux pKas d'H₂S, et donc sur la possibilité qu'a cette molécule d'effectuer deux réactions successives en tant que nucléophile. Le principe est illustré dans le Schéma A38, qui décrit la première sonde basée sur cette stratégie.

Dans un premier temps, H₂S ou les thiols réagissent avec la sonde pour conduire à l'hémithioacétal ou au thioacétal, respectivement. Seul le premier peut ensuite réagir intramoléculairement avec l'accepteur de Michael, qui joue le rôle de quencheur de fluorescence par PET, et ainsi allumer la fluorescence de la sonde.^[114]

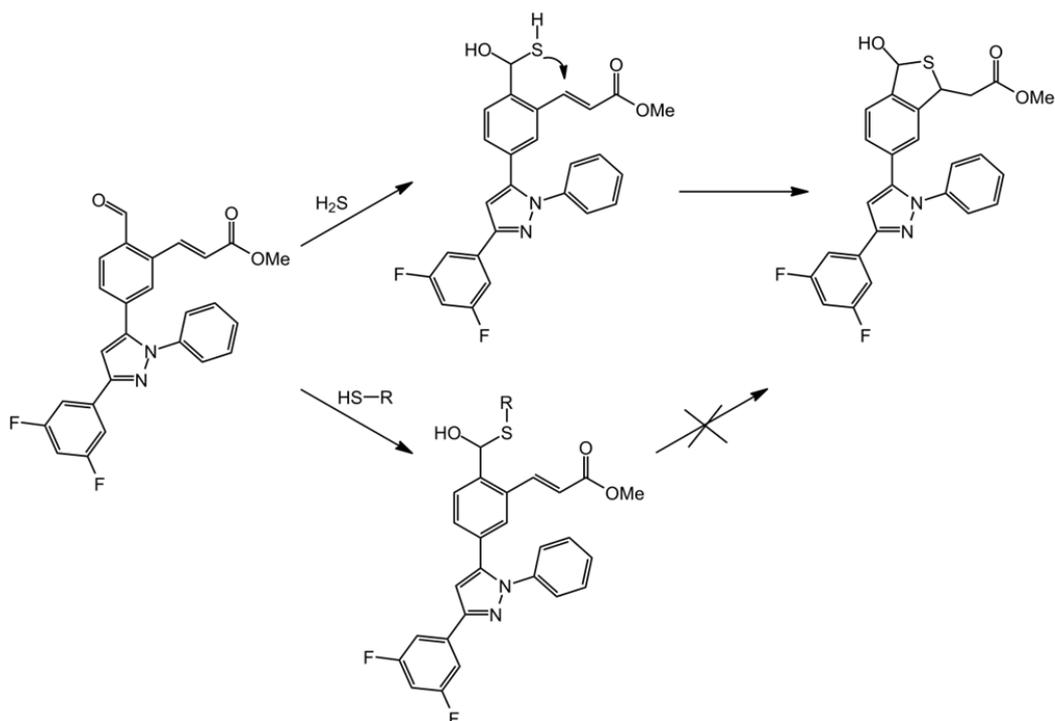


Schéma A38 : Principe des sondes à deux pKas basées sur un accepteur de Michael^[114]

La sonde présentée dans le Schéma A39 s'appuie sur le même principe, en utilisant une cascade de réactions différente. La première étape est la réduction d'un pont disulfure, qui conduit soit à la formation d'un intermédiaire persulfure (réaction d'H₂S) soit à la formation d'un autre disulfure (réaction d'un thiol). Le persulfure peut ensuite cycliser sur la fonction ester pour former la benzodithiolone et ainsi libérer le fluorophore.^[115]

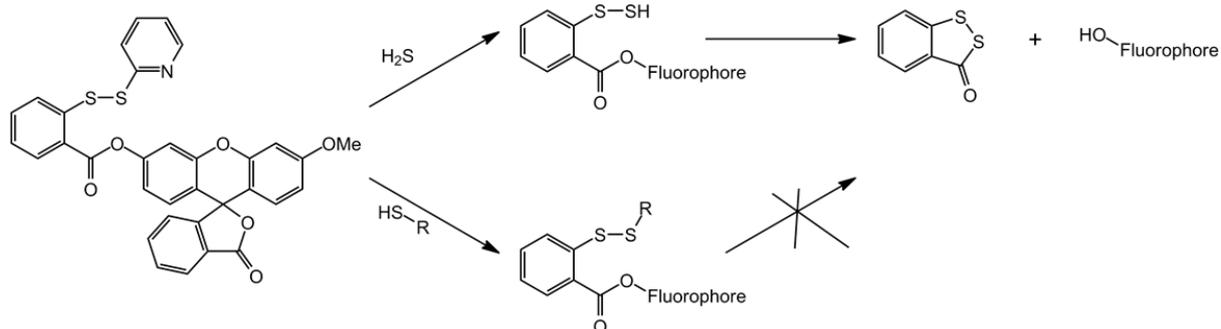


Schéma A39 : Principe des sondes à deux pKas basées sur un disulfure^[115]

Ainsi, en moins de 4 ans, ce domaine a connu une très forte expansion. Des premières sondes non-hydrosolubles du début, nous avons maintenant atteint des molécules sélectives capables d'imager le sulfure d'hydrogène endogène dans des tissus. Des améliorations notables ont eu lieu, en ce qui concerne les temps de réponse des senseurs, passés de l'ordre de l'heure à la minute ; la sensibilité des sondes (bien que toujours exagérée dans les articles), avec des limites de détection annoncées actuellement de l'ordre de la dizaine de nanomolaires.^[116] L'excitation utilisant un rayonnement ultraviolet est maintenant de plus en plus souvent remplacée par des longueurs d'onde infra-rouges moins toxiques et pénétrant plus profondément dans les tissus biologiques.^[107a, 117] Finalement, le ciblage de ces sondes vers des organelles d'intérêt, comme les mitochondries, est en cours de développement.^[117c]

2. LIBERER DU SULFURE D'HYDROGENE : LES DONNEURS

La seconde grande famille d'outils indispensables aux études liées à H₂S en biologie concerne les donneurs d'H₂S. Ces molécules, en plus de leur intérêt en recherche fondamentale, pourraient aussi avoir un rôle thérapeutique.^[118]

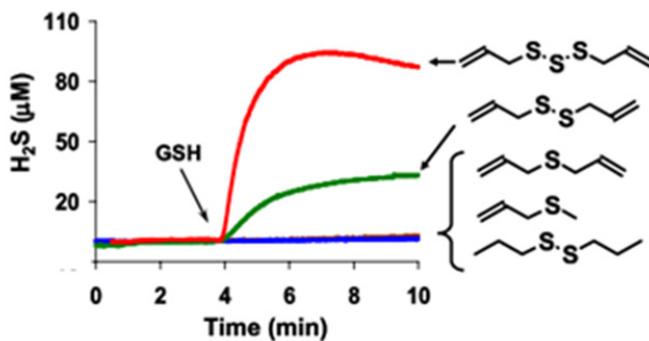
La grande majorité des études biologiques utilise H₂S sous ses formes salines NaSH et Na₂S, et souvent à des concentrations loin d'être physiologiques, en raison des problèmes discutés plus haut. Cependant, ces derniers sont des donneurs immédiats d'H₂S, appelés « donneurs rapides » qui ne reproduisent pas la biosynthèse du sulfure d'hydrogène, qui est continue.^[119] Ainsi, il est toujours difficile de différencier entre les effets réellement dus au sulfure d'hydrogène et ceux résultant d'artéfacts liés à l'utilisation de donneurs immédiats en trop forte concentration (> 40 μM). En effet, l'addition de telles solutions de sulfure d'hydrogène à des cultures cellulaires, des tissus, voire à des modèles expérimentaux d'animaux, résulte en une inhibition de la respiration mitochondriale, et à une réponse à l'hypoxie de l'organisme considéré.^[4]

Pour pallier à ce problème, des molécules, appelées « donneurs lents » ont été développées. Elles ne conduisent plus à une libération immédiate d'H₂S, mais à un relargage

progressif, le plus souvent après une activation métabolique. Ces composés peuvent être classés en plusieurs catégories, et nous commencerons tout d'abord par séparer les molécules naturelles des donneurs synthétiques.

2.1. LES DONNEURS NATURELS

Parmi les donneurs naturels, les plus anciens sont incontestablement ceux contenus dans l'ail, dont les propriétés sont connues depuis l'antiquité. Il a été récemment mis en évidence que ses effets vasodilatateurs sont liés à la génération d' H_2S par réaction entre le glutathion et plusieurs molécules soufrées telles que les diallyl disulfure (DADS) et diallyl trisulfure (DATS) (Spectre A1).^[95] Ces réactions font intervenir des persulfures intermédiaires, comme indiqué sur le Schéma A40. On considère qu'un autre composé soufré présent dans l'ail, le E-ajoene, agit lui aussi comme donneur d' H_2S bien qu'il n'y ait pour l'instant pas d'étude le mettant clairement en évidence.



Spectre A1 : Mesure de libération d' H_2S par différents composés soufrés présents dans l'ail (de haut en bas : DATS, DADS, DAS (diallyl sulfure), AMS (allyl methylsulfure), DPDS (dipropyldisulfure), 100 μM , dans PBS 10 mM avec 50 μM DTPA) après addition de GSH 2 mM^[95]

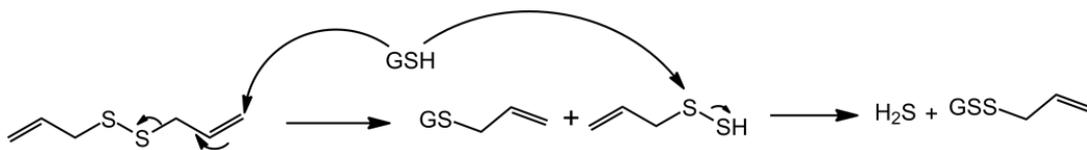


Schéma A40 : Mécanisme de formation d'un persulfure après l'ajout de GSH

Bien évidemment les acides aminés intervenant dans la biosynthèse d' H_2S présentée au préalable dans le manuscrit sont aussi des donneurs naturels d' H_2S , et dans ce cadre la cystéine, la cystine, l'homocystéine ou leurs dérivés comme la S-allyl cystéine ont été utilisés.

2.2. DONNEURS SYNTHETIQUES

Mis à part les donneurs naturels de sulfure d'hydrogène, des molécules synthétiques ont été développées. Plusieurs fragments organiques sont utilisés de manière récurrente dans ces molécules, les plus courants étant les dérivés du réactif de Lawesson et ceux des dithiolethiones.

2.2.1. Dérivé du réactif de Lawesson : GYY4137

Le GYY4137 est un dérivé du réactif de Lawesson, un agent de thionation couramment utilisé en synthèse organique, publié en 2008 par l'équipe de Moore (Schéma A41).^[120]

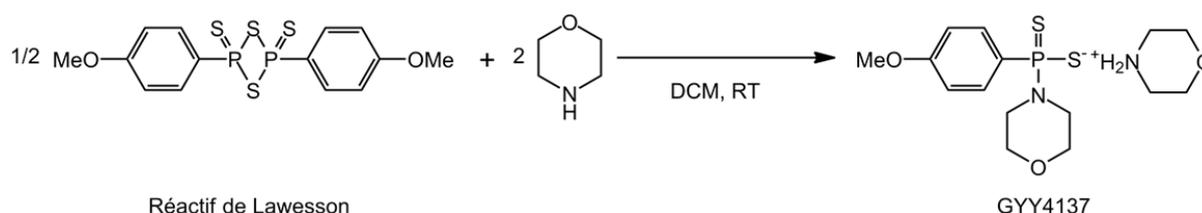


Schéma A41 : Synthèse du donneur GYY4137 à partir du réactif de Lawesson^[120]

Il est rapidement devenu un donneur important dans l'arsenal des chercheurs s'intéressant à l'étude des effets biologiques d'H₂S.^[121] Cependant, d'un point de vue moléculaire, cette molécule demeure un mystère et son mécanisme d'activation reste à mettre en évidence. Bien qu'une réaction d'hydrolyse (Schéma A42) ait été proposée, elle est extrêmement lente et ne peut notamment pas rendre compte des effets vasodilatateurs observés lors de son utilisation.

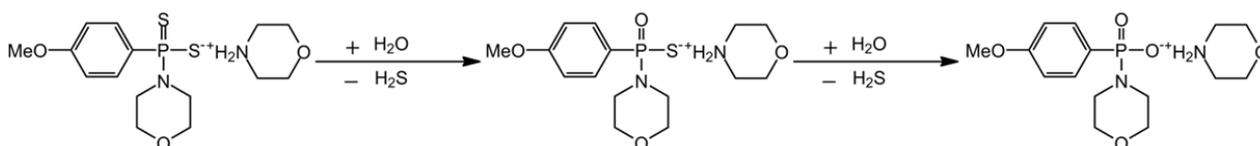


Schéma A42 : Mécanisme de libération d'H₂S proposé par hydrolyse du donneur GYY4137

2.2.2. Dérivés de type dithiolethione

Les dérivés de l'anéthole dithiolethione (ADT) et de son métabolite principal ADT-OH (Schéma A43), ont aussi été fréquemment utilisés. Les mécanismes pouvant conduire à la libération d'H₂S restent hypothétiques, et ils sont présentés dans le schéma ci-dessous.

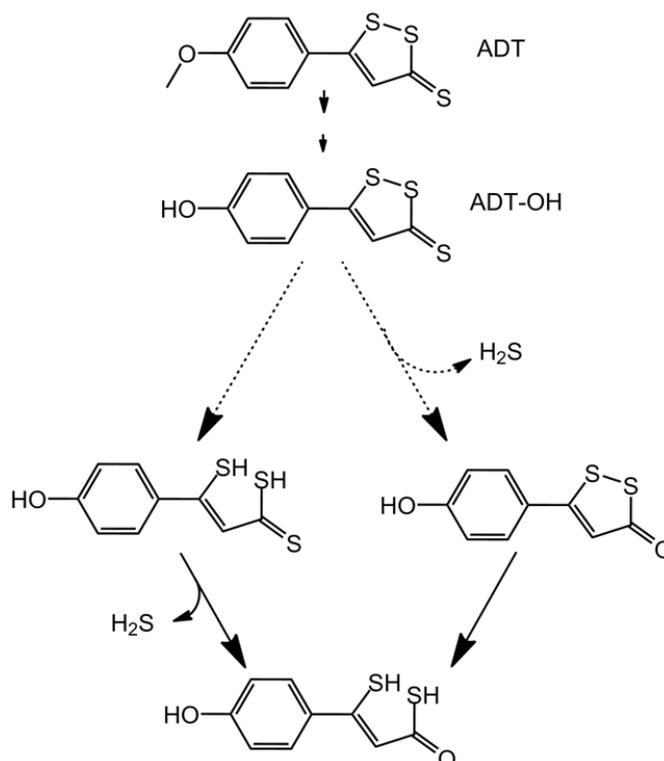


Schéma A43 : Hypothèses proposées pour la libération d'H₂S à partir du motif ADT-OH^[122]

Le principal avantage de ce motif ADT-OH est sa dérivatisation extrêmement aisée, par fonctionnalisation du groupement phénol. Ceci a permis sa conjugaison à de nombreuses molécules thérapeutiques, comme à des AINS tels l'aspirine,^[91, 122] le diclofénac,^[123] l'ibuprofène^[124] ou bien à la L-DOPA pour le traitement de la maladie de Parkinson.^[125]

Dans le cas des AINS, l'introduction d'un donneur de H₂S réduit significativement leurs effets secondaires, et en particulier l'inflammation gastro-intestinale.^[126] La conjugaison à la L-DOPA conduit aussi à un effet protecteur, notamment neuroprotecteur.^[125] Ce dernier composé présente d'ailleurs probablement un intérêt sous-estimé à l'époque, étant donné les derniers résultats sur la protéine Parkin et H₂S.^[127]

2.2.3. Autres donneurs :

D'autres familles de donneurs ont été développées de manière plus rationnelle.

- Les premiers sont des dérivés d'acides aminés : la thioglycine et la thiovaline.^[128]

Ces composés sont stables en milieu acide et basique, et libèrent H₂S en présence de bicarbonate, qui est présent à une concentration de 27 mM dans le sang. La libération de sulfure d'hydrogène atteint un maximum entre une et deux heures et s'effectue comme présenté dans le Schéma A44, par cyclisation intramoléculaire aboutissant à l'oxazolidine-2-5-dione.

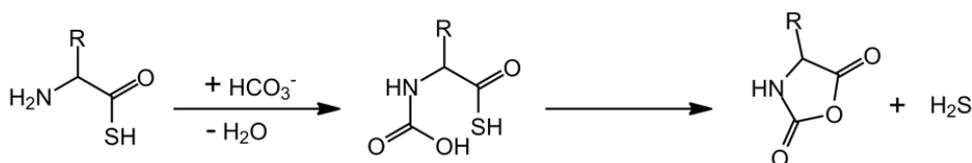


Schéma A44 : Mécanisme de libération d'H₂S par les donneurs dérivés d'acides aminés

- En 2011, *Xian et al.* ont publié les premiers donneurs de sulfure d'hydrogène dont la libération s'effectue par attaque de thiols biologiques comme la cystéine ou le glutathion.^[129] Ils appartiennent à la famille des N-(benzoylthio)benzamides et plusieurs dérivés ont été synthétisés suivant ce modèle. Il s'agit de composés stables en solution (tampon phosphate 20 mM) jusqu'à l'addition du thiol. Celui-ci provoque alors une libération de sulfure d'hydrogène en solution. Le mécanisme a été élucidé et est présenté dans le Schéma A45. Le thiol choisi comme activateur attaque sur le carbonyle en alpha de l'atome de soufre pour libérer la thioamide, puis un deuxième équivalent de thiol forme le persulfure correspondant. Un troisième et dernier équivalent de thiol attaque sur le soufre proximal pour former le disulfure et ainsi libérer H₂S.

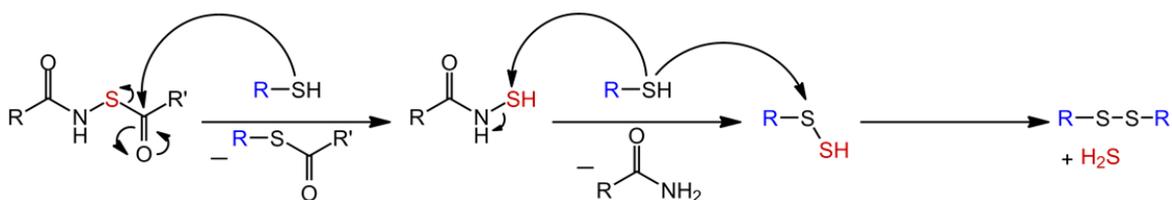


Schéma A45 : Mécanisme de libération des donneurs de Xian^[129]

- En 2013, le groupe de *Xian* a publié sa deuxième génération de donneurs activés par des thiols biologiques, faisant toujours intervenir des intermédiaires clefs persulfures. Afin d'éviter la réduction du pont S—S par les thiols activateurs et d'obtenir exclusivement l'attaque sur le carbonyle de l'acyle conduisant à la déprotection du persulfure, la pénicillamine, analogue de la cystéine encombrée stériquement en α de l'atome de soufre, a été utilisée (Schéma A46). Un deuxième équivalent de cystéine attaque ensuite soit minoritairement sur le soufre proximal (voie A) pour libérer directement H_2S par formation du disulfure, soit majoritairement sur l'atome de soufre distal pour former la thiocystéine qui libère H_2S par formation de cystine à l'aide d'un troisième équivalent de cystéine.

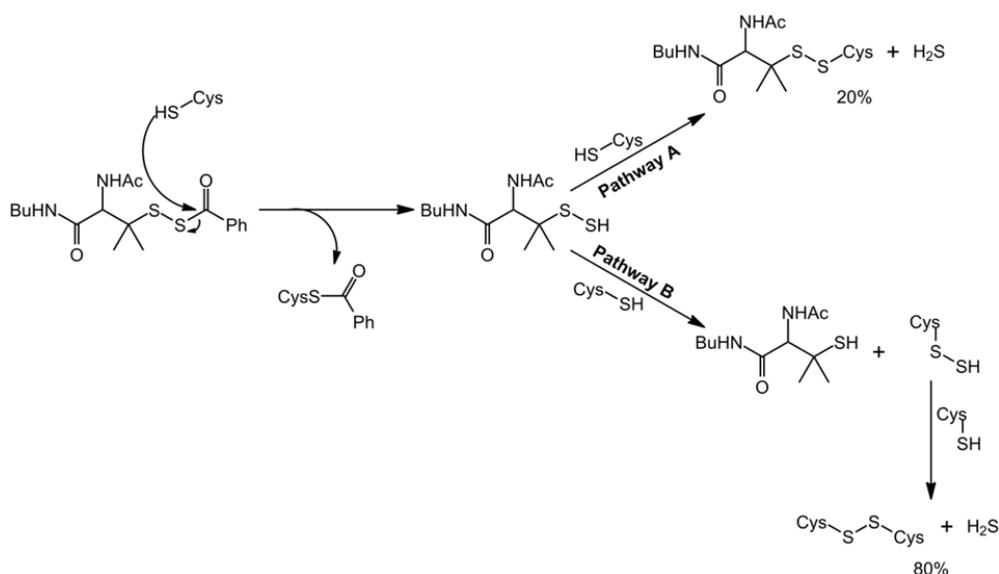


Schéma A46 : Mécanisme proposé pour la 2^{ème} génération de donneurs activés par les thiols biologiques, ici la cystéine^[130]

Ces nouveaux donneurs ont été décrits comme libérant lentement H_2S avec un maximum atteint entre 36 et 60 min et comme protégeant les souris contre les lésions causées au niveau cardiaque par l'ischémie-réperfusion.

Comme c'était le cas pour les sondes fluorescentes, les développements récents concernant ces donneurs lents se dirigent vers un ciblage des organelles, ainsi que vers le développement de molécules capables de libérer plusieurs gasotransmetteurs, comme celle du Schéma A47 capable de libérer à la fois NO et H_2S .^[131]

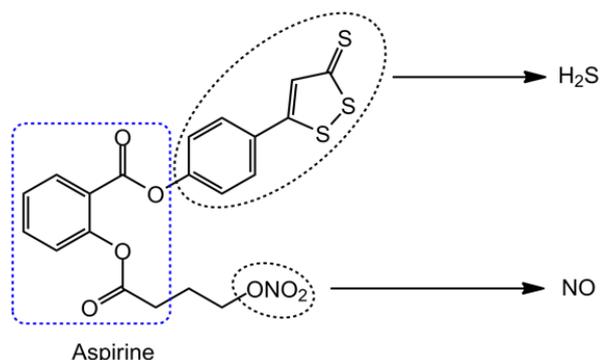


Schéma A47 : Donneur basé sur l'aspirine présentant un groupement donneur d'H₂S et un groupement donneur NO^[131]

V Objectifs de thèse

Le sulfure d'hydrogène intervient donc dans de multiples processus biologiques. Afin d'aider à la compréhension des mécanismes sous-jacents à son rôle de gasotransmetteur, il est important de disposer d'outils moléculaires, tels que ceux qui ont été développés pour le monoxyde d'azote NO.

Au début de cette thèse, aucune sonde fluorescente sélective du sulfure d'hydrogène en solution aqueuse n'était décrite dans la littérature, malgré une forte demande des biologistes pour de telles molécules.^[132] Les premiers donneurs lents de sulfure d'hydrogène commençaient à être développés, mais ceux-ci étaient basés sur des châssis moléculaires très classiques.

L'activité de l'équipe étant centrée sur les métaux et les espèces soufrées, nous avons souhaité répondre à ce manque d'outils en utilisant la chimie de coordination afin de synthétiser deux types d'outils moléculaires :

- Des sondes fluorescentes sélectives à H₂S basées sur une utilisation originale de la chimie de coordination, privilégiant l'attaque du sulfure d'hydrogène sur le ligand plutôt que sur le centre métallique, par opposition aux sondes par déplacement de ligand présentées plus haut. L'objectif est d'améliorer les points faibles de la sonde à zinc mise au point au laboratoire,

en synthétisant de nouvelles sondes sélectives qui conduisent à une augmentation de fluorescence (« turn-on ») en présence d'H₂S, dans un tampon aqueux.

- Des donneurs lents de sulfure d'hydrogène basés sur la chimie organique ou de coordination, utilisant une activation endogène. Cette dernière peut par exemple être la réaction entre le donneur et un thiol présent dans tous les milieux biologiques.

En plus de ce développement d'outils, nous nous intéresserons aussi à la synthèse du premier complexe de fer comportant un ligand hydrosulfure stabilisé par une liaison hydrogène dans la sphère de coordination du métal, à la manière des bactéries *Bacillus subtilis* et *Thermobifida fusca*.

CHAPITRE II : SONDES A SULFURE D'HYDROGENE

Ce deuxième chapitre est consacré à nos travaux visant à développer des sondes fluorescentes sélectives du sulfure d'hydrogène, en utilisant la chimie de coordination d'une manière originale.

En effet, la stratégie adoptée est différente de celles utilisées pour les sondes à H₂S basées sur la chimie de coordination utilisant du cuivre ou du zinc. Au lieu d'utiliser le métal comme centre de réactivité, ce qui conduirait à la formation de sulfures métalliques insolubles et à la libération du ligand (qui peut se révéler toxique une fois démétallé^[133]). Nous envisageons de l'utiliser comme quencheur de fluorescence, la réactivité avec le sulfure d'hydrogène ciblant le ligand.

Cette approche nécessite, en raison de la forte affinité d'H₂S pour les métaux de transition, d'utiliser un centre métallique inerte. Il faut donc un métal dont la sphère de coordination est saturée, et cinétiquement inerte vis-à-vis de la dissociation de ligands.



Schéma B1 : Équation utilisée pour la détermination des constantes cinétiques d'échange des métaux

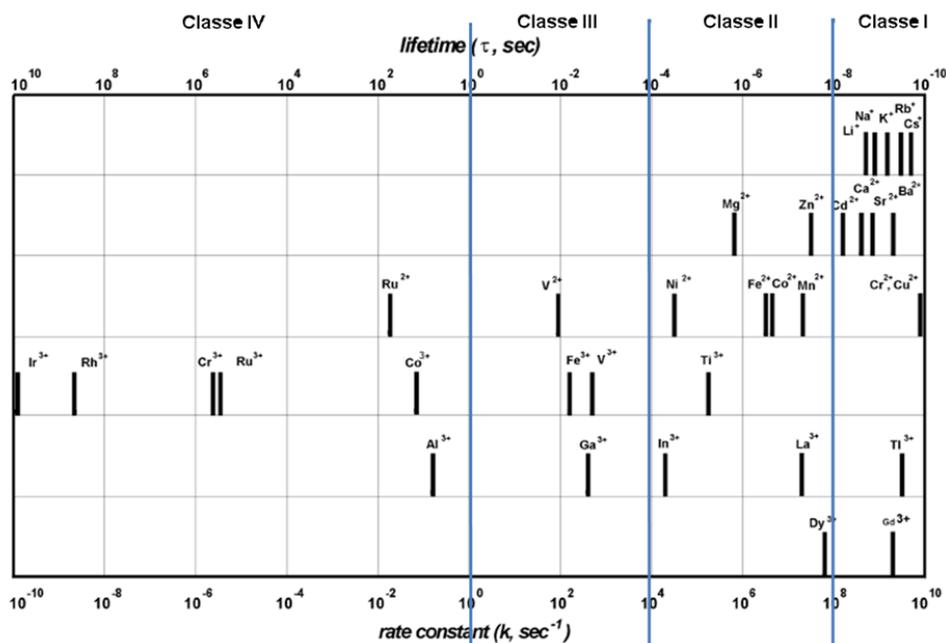


Figure B1 : Classification de différents métaux en fonction de leur constante cinétique d'échange d'un ligand aquo

En 1968, *Gray* et *Langford* ont classifié les métaux de transition suivant 4 classes, en fonction de leur constante cinétique d'échange d'une molécule d'eau sur le complexe (Schéma B1, Figure B1), la classe IV correspondant aux métaux cinétiquement inertes.^[134]

Dans nos études, nous avons choisi le ruthénium(II) et le cobalt(III), déjà utilisés au laboratoire. Le travail sur les complexes de ruthénium(II) sera abordé dans une première partie, la seconde discutant de nos résultats avec le cobalt(III).

I Sondes basées sur le ruthénium

1. PRINCIPE

L'inertie du ruthénium(II) vis-à-vis de nucléophiles soufrés a déjà été mise à profit au laboratoire. Dans le cadre de travaux visant à synthétiser des complexes comportant un persulfure $R-SS^-$ coordonné au métal, il a en effet été montré que l'attaque d'un thiolate RS^- sur un complexe ruthénium thiosulfonato $[Ru(SSO_2R')]$ aboutissait à la formation d'un complexe disulfanido $[Ru(SSR)]$ et à la libération de sulfinate RSO_2^- , sans qu'une réaction de substitution de ligand ne soit observée (Schéma B2).^[135]

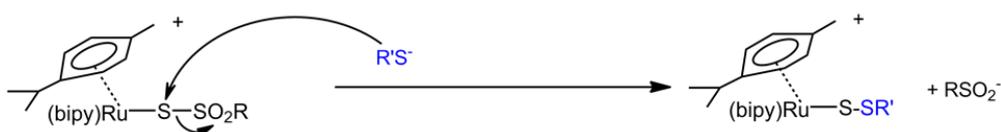


Schéma B2 : Mécanisme de la rupture de la liaison $M-S-SR$ ^[135]

Nous avons choisi de développer des complexes analogues pour détecter H_2S , en raison de la sélectivité montrée par ces composés pour une rupture de la liaison $S-SO_2$ en présence de nucléophiles soufrés. De plus, la charge cationique de ces composés devrait permettre leur solubilisation en milieu tamponné aqueux en utilisant un minimum de solvant organique. Les sondes conserveront le ligand *p*-cymène et une diamine, afin de stabiliser le ruthénium(II), et un ligand thiosulfonate fluorescent, dont l'émission serait quenchée par le centre métallique,

sera utilisé.^[136] Le choix de ce dernier s'est porté sur un dérivé du chlorure de dansyle (**DzSNa**), qui a déjà été utilisé pour des tests d'activité d'enzymes de type rhodanèse (Schéma B3),^[137] et qui présente la propriété d'être moins fluorescent que le sulfinate (**DzNa**) correspondant.

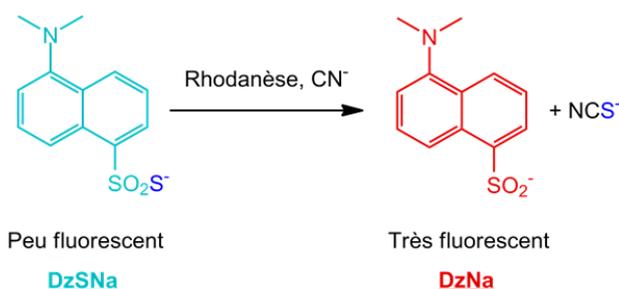


Schéma B3 : Désulfuration de **DzSNa** par une rhodanèse en présence de cyanure

Ainsi, lors de la réaction du complexe de ruthénium correspondant avec HS^- , nous devrions observer une augmentation de la fluorescence (sonde « turn-on ») due à la décoordination du fluorophore, ainsi qu'à la rupture de la liaison $\text{S(O)}_2\text{—S}$. La sélectivité attendue pour H_2S dans cette réaction proviendrait des travaux décrits en introduction, indiquant que l'acidité plus importante du sulfure d'hydrogène par rapport aux thiols dérivés de la cystéine pouvait être suffisante pour obtenir une sonde sélective.^[111-113]

2. SYNTHÈSE

Deux complexes (Schéma B4) ont été synthétisés en utilisant une diamine différente coordonnée au centre métallique : la bipyridine (bipy) pour le composé **II-1**, et l'éthylènediamine (en) pour le composé **II-2**.

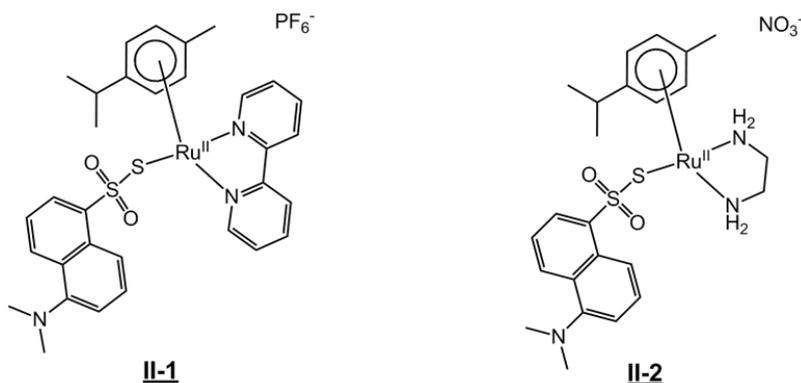


Schéma B4 : Structures des sondes **II-1** et **II-2** basées sur le ruthénium

La synthèse du thiosulfonate a dû être repensée, étant donné que le mode opératoire décrit dans la littérature, consistant à faire réagir le chlorure de dansyle commercial avec Na_2S , ne nous a pas permis d'obtenir le composé requis. Après réduction du chlorure de sulfonyle par le sulfite de sodium,^[138] le sulfinate **DzNa** correspondant est obtenu. Ce dernier conduit ensuite au thiosulfonate **DzSNa** par réaction avec du soufre élémentaire dans la pyridine (Schéma B5).^[139]

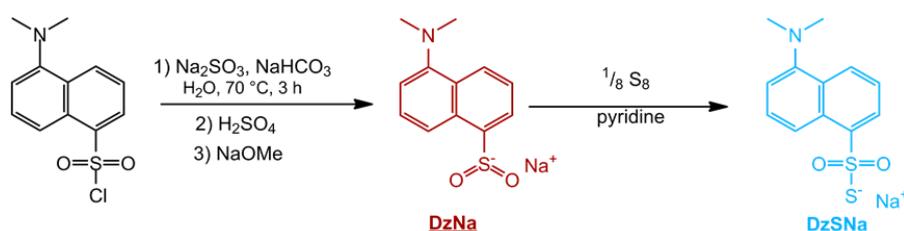


Schéma B5 : Synthèse du ligand thiosulfonate

La synthèse des sondes basées sur le ruthénium s'effectue en deux étapes, à partir du précurseur dimérique [di- μ -chloro-bis[chloro(*p*-cymène)ruthénium(II)] préparé préalablement en grande quantité au laboratoire par réaction de chlorure de ruthénium avec de l' α -phellandrene dans l'éthanol.^[140]

Dans un premier temps, le complexe monomérique [chloro(*p*-cymène)ruthénium(II)(diamine)]Cl est obtenu par réaction avec la diamine sélectionnée. La purification s'effectue par cristallisation induite par un échange du contre-ion chlorure par l'hexafluorophosphate (Schéma B6-1).

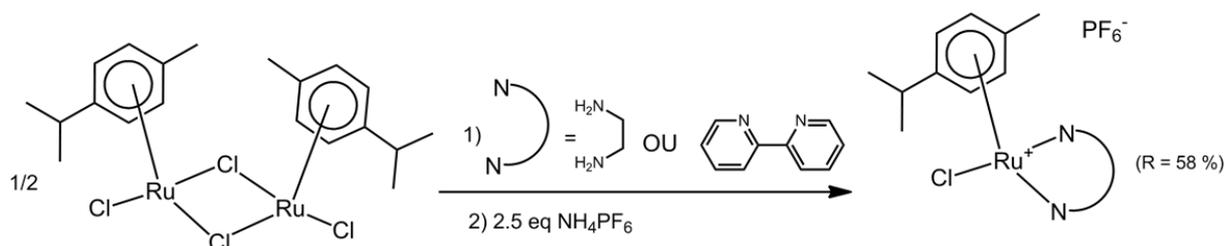
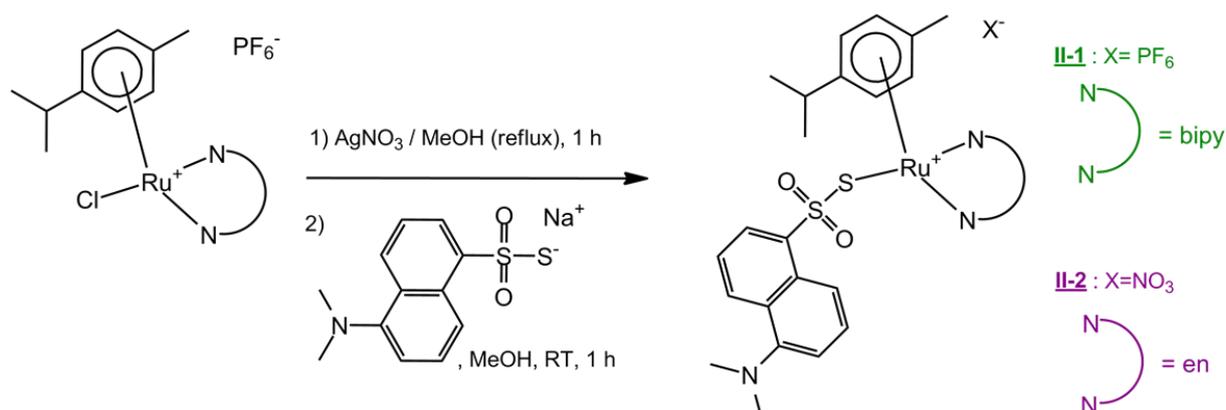


Schéma B6-1 : Synthèse des sondes II-1 et II-2 basées sur le ruthénium

Dans un second temps, le chlorure coordonné est substitué par un ion nitrate plus labile en utilisant du nitrate d'argent, et le ligand thiosulfonate sélectionné est introduit pour conduire aux complexes finaux **II-1** et **II-2** (Schéma B6-2). On notera toutefois qu'il a été constaté par analyse élémentaire que le complexe avec la bipyridine est isolé avec un contre-ion PF_6^- alors que le complexe comportant l'éthylènediamine possède lui un contre-ion NO_3^- .



*Schéma B6-2 : Synthèse des sondes **II-1** et **II-2** basées sur le ruthénium*

Les complexes **II-1** et **II-2** obtenus sont stables à température ambiante et à l'air, même après plusieurs mois. On peut attribuer cette stabilité à la présence du ligand para-cymène conduisant à un complexe de type « tabouret de piano » qui, en tant que ligand π -accepteur, stabilise le centre métallique sous son degré d'oxydation +2. La présence d'un ligand chélate, la diamine, stabilise de surcroît l'entité formée.^[141]

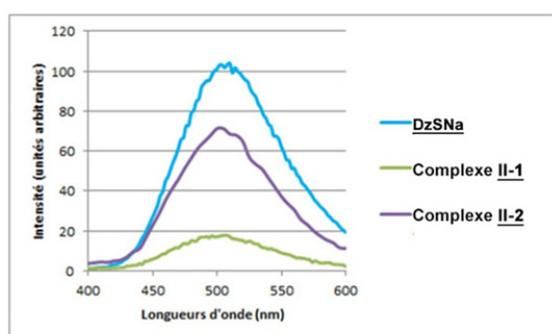
3. ÉTUDES DE REACTIVITE

3.1. EXTINCTION DE FLUORESCENCE

Avant d'étudier la réactivité des complexes à proprement parler, nous avons cherché à vérifier l'efficacité de l'extinction de fluorescence du ligand **DzSNa** par le centre métallique.

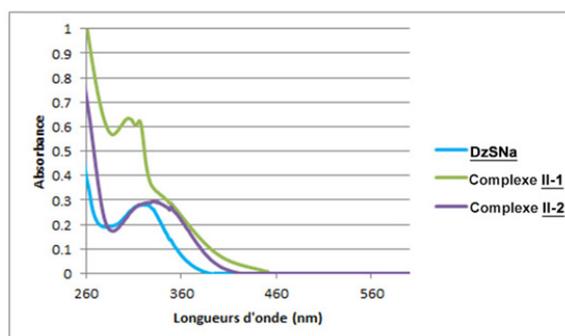
On notera que la charge cationique des complexes permet bien, comme espéré, de travailler en solution aqueuse tamponnée (contenant toutefois 1% de DMSO).

Le Spectre B1 présente les spectres d'émission du fluorophore libre, ainsi que ceux des complexes **II-1** et **II-2**. On observe une diminution significative de la fluorescence pour le complexe **II-1** (80%) et une extinction moins importante, mais tout de même significative, d'environ 25% pour le complexe **II-2**.



*Spectre B1 : Spectres d'émission des complexes **II-1**, **II-2**, et du ligand libre **DzSNa** (15 μ M dans tampon HEPES 50 mM pH = 7.4 avec 1% DMSO, λ_{ex} = 312 nm)*

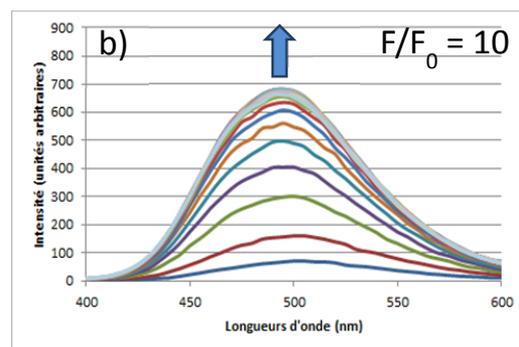
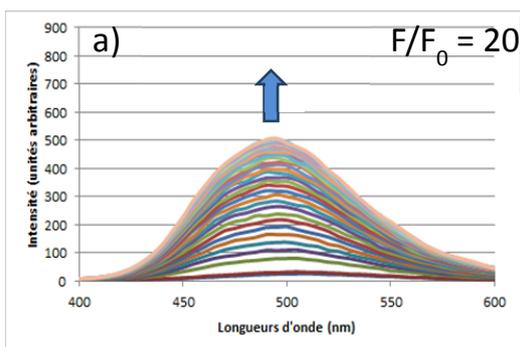
Cette différence dans les intensités de fluorescence entre les deux composés trouve probablement sa source dans la différence des spectres UV-Visibles des deux complexes (Spectre B2). En effet, dans le complexe possédant la bipyridine, à la longueur d'onde d'excitation, l'absorption du dansyle se superpose avec celle de l'entité Ru(bipy), et il est envisageable qu'une interaction entre ces deux états excités conduise à une extinction plus importante de la fluorescence dans ce complexe.



*Spectre B2 : Superposition des spectres UV-visibles du ligand **DzSNa**, et des complexes **II-1** et **II-2** (60 μ M dans mélange HEPES 50 mM pH 7.4/MeOH 60/40)*

3.2. REACTIVITE AVEC H₂S

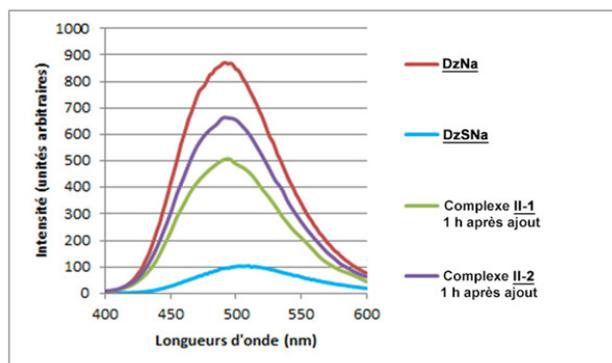
Nous avons ensuite entrepris d'étudier la réactivité vis-à-vis d'H₂S. Pour cela, nous avons suivi la variation de la fluorescence des complexes **II-1** (Spectre B3a) et **II-2** (Spectre B3b) pendant 1 h après ajout de 100 eq NaSH.



Spectre B3 : Suivi des spectres d'émission des sondes basées sur le ruthénium **II-1** et **II-2** après addition de 100 eq NaSH (15 μ M dans tampon HEPES 50 mM pH = 7.4 avec 1% DMSO, λ_{ex} = 312 nm) avec un intervalle de 2 minutes entre chaque spectre

On observe alors une forte augmentation de la fluorescence au fur et à mesure du temps, avec après 1 heure un rapport (fluorescence à 1 h/fluorescence initiale) F/F_0 de 20 pour le complexe bipyridine **II-1** et de 10 pour le complexe éthylènediamine **II-2**, mettant en évidence l'appartenance au type « turn-on » de nos sondes fluorescentes.

Dans les deux cas, l'intensité de la fluorescence est supérieure à celle du ligand thiosulfonate libre en solution comme visible sur le Spectre B4 ci-dessous. Ceci confirme que ces dérivés thiosulfonato du ruthénium réagissent avec les nucléophiles soufrés essentiellement par coupure de la liaison SO₂—S.



Spectre B4 : Superposition des spectres d'émission des ligands libres **DzSNa** et **DzNa** ainsi que des complexes **II-1** et **II-2** 1 h après addition de 100 eq NaSH (15 μ M dans tampon HEPES 50 mM pH = 7.4 avec 1% DMSO, λ_{ex} = 312 nm)

Une étude RMN a confirmé la formation de **DzNa** durant la réaction et la formation exclusive des complexes $[(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{diamine})(\text{SH})]^+$ a été mise en évidence par spectrométrie de masse ESI-MS (Schéma B7).

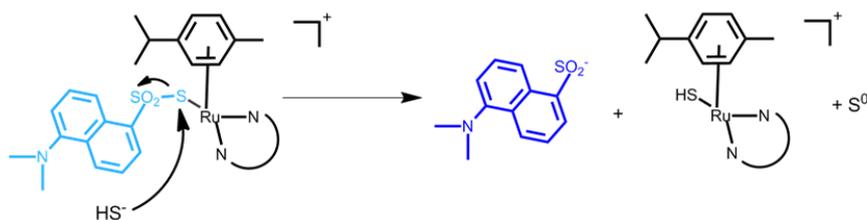


Schéma B7 : Mécanisme proposé pour la réactivité des complexes **II-1** et **II-2** avec HS^-

Nous avons au préalable montré^[142] que des complexes analogues à **II-1** et **II-2** réagissaient avec H_2S dans un solvant aprotique (DMSO) pour conduire à deux composés distincts avec des mécanismes différents (Schéma B8). Il semble donc qu'en solution aqueuse la réaction inattendue observée avec la bipyridine ne soit pas prépondérante. La formation des dérivés $[\text{Ru-SH}]$ peut quant à elle s'expliquer par la désulfuration des intermédiaires $[\text{Ru-SSH}]$ ou $[\text{Ru-S-S-S-Ru}]$.

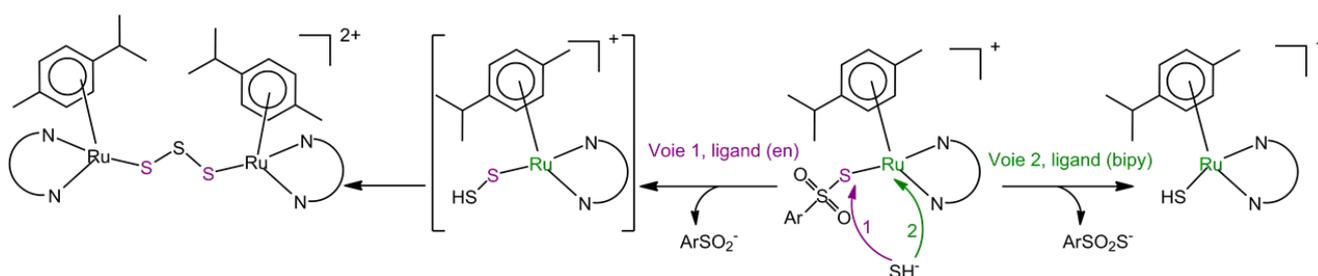
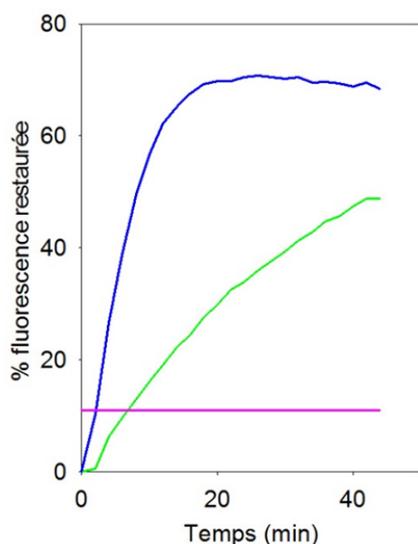


Schéma B8 : Réactions des complexes $[(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{diamine})(\text{SSO}_2\text{Ar})]^+$ avec HS^-

En considérant que la réaction ne fasse intervenir que le mécanisme décrit dans le Schéma B7, on notera cependant, en nous appuyant sur le Spectre B5 qui représente le pourcentage de fluorescence restaurée en fonction du temps, que nous n'arrivons pas à un rapport F/F_0 de 100%. Le plateau observé pour les deux complexes est en effet proche de 70% (valeur extrapolée pour **II-1**). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette observation :

- i) Une réaction entre le sulfinate libéré et le soufre(0) présent en solution pour conduire au thiosulfonate **DzSNa** de départ moins fluorescent, hypothèse défendue par la légère baisse de la fluorescence observée pour le complexe **II-2** après une dizaine de minutes.
- ii) Des réactions secondaires, comme l'attaque de SH^- directement sur le métal, aboutissant alors au relargage du ligand **DzSNa** moins fluorescent.



*Spectre B5 : Pourcentage de libération du fluorophore pour le complexe **II-1** en vert et pour le complexe **II-2** en bleu. En rose est indiqué le niveau de fluorescence du ligand libre **DzSNa***

Si le complexe **II-1** permet une détection plus sensible, sa cinétique de réaction est en revanche plus lente que celle du complexe **II-2**. Un simple ajustement des courbes du Spectre B5 par une fonction monoexponentielle conduit effectivement à des constantes cinétiques k_{obs} de 0.15 ± 0.01 et $0.03 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ respectivement ($R^2 = 0.986$ et 0.999). En dehors des effets stériques/électroniques difficiles à quantifier, le fait que l'éthylènediamine soit connue pour être un excellent donneur de liaison H dans ce type de complexes [(arène)ruthénium] pourrait expliquer cette cinétique.^[143] Une première hypothèse serait de considérer la présence d'une liaison hydrogène entre un proton du ligand éthylènediamine et l'un des oxygènes de la fonction thiosulfonato, qui activerait ainsi la liaison S—SO₂, comme observé dans notre groupe par diffraction aux rayons X dans un composé voisin.^[113a] Une seconde serait que l'approche du nucléophile anionique est favorisée par une interaction avec le ligand diamine (Schéma B9).

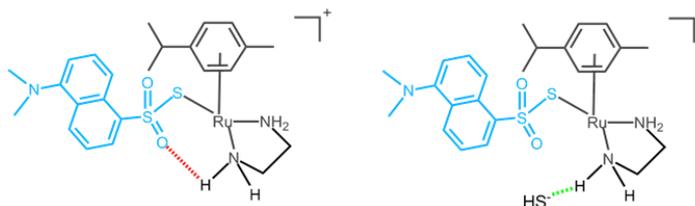
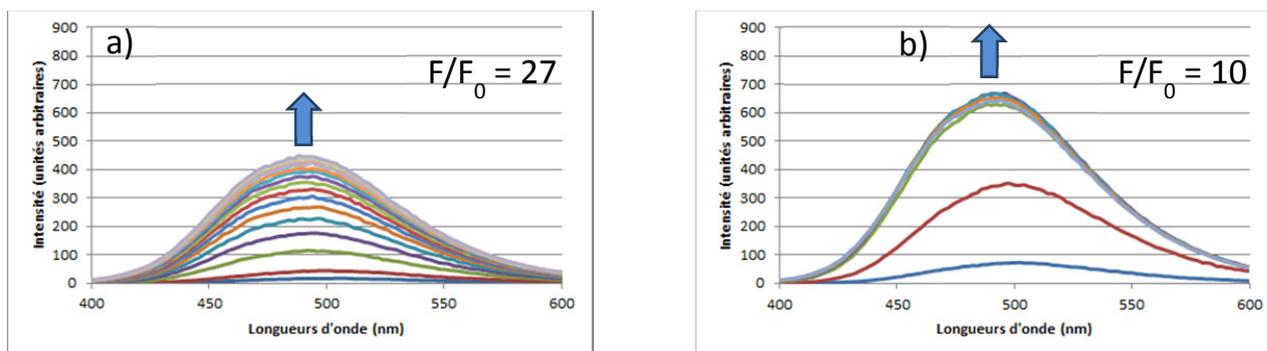


Schéma B9 : Hypothèses justifiant la cinétique plus rapide observée avec le complexe **II-2**

3.3. RÉACTIVITÉ AVEC LA CYSTÉINE

Fort de ces résultats satisfaisants concernant la réactivité des sondes, nous avons ensuite étudié leur sélectivité, vis-à-vis de la cystéine, dans les mêmes conditions (Spectre B6).



Spectre B6 : Suivi de l'émission des sondes **II-1** et **II-2** basées sur le ruthénium après addition de 100 eq CysSH
(15 μM dans tampon HEPES 50 mM pH = 7.4 avec 1% DMSO, $\lambda_{\text{exc}} = 312 \text{ nm}$)
avec un intervalle de 2 minutes entre chaque spectre

Malheureusement, la sonde n'est pas sélective, puisqu'une restauration de la fluorescence analogue à celle obtenue précédemment est observée. De plus, les constantes cinétiques sont supérieures, d'un facteur 3 par rapport à celles obtenues avec le sulfure d'hydrogène, avec des valeurs k_{obs} de 0.44 ± 0.11 et $0.08 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0.944$ et 0.996). Ainsi la plus forte concentration de l'espèce HS^- par rapport à CysS^- au pH considéré (7.4) ne suffit pas à induire une sélectivité sur ces sondes basées sur la coupure d'une liaison $\text{S}-\text{SO}_2$, au contraire

de senseurs faisant intervenir le clivage d'une liaison C—O ou C—N résultant de l'attaque nucléophile du dérivé soufré sur un carbone sp^2 .^[111-113]

4. CONCLUSION

Les sondes **II-1** et **II-2** sont réactives vis-à-vis des dérivés soufrés, résultant en une forte augmentation de l'intensité de fluorescence en milieu tamponné aqueux. Malheureusement, elles ne sont pas sélectives pour H_2S , et si des acides aminés tels que la méthionine, la lysine ou la sérine ne réagissent pas, les dérivés de la cystéine tel que le glutathion, ou dans une moindre mesure les nucléophiles SO_3^{2-} et $S_2O_3^{2-}$ conduisent tous à une restauration plus ou moins importante de la fluorescence (Tableau B1).

	II-1	II-2
GSH (100 eq)	18	10
Na_2SO_3 (1000 eq)	17.4	9.2
$Na_2S_2O_3$ (1000 eq)	6.7	8.5
Lys (1000 eq)	1	1
Met (100 eq)*	1	1
Ser (1000 eq)	1	1

Tableau B1 : Rapports F/F_0 enregistrés une heure après addition de divers nucléophiles à une solution de **II-1** ou **II-2** (15 μM dans tampon HEPES 50 mM pH = 7.4 avec 1% DMSO, $\lambda_{ex} = 312$ nm) *L'utilisation de 1000 équivalents est impossible en raison de problèmes de solubilité

II Sonde basée sur le cobalt

Afin d'améliorer la sélectivité vis-à-vis d' H_2S , nous avons envisagé une nouvelle stratégie, utilisant cette fois le cobalt(III) comme centre métallique inerte.

1. PRINCIPE

Le principe repose toujours sur une réactivité avec le ligand, en couplant cette fois une réactivité avec le centre métallique. Ceci est en effet possible grâce aux deux pKas d' H_2S , lui

permettant en théorie de s'additionner dans un premier temps sur le ligand, puis de venir dans un second temps interagir avec le métal (Schéma B10).

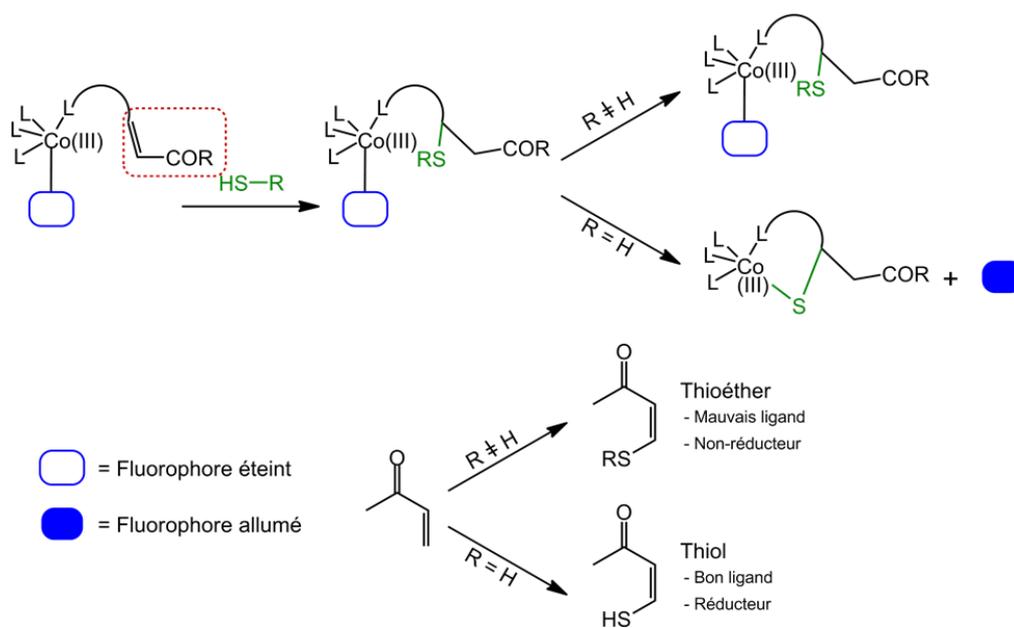


Schéma B10 : Stratégie envisagée pour une reconnaissance sélective de H_2S

Nous avons sélectionné une cétone α,β -insaturée pour jouer le rôle d'accepteur d'électrophile ; en effet, cette dernière est très réactive vis à vis des thiols. Dans le cas d'une réaction avec HS^- , un thiol, bon ligand et réducteur, devrait être obtenu. Le ligand pentadente résultant, possédant une affinité pour le métal supérieure au fluorophore, devrait faciliter sa décoordination. Au contraire, la réaction avec un thioéther conduira à la formation d'un thioéther plus inerte (Schéma B10) et donc le fluorophore devrait rester coordonné au centre métallique.

L'accepteur de Michael sera greffé sur un ligand tétradente dérivé de la **tris(2-pyridylmethyl)amine (TPA)**, chélate couramment utilisé comme ligand en chimie de coordination (Schéma B11). Le ligand fluorescent choisi est un **dérivé bidente de la coumarine**, pour stabiliser la sphère de coordination octaédrique du cobalt(III).

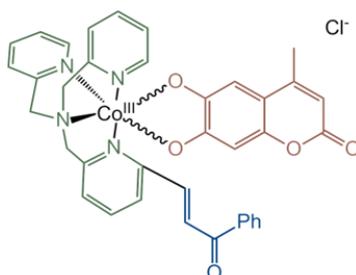


Schéma B11 : Sonde visée basée sur le cobalt (II-3)

2. SYNTHÈSE

Le ligand a été synthétisé à partir de pyridine 2,6-diméthanol en 4 étapes. Celle-ci est dans un premier temps disymétrisée dans l'acide bromhydrique au reflux pendant 1 h, pour conduire à un mélange de composés séparés par chromatographie sur gel de silice.^[144] Le composé monobromé résultant est ensuite couplé avec la dipicolylamine dans l'acétonitrile, pour obtenir le dérivé **TPA-CH₂OH** avec un rendement de 71%.^[145] La réaction la plus intéressante de cette synthèse est sans doute l'oxydation de la fonction méthyl-alcool en carboxaldéhyde par l'acide 2-iodoxybenzoïque (IBX) qui est propre, facile à mettre en œuvre, sélective et quantitative.^[146] Il ne reste ensuite qu'à coupler le composé **TPA-CHO** ainsi obtenu avec l'acétophénone pendant une nuit dans le THF en présence de base pour obtenir le ligand final **TPA-Michael** avec un rendement de 63% (Schéma B12).^[147]

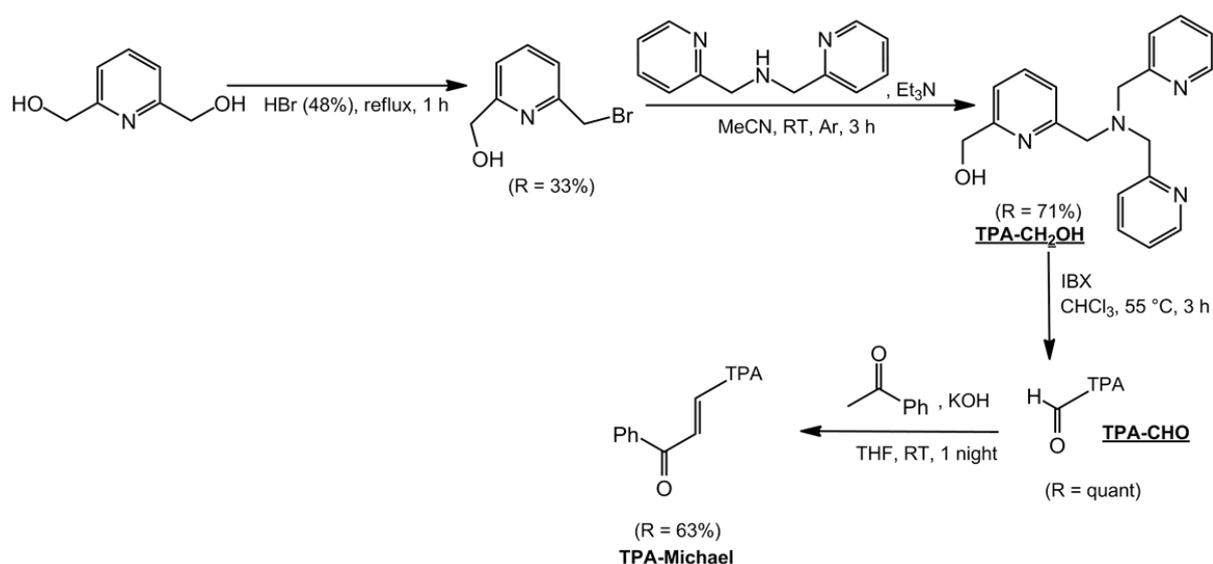
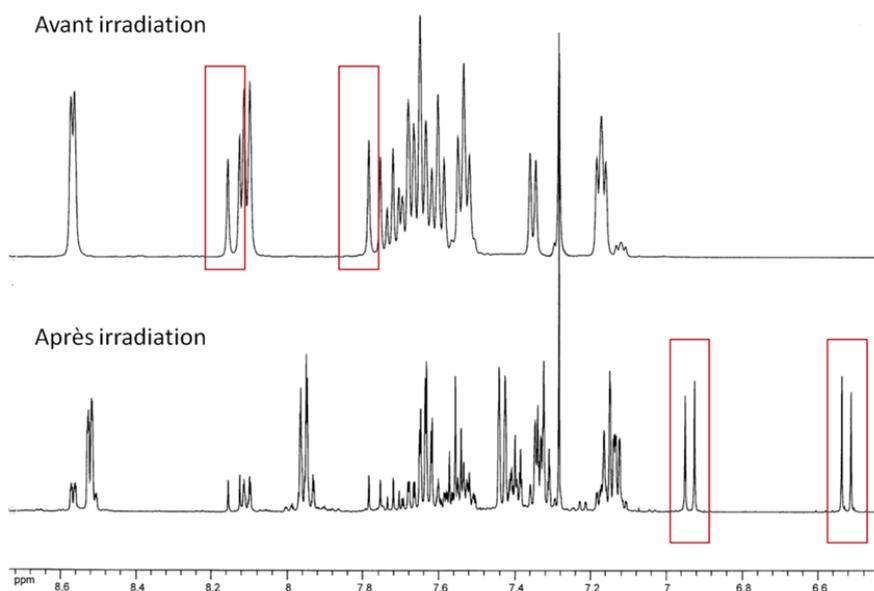


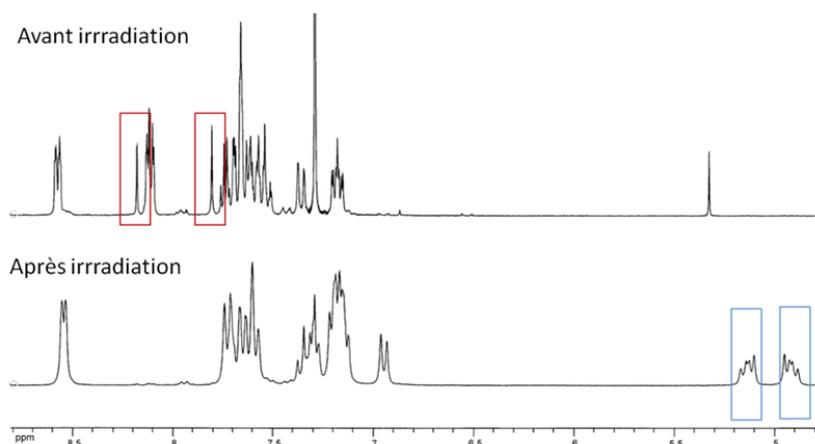
Schéma B12 : Synthèse du ligand **TPA-Michael**

La dernière étape de cette synthèse, à savoir le couplage à l'acétophénone, nous a posé quelques difficultés. En effet, il s'est avéré que le ligand **TPA-Michael** est photosensible, à la fois en solution et à l'état solide. La synthèse et la purification doivent donc s'effectuer à l'abri de la lumière, l'irradiation du ligand en solution dans le chloroforme deutéré derrière une fenêtre conduisant en quelques minutes à une modification drastique du spectre RMN ^1H correspondant (Spectre B7). En particulier, les protons vinyliques (en rouge sur le Spectre B7) subissent un fort blindage ainsi qu'une diminution de la constante de couplage $J^3_{\text{H-H}}$ (de 15.1 à 12.2 Hz), en accord avec la classique isomérisation photoinduite *trans-cis* des énones.



Spectre B7 : RMN ^1H du ligand **TPA-Michael** en solution dans CDCl_3
avant et après irradiation 1 h derrière une fenêtre

A l'état solide, le composé est aussi sensible à la lumière, mais le produit obtenu est dans ce cas différent : en effet, sur le spectre RMN ^1H enregistré après avoir laissé le ligand sous forme de poudre 48 heures près d'une fenêtre, les protons vinyliques ont disparu et sont remplacés par deux multiplets (en bleu sur le Spectre B8) voisins de 5 ppm.



Spectre B8 : RMN ^1H du ligand **TPA-Michael** avant et après irradiation à l'état solide derrière une fenêtre

Le pic majoritaire observé sur le spectre de masse (ESI+) de ce composé formé lors de l'irradiation en phase solide correspond à deux fois ($m/z = 842.1$) la masse du ligand **TPA-Michael** ($m/z = 421.5$). Ce résultat, ainsi que les déplacements chimiques observés en RMN, sont en accord avec une dimérisation du ligand **TPA-Michael** pour conduire au cyclobutane correspondant **[TPA]₂-cyclo** (Schéma B13), selon une réaction analogue à la photodimérisation de l'acide cinnamique $\text{PhCH}=\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})$.^[148]

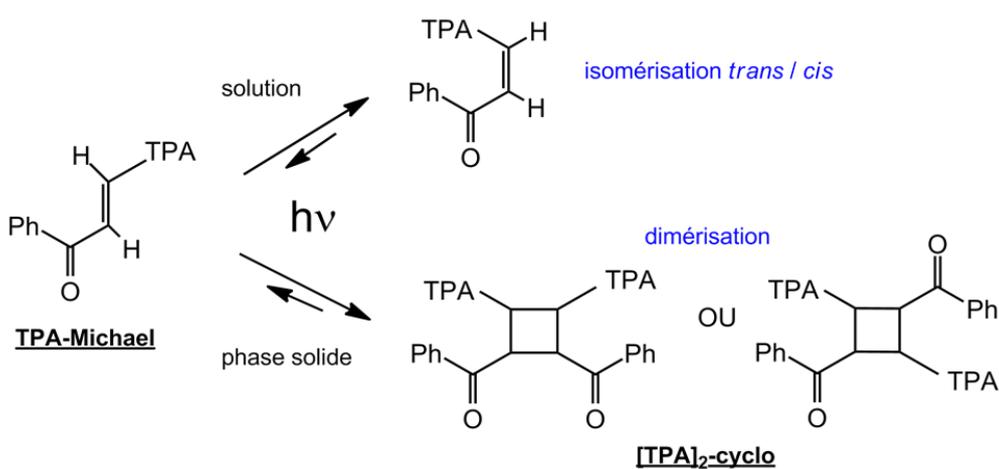
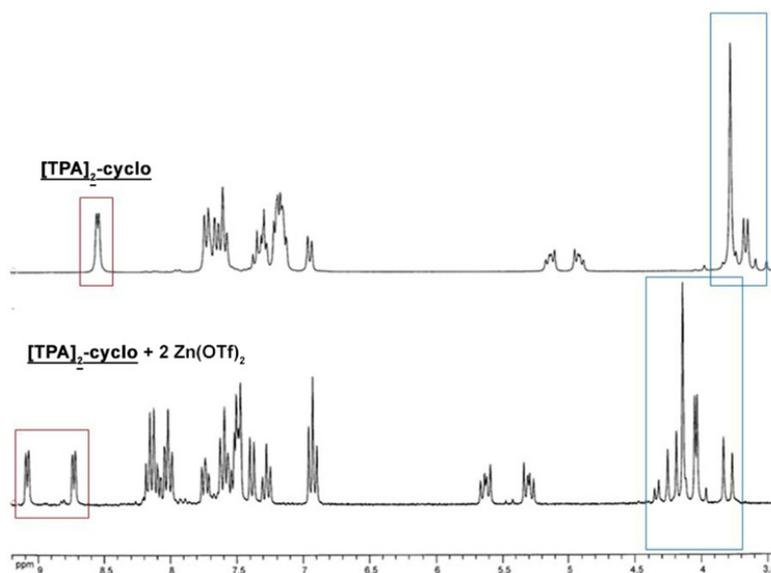


Schéma B13 : Réactivité photochimique du ligand **TPA-Michael**

La stéréochimie autour du cycle à quatre chaînons n'a pas pu être éclaircie par des expériences RMN à une et deux dimensions, étant donné que celles-ci ne permettent pas de trancher définitivement entre la formation de dimères dits « head to tail » et « head to head »^[149] ni sur la configuration absolue des carbones du cyclobutane.

Nous avons donc métallé le ligand avec le sel de zinc $Zn(OTf)_2$ afin de rigidifier le système, pour favoriser la formation de cristaux. L'insertion du zinc dans le TPA est aisément détectable sur le spectre RMN 1H du complexe obtenu après métallation, en particulier par une baisse de la symétrie de la molécule visible au niveau des protons *ortho* des pyridines (en rouge sur le Spectre B9) ou des protons méthyléniques (en bleu).



Spectre B9 : RMN 1H (CD_3CN) enregistrée avant et après addition de 2 eq $Zn(OTf)_2$ au ligand **[TPA]₂-cyclo**

La structure aux rayons X du complexe cristallisé dans un mélange chloroforme/acétonitrile est représentée dans la Figure B2. La géométrie autour du cyclobutane correspond à celle de l'isomère acide α -truxillique pour la dimérisation de l'acide cinnamique, avec les deux groupements TPA en position 1,3 *anti* sur le cycle à quatre chaînons. Le zinc est dans un environnement pentacoordiné, le cinquième ligand étant une molécule de solvant de cristallisation.

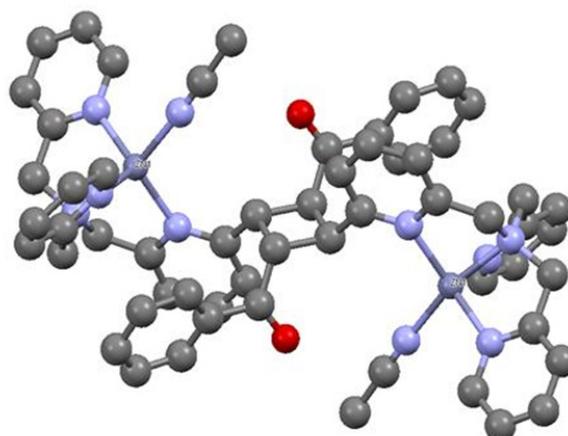


Figure B2 : Structure aux rayons X du complexe obtenu lors de la réaction entre 2 eq $Zn(OTf)_2$ avec le ligand $[TPA]_{2-}^{cyclo}$. Les contre-ions triflate et les hydrogènes ne sont pas représentés

La coumarine choisie (MLH_2) comme fluorophore est synthétisée en une étape par condensation de l'acétoacétate d'éthyle sur le benzène-1,2,4-triol dans l'acide perchlorique avec un rendement de 59% (Schéma B14).

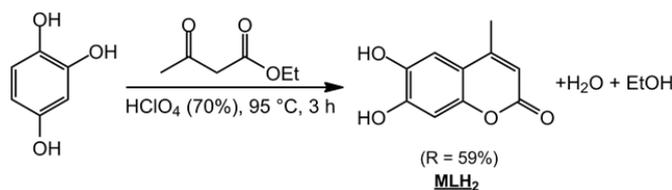


Schéma B14 : Synthèse de la coumarine MLH_2

La synthèse du complexe **II-3** est classique pour ce type de dérivés, bien que réalisée dans l'obscurité pour éviter la photodimérisation du ligand (Schéma B15) et dans le DMF pour éviter une addition de Michael du solvant sur le bras accepteur (observée dans le méthanol par spectrométrie de masse). Elle est effectuée en trois étapes : le ligand est d'abord métallé sous argon avec du chlorure de cobalt à température ambiante, puis la coumarine, déprotonée au préalable par deux équivalents KOH, est ajoutée au mélange. La solution jaunâtre devient alors violet intense. Le tube de Schlenk est ensuite ouvert à l'air avec une garde calcique afin d'oxyder en une nuit le complexe de cobalt(II) en cobalt(III). Le complexe **II-3** est obtenu pur

après précipitation dans l'éther sous la forme de cristaux vert foncé, avec un rendement de l'ordre de 80%.

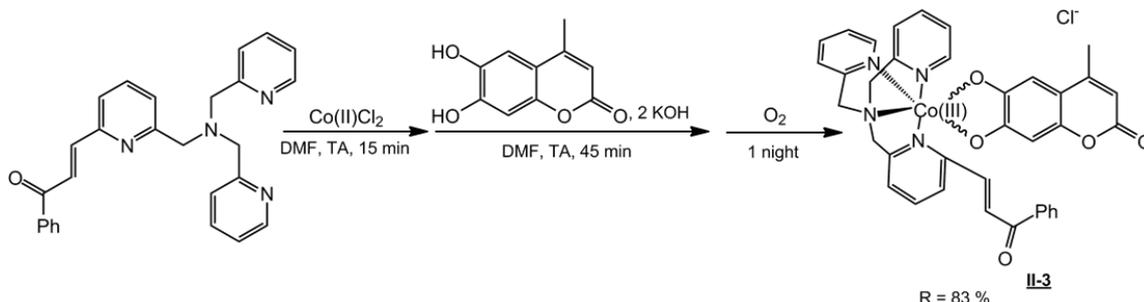
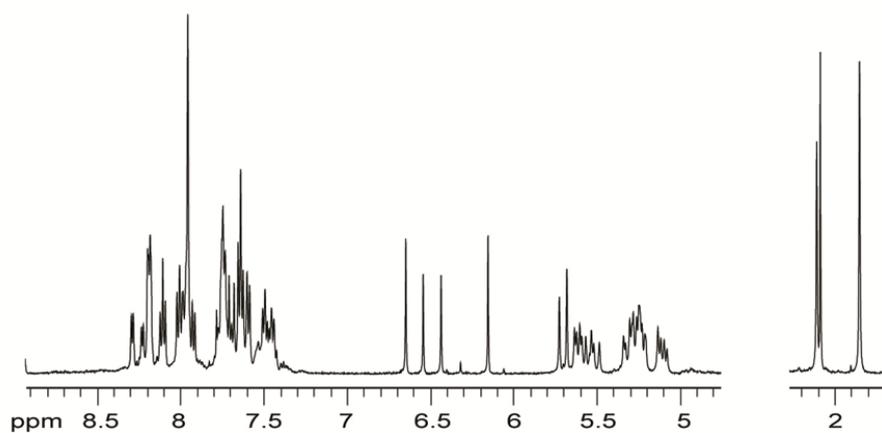


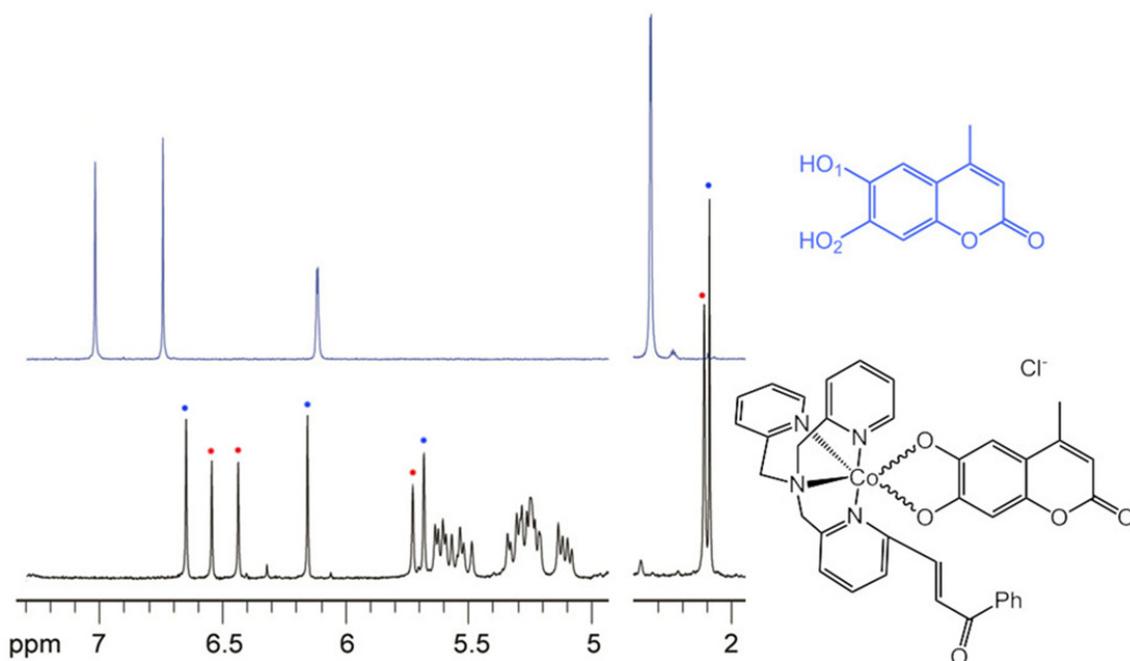
Schéma B15 : Synthèse du complexe **II-3**

Le spectre RMN obtenu est diamagnétique (Spectre B10), comme attendu pour les complexes de cobalt(III) bas-spin. On notera que les signaux des protons méthyléniques entre 5.0 et 5.8 ppm, ainsi que les signaux des aromatiques entre 7.3 et 8.3 ppm deviennent extrêmement complexes.



Spectre B10 : RMN ^1H du complexe **II-3** (DMSO-d_6)

Nous nous contenterons par conséquent d'étudier les signaux de la coumarine (Spectre B11), plus facilement interprétables. On observe alors immédiatement un dédoublement des quatre signaux des protons du fluorophore, indiquant la présence de deux complexes isomères avec une proportion d'environ 60/40. Ces isomères se différencient par la position relative de l'azote de l'amine tertiaire du ligand et de l'oxygène O_1 .



Spectre B11 : Superposition des spectres RMN ^1H de la coumarine libre en haut, et du complexe **II-3** en bas (DMSO d_6)

Afin de mettre en évidence le rôle du bras cétone α,β -insaturée dans la réactivité du complexe **II-3**, le complexe analogue **II-4** ne comportant pas cet accepteur de Michael a été synthétisé suivant le même mode opératoire. Nous nous attacherons ensuite à les comparer à chaque étude (Schéma B16).

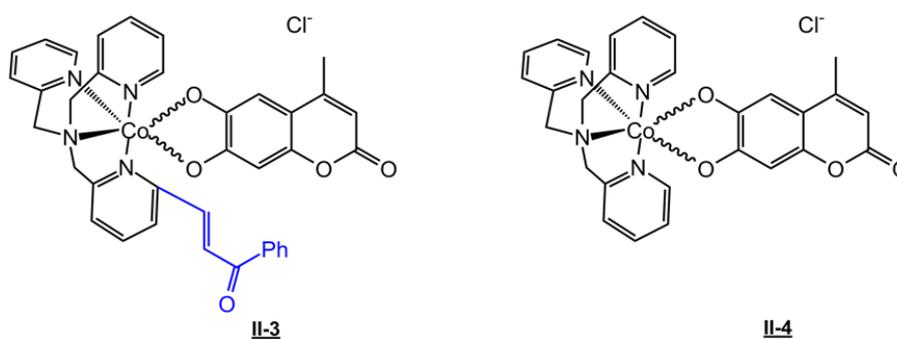


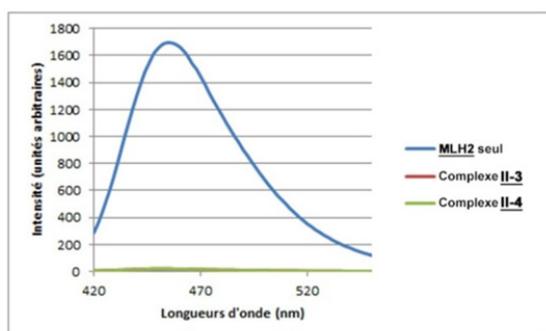
Schéma B16 : Structure des complexes **II-3** et **II-4**

3. ÉTUDES DE REACTIVITE

3.1. FLUORESCENCE

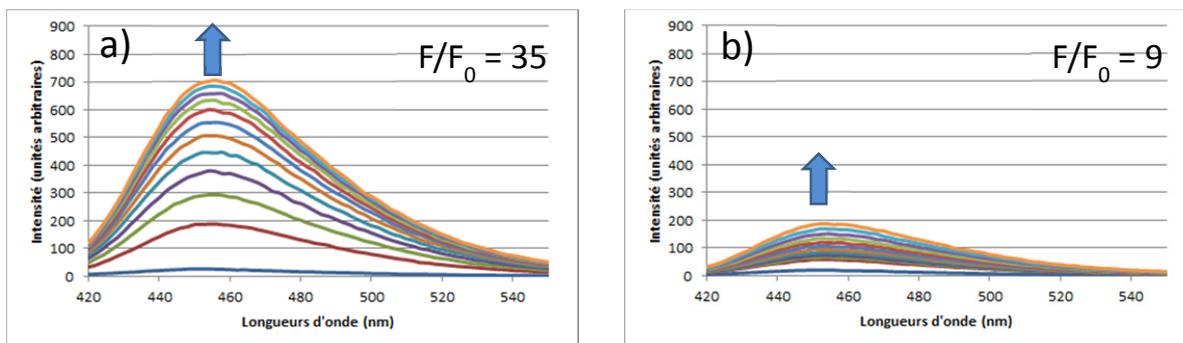
Comme précédemment, nous avons tout d'abord étudié l'efficacité de l'extinction de la fluorescence de la coumarine **ML** par le cobalt à une concentration de 10 μM dans l'HEPES (50 mM pH 7.4) contenant 0.5% de DMSO (Spectre B12). À nouveau, la charge du complexe permet de travailler en milieu aqueux.

On peut alors noter que le cobalt est un bien meilleur quencheur de fluorescence que le ruthénium utilisé précédemment étant donné qu'ici, le fluorophore est quasiment silencieux lorsque lié au métal dans les complexes **II-3** et **II-4** avec des courbes superposables proches de zéro et donc un quenching de fluorescence d'un facteur proche de 100%.



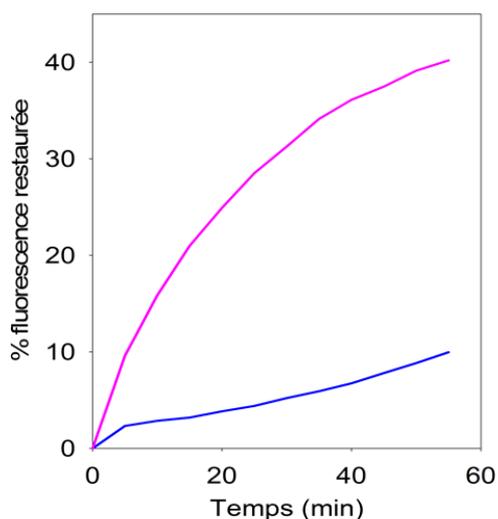
*Spectre B12 : Spectres d'émission de la coumarine libre **MLH₂** et des complexes **II-3** et **II-4** 10 μM dans l'HEPES 50 mM pH 7.4 contenant 0.5% de DMSO, $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$)*

La libération de la coumarine du complexe **II-3** est suivie après addition de 10 eq NaSH ou de 10 eq CysSH (Spectre B13). En effet ce complexe est plus réactif que les dérivés du ruthénium, et il n'est pas nécessaire d'utiliser un large excès de nucléophile soufré. La libération est suivie par émission de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 390 nm pendant 1 h, le premier spectre est enregistré immédiatement après ajout, puis chaque spectre suivant est enregistré à 5 min d'intervalles. Contrairement aux sondes basées sur le ruthénium, nous pouvons ici observer une (légère) sélectivité en faveur de NaSH par rapport à la cystéine. En effet, un excellent rapport F/F_0 égal à 35 est obtenu lors de la réaction avec H_2S , alors qu'un rapport de 9 est obtenu avec CysSH.



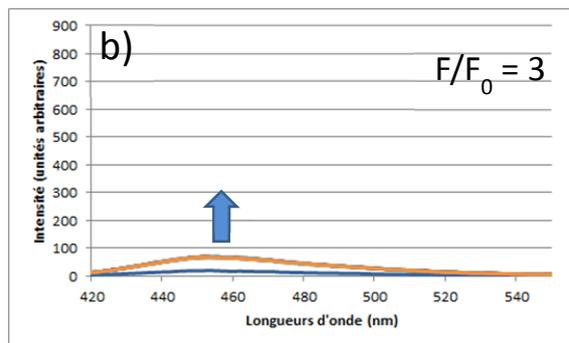
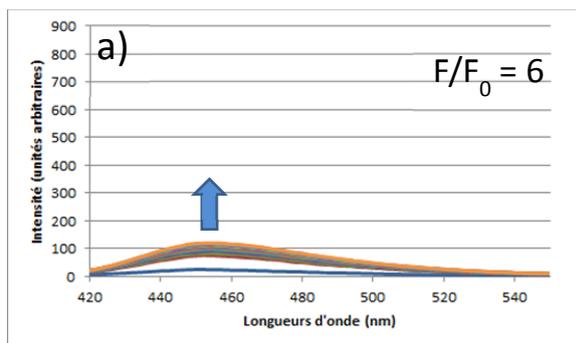
Spectre B13 : Suivi de l'émission de fluorescence du complexe **II-3** après addition de a) 10 eq NaSH b) 10 eq CysSH (10 μ M dans l'HEPES 50 mM pH 7.4 contenant 0.5% de DMSO, $\lambda_{ex} = 390$ nm)

Les courbes représentant la restauration de la fluorescence en fonction du temps sont représentées dans le Spectre B14. Si la réaction du complexe **II-3** avec NaSH semble bien, dans les conditions utilisées, suivre une cinétique d'ordre 1 ($k_{obs} = 0.041 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$, $R^2 = 0.998$), ce n'est pas le cas pour la réaction avec la cystéine, indiquant un mécanisme différent.



Spectre B14 : Pourcentage de libération du fluorophore pour le complexe **II-3** après addition de 10 eq NaSH en bleu (%Fmax = 40.1) et 10 eq CysSH en rouge (%Fmax = 9.7)

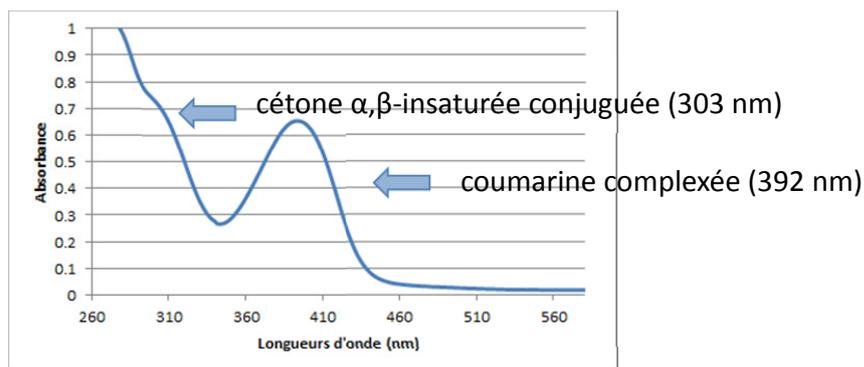
Dans les mêmes conditions (Spectre B15), le complexe **II-4** est quant à lui beaucoup moins réactif, avec des rapports de fluorescence F/F_0 obtenus après 1 heure divisés par 3 pour la cystéine et par 6 pour le sulfure d'hydrogène, par rapport à **II-3**. Ceci indique donc une participation significative du bras accepteur dans la réactivité du complexe **II-3**.



Spectre B15 : Suivi de l'émission de fluorescence du complexe **II-4** après addition de a) 10 eq NaSH b) 10 eq CysSH (10 μ M dans l'HEPES 50 mM pH 7.4 contenant 0.5% de DMSO, λ_{ex} = 390 nm)

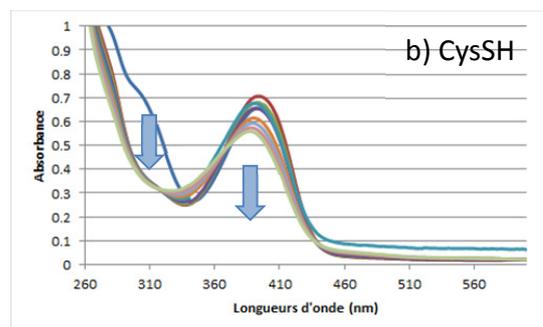
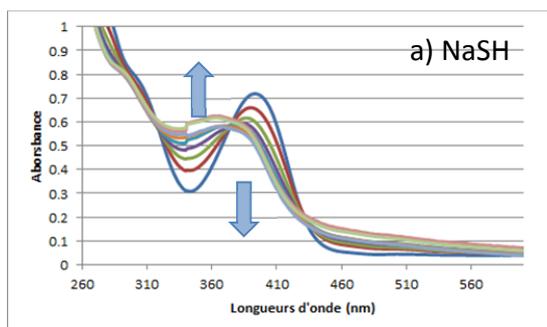
3.2. UV-VISIBLE : ETUDE MECANISTIQUE

L'observation d'un mécanisme vraisemblablement différent dans les réactions de **II-3** avec NaSH ou CysSH nous a poussés à étudier la libération du fluorophore par spectrométrie UV-visible, afin de pouvoir suivre la réactivité de l'énone. En effet, le spectre d'absorption du complexe **II-3** (Spectre B16) peut se décomposer en deux parties : l'absorption de la cétone α,β -insaturée conjuguée vers 303 nm, et l'absorption de la coumarine complexée à 392 nm. Le spectre du composé **II-4** ne comporte lui évidemment que l'absorption liée à la coumarine.



Spectre B16 : Spectre UV-visible du complexe **II-3** (10 μ M dans l'HEPES 50 mM pH 7.4 contenant 3% de DMSO)

Le suivi UV-visible de la libération de la coumarine par le complexe **II-3** après addition de 20 eq NaSH ou CysSH est présenté dans le Spectre B17 ci-dessous.



Spectre B17 : Évolution du spectre UV-visible du complexe **II-3** après addition de a) 20 eq NaSH ou b) 20 eq CysSH (10 μ M dans l'HEPES 50 mM pH 7.4 contenant 3% de DMSO)

On observe alors deux modes de réactivité différents. En effet l'addition de NaSH ne modifie pas la bande π - π^* vers 300 nm, alors que celle-ci disparaît immédiatement après l'addition de cystéine. Comme observé lors des études en fluorescence, la libération du fluorophore en solution (absorption à 360 nm) est plus rapide pour NaSH que pour la cystéine. Cette étude met en avant une réactivité se situant sur le centre métallique dans le cas de NaSH, sans addition sur le bras accepteur de Michael, alors que la cystéine s'ajouterait en premier sur le ligand, le fluorophore étant déplacé dans un second temps (Schéma B17).

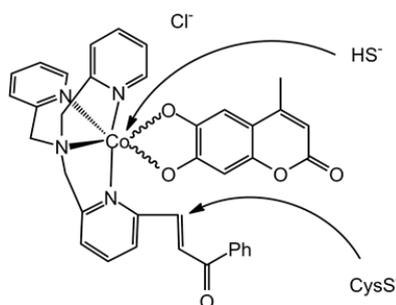
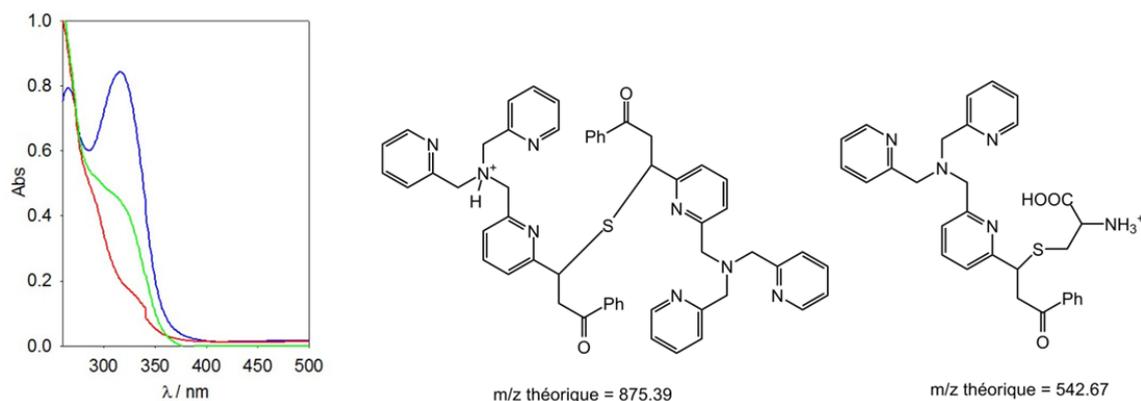


Schéma B17 : Réactivités proposées pour NaSH et CysSH vis-à-vis du complexe **II-3**

La meilleure affinité de la cystéine pour l'énone est confirmée dans le Spectre B18, qui présente les spectres UV-Visible du ligand **TPA-Michael** seul, après addition de deux équivalents de cystéine ou de 20 équivalents de NaSH, dans l'HEPES. L'utilisation de la cystéine conduit à une totale disparition du système conjugué, alors que 20 équivalents de NaSH ne conduisent qu'à une réaction incomplète. Les spectres de masse enregistrés après ces réactions indiquent la formation des composés suivants : le ligand dimère centré sur un atome

de soufre après addition de NaSH ($M + H^+ = 875.3$) et le ligand avec la cystéine additionnée sur l'accepteur de Michael ($M + H^+ = 542.1$) (Schéma B18).



Spectre B18 : Spectres UV-visible du ligand **TPA-Michael** avant (bleu) et après addition de 2 eq CysSH (rouge) ou 20 eq NaSH (vert) ($12 \mu\text{M}$ dans l'HEPES 50 mM pH 7.4 contenant 3% de DMSO)

Schéma B18 : Structures de deux produits correspondant aux masses observées après addition du nucléophile sur le ligand **TPA-Michael**

L'accepteur de Michael ne semble donc pas intervenir dans la réaction avec NaSH. Cependant, nous avons vu que le complexe **II-3** est plus réactif que le complexe **II-4**, qui lui ne comporte pas ce groupement énone. Cette différence peut s'expliquer par la gêne stérique induite au voisinage du centre métallique dans **II-3** : dans le cas d'un mécanisme de substitution essentiellement dissociatif (c'est-à-dire dans lequel la rupture d'une liaison Co—Ligand conduit à la formation d'une nouvelle liaison Co—Ligand), classiquement observé dans les complexes octaédriques du cobalt(III), l'encombrement stérique du ligand favorise effectivement la dissociation et accélère donc la réaction de substitution.^[150] Enfin, il est possible qu'une réduction partielle du cobalt(III) en cobalt(II) puisse intervenir dans le cas de la réaction avec HS^- , sur la base d'études préliminaires RPE, mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer/quantifier ce mécanisme.

III Conclusion du chapitre II : Sondes à sulfure d'hydrogène

Nous avons donc synthétisé trois sondes fluorescentes utilisant la chimie de coordination d'une manière originale, puisque l'objectif était que la réaction avec l'analyte H_2S prenne place au niveau du ligand, et non pas au niveau du métal utilisé comme quencheur, comme c'est le cas avec les sondes classiques basées sur un déplacement de ligand. Ces sondes, contrairement à celle préalablement synthétisée au laboratoire, permettent de travailler en milieu aqueux tamponné et sont de type « turn-on ». Si elles conduisent toutes trois à de fortes augmentations de l'intensité de fluorescence en présence d' H_2S , leur sélectivité vis-à-vis d'autres molécules soufrées reste néanmoins insuffisante, notamment au regard des senseurs actuellement proposés dans la littérature.

Ce chapitre, contrairement aux chapitres II et IV, ne vise pas à développer d'outils moléculaires pour l'étude du rôle d'H₂S en biologie, mais il se présente plutôt comme un défi synthétique. En effet, comme nous l'avons vu en introduction, dans certaines protéines telles que les hémoglobines des coquillages *Lucina pectinata* et des bactéries *Bacillus subtilis* ou *Thermobifida fusca*, la nature des interactions entre le sulfure d'hydrogène et les acides aminés du site actif joue un rôle clef dans la réactivité d'H₂S. En particulier, dans ces systèmes, les liaisons hydrogènes gouvernent en partie la chimie rédox d'H₂S.

L'objectif de cette partie est donc de mettre au point un schéma synthétique permettant d'accéder à un complexe mononucléaire de fer comportant comme ligand un groupement hydrosulfure SH accepteur de liaison hydrogène.

I Chimie de coordination d'H₂S

Avant de rapidement discuter de la chimie de coordination du sulfure d'hydrogène, il est utile de rappeler que ce dernier possède deux pK_as, et qu'il peut donc exister sous 3 formes en solution (Schéma C1).

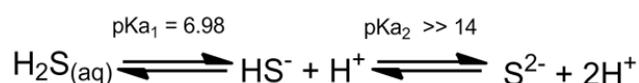


Schéma C1 : Équilibres acido-basiques du sulfure d'hydrogène

Sa chimie de coordination fait essentiellement intervenir les formes anioniques HS⁻ et S²⁻, la forme neutre étant uniquement trouvée dans quelques complexes du ruthénium (Schéma C2).^[151]

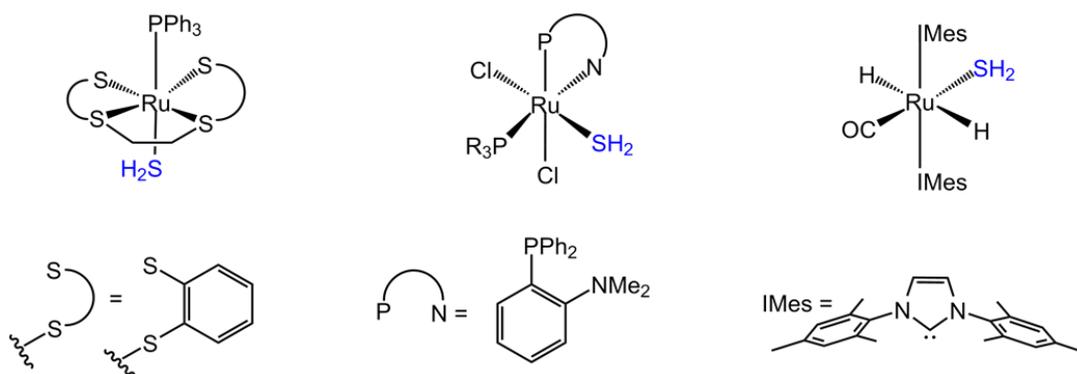


Schéma C2 : Structures de complexes $[Ru(H_2S)]$ présents dans la littérature

L'existence du second pKa $HS^- = H^+ + S^{2-}$ est source de diversité dans la chimie de coordination du sulfure d'hydrogène, mais c'est aussi un problème majeur du point de vue synthétique. En effet, l'acidité du proton de HS^- augmente une fois lié à un métal de transition, et facilite ainsi sa déprotonation (bien souvent le ligand HS^- est lui-même suffisamment basique pour venir déprotoner sa forme coordonnée), ce qui conduit soit à la formation de sulfures métalliques insolubles, soit à la formation d'espèces dont la nucléarité est difficilement contrôlable (Schéma C3).

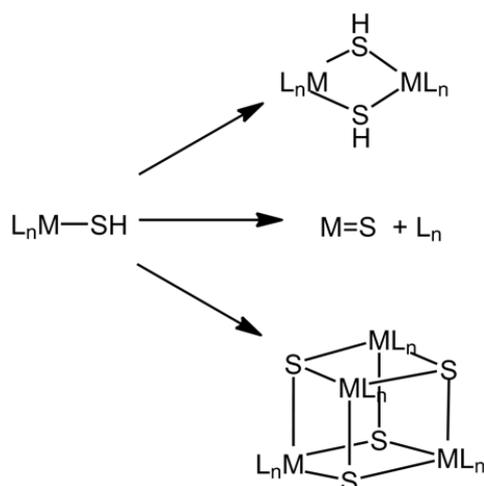


Schéma C3 : Exemples d'espèces pouvant se former à partir d'un complexe $[L_nM(SH)]$

Trois raisons majeures ont poussé à l'étude de la chimie de coordination du sulfure d'hydrogène :

- i) les procédés d'hydrodésulfuration permettant d'éliminer le soufre du gaz naturel et des produits pétroliers qui utilisent classiquement des sulfures métalliques comme catalyseurs,^[152]
- ii) la recherche de catalyseurs permettant de convertir le sulfure d'hydrogène en hydrogène,^[153]
- iii) la compréhension du mécanisme de certaines métalloenzymes ou cofacteurs métalliques possédant H₂S coordiné sous une de ses formes au sein de leur site actif.

En dehors des exemples déjà discutés en introduction, quelques rares liaisons [M—SH] ont en effet été proposées dans des systèmes biologiques : dans le cofacteur molybdoptérine des xanthine oxydases lors du cycle catalytique (bien que plusieurs mécanismes soient proposées, l'étape $\text{Mo}^{\text{VI}}=\text{S} \rightarrow \text{Mo}^{\text{IV}}-\text{SH}$ est commune à tous),^[154] dans le cluster FeMo des nitrogénases,^[155] ainsi que plus récemment dans un cluster [4Fe-4S].^[156] La chimie de coordination du ligand S²⁻ est en revanche, plus riche avec en particulier tous les clusters des protéines fer-soufre.^[155a, 157]

Enfin, il faut aussi garder en mémoire que la chimie de coordination d'H₂S est complexifiée par son caractère réducteur : ainsi, le seul complexe [Fe^{III}(SH)] décrit à ce jour dans la littérature^[158] résulte en réalité d'une mauvaise analyse de données cristallographiques.^[159]

II Réactivité des complexes III-1 et III-2 avec H₂S

1. CHOIX DU COMPLEXE

Afin de synthétiser un complexe de fer comportant un ligand HS⁻ interagissant par liaison hydrogène, nous avons choisi, au regard de la discussion précédente, de :

- i) Travailler avec le fer(II) qui, malgré une affinité moindre pour le sulfure d'hydrogène par rapport au fer(III), ne court pas le risque d'être réduit,

- ii) D'utiliser un chélate fort afin de limiter la formation de Fe=S,
- iii) De saturer la sphère de coordination du métal pour éviter la formation d'espèces polynucléaires.

Ces caractéristiques, ainsi que la possibilité d'envisager la formation de liaisons hydrogènes, sont présentes dans le complexe **III-1** publié en 2007 dans le groupe de *Banse*.^[160] En effet, il est basé sur un ligand pentadente comportant une fonction amide interagissant avec le centre métallique pour conduire à un dérivé du Fe(II) hexacoordiné. De plus, la fonction amide de **III-1** peut être déprotonée par une base faible pour conduire au complexe amidato correspondant **III-2**, cet équilibre étant (presque) réversible par simple addition d'acide dans le milieu (Schéma C4). La déprotonation d'un acide faible (en particulier l'eau) par une fonction amidato avait déjà été utilisée, notamment par le groupe de *Borovik*, pour de nombreuses études.^[161]

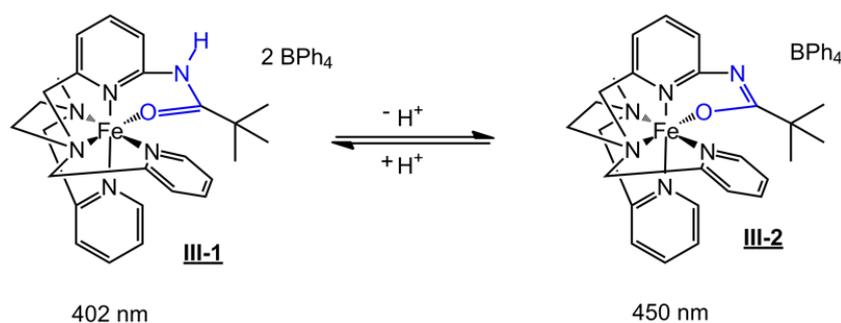


Schéma C4 : Équilibre acido-basique du complexe sélectionné et longueurs d'onde associées à chacune des formes

Enfin, les longueurs d'onde d'absorption des formes **III-1** et **III-2** sont assez éloignées pour suivre aisément les réactions par spectrométrie UV-visible.

2. SYNTHÈSE

Le ligand hexadente sélectionné a été préparé par synthèse convergente. Le premier synthon, déjà utilisé au laboratoire,^[162] a été synthétisé en deux étapes : après condensation de la 6-méthylpyridin-2-amine sur le chlorure de pivaloyle dans le dichlorométhane, le méthyle en position 6 subit une bromation radicalaire catalysée par l'AIBN à l'aide de N-bromosuccinimide (Schéma C5).^[163]

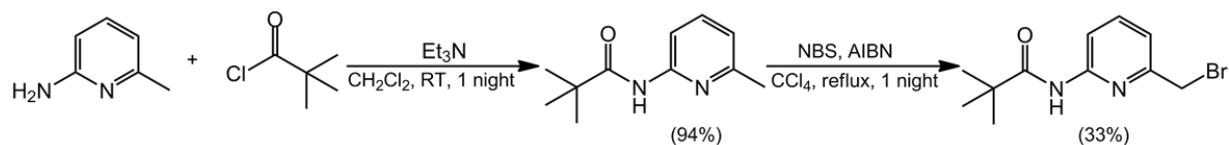


Schéma C5 : Synthèse du 1^{er} synthon

Le second synthon a été synthétisé avec de bons rendements en trois étapes comme décrit dans la publication de *Banse et al.*^[160] (Schéma C6) : deux équivalents de pyridine carboxaldéhyde sont couplés à un équivalent d'éthylènediamine et l'imine ainsi formée est ensuite réduite à l'aide de borohydrure de sodium au reflux dans le méthanol. Les deux azotes secondaires sont finalement dissymétrisés par formation puis réduction d'un pont aminal, par utilisation successive de formaldéhyde et de cyanoborohydrure de sodium.

Le ligand final **L1** est enfin obtenu par couplage des deux synthons dans l'acétonitrile.

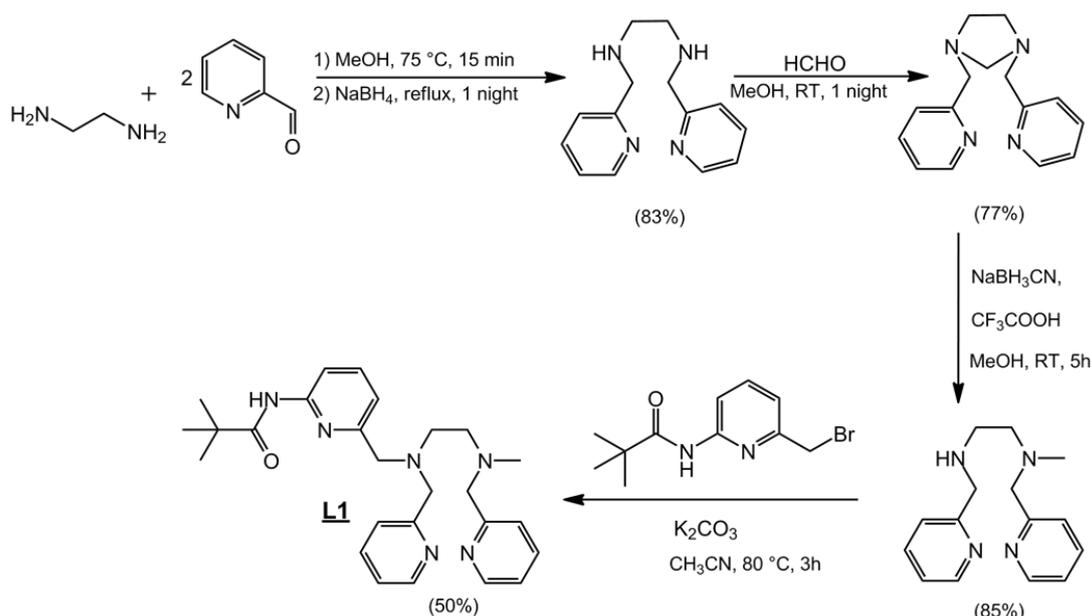
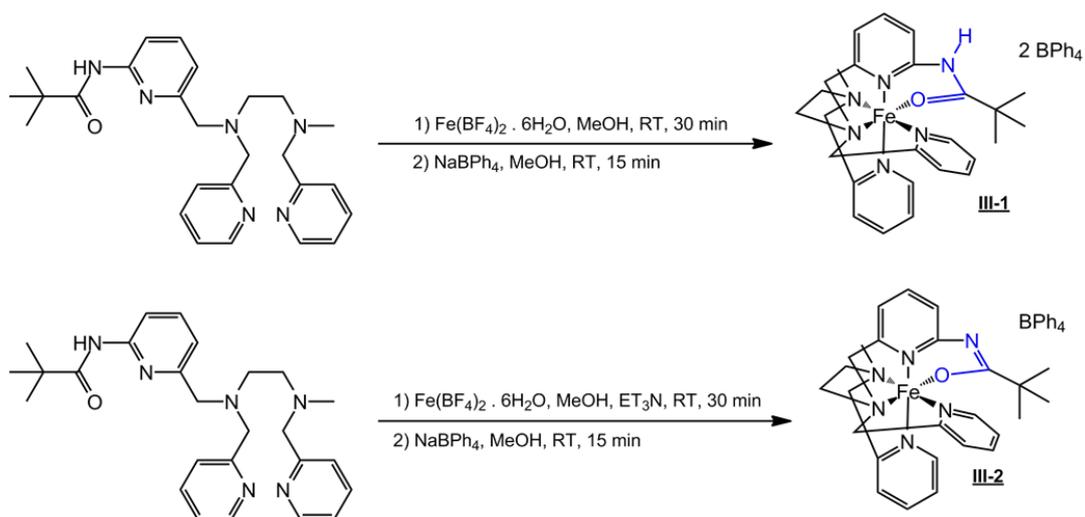


Schéma C6 : Synthèse du ligand **L1**^[160]

Une fois le ligand obtenu, nous avons préparé le complexe **III-1** par métallation dans le méthanol avec le sel $\text{Fe}(\text{BF}_4)_2$ sous atmosphère inerte, puis précipitation par échange du contre-ion BF_4 par BPh_4 . La même réaction menée dans un mélange méthanol/triéthylamine conduit au complexe amidato **III-2** (Schéma C7).



*Schéma C7 : Synthèse des complexes **III-1** et **III-2**^[160]*

3. PUBLICATION

Les études portant sur la réactivité des complexes **III-1** et **III-2** avec H_2S ont été publiées dans *Inorganic Chemistry*.^[164]

Synthesis of a Fe^{II}SH Complex Stabilized by an Intramolecular N–H···S Hydrogen Bond, Which Acts as a H₂S Donor

Erwan Galardon,^{*,†} Thomas Roger,[†] Patrick Deschamps,[‡] Pascal Roussel,[§] Alain Tomas,[‡] and Isabelle Artaud[†]

[†]Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologique et Toxicologique, UMR 8601 CNRS, Université Paris Descartes, PRES Paris cité, 45 rue des Saints Pères, 75270 Paris Cedex 06, France

[‡]Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, UMR 8015 CNRS, Université Paris Descartes, PRES Paris cité, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France

[§]Unité de Catalyse et Chimie du Solide (UCCS), UMR 8012 CNRS, École Nationale Supérieure de Chimie de Lille, BP 90108, 59652 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

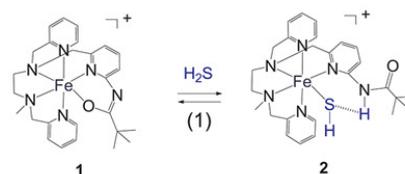
Supporting Information

ABSTRACT: Through use of the reversible protonation of an iron(II) complex containing a deprotonated carboxamido moiety, we prepared and fully characterized the first hydrogen(sulfido)iron(II) complex stabilized by an intramolecular hydrogen bond, which acts as a H₂S donor in solution.

Hydrogen bonding is a major noncovalent interaction, playing a key role as the structural determinant in many highly complex systems like proteins or DNA and in a wide range of catalytic reactions.¹ In metalloproteins, in addition to their structural role, hydrogen bonds can modulate the properties of the fragments coordinating a metallic cofactor. For example, in the case of cysteinyl ligands, hydrogen bonds have been proposed to impact the redox potential of iron–sulfur centers, as observed in rubredoxin² or in [2Fe–2S]³ and [4Fe–4S]⁴ clusters, or to account for the specific alkylation of one of the four cysteines bound to the zinc center in the ADA repair protein.⁵ To clearly discriminate between the contribution of hydrogen-bonding interactions and other protein contributions like solvent accessibility or dielectric effects, these biochemical studies have been completed by the development of synthetic models containing hydrogen-bonded thiolato ligands. They have confirmed the importance of hydrogen bonds in the aforementioned systems⁶ and have also provided new insight into the possible role of these interactions, like the protection of thiolato species from oxidation in superoxide dismutase related nickel complexes.⁷ More recently, hydrogen sulfide has been shown to be a major biological player, in particular through its interactions with hemoproteins.⁸ In these systems, hydrogen bonds are again essential for control of the affinity and redox activity of hydrogen sulfide. Indeed, the presence of a hydrogen-bond donor in the heme pocket stabilizes the bound hydrosulfide ligand HS[−] and the ferric center in truncated bacterial hemoglobins,⁹ while a hydrogen-bond acceptor destabilizes the ferric state in Hemoglobin I from the clam *Lucina pectinata*, probably by deprotonation of the heme-bound H₂S.¹⁰

This interplay between an iron center, hydrogen sulfide, and hydrogen-bonding interactions prompted us to synthesize and characterize the first hydrogen(sulfido)iron complex, in which the sulfur-based ligand is stabilized by a hydrogen bond. The synthesis of mononuclear (hydrogen)sulfido complexes is challenging because the metal–SH fragments have a high propensity to form multinuclear species,¹¹ in particular with iron.^{6c} This difficulty is highlighted by the small number of crystallographic structures of mononuclear (hydrogen)sulfido iron derivatives available in the literature.¹² It has to be noticed that all of these complexes are at the iron(II) state because of the strong reducing ability of hydrosulfide and that two of them were obtained with an indirect source of HS[−].^{12b,d} Our strategy was to use a hexadentate ligand, previously described by Banse et al., that contains an oxygen-bonded carboxamidato moiety.¹³ We anticipated that deprotonation of hydrogen sulfide by this basic fragment and subsequent coordination of the generated hydrosulfide anion would provide mild access to our targeted system (Scheme 1). As a support, in recent years, related

Scheme 1



approaches have been used to synthesize monomeric or dimeric iron(II) hydroxo complexes stabilized by intramolecular hydrogen bonds by deprotonation of water with deprotonated urea,¹⁴ a pendant tertiary amine group,¹⁵ or a deprotonated carboxamidato moiety.¹⁶

Complex [(L)Fe]·BPh₄ (1), in which in addition to five nitrogen donors the iron(II) center is coordinated to the oxygen of a carboxamidato group, reacts with hydrogen sulfide in dichloromethane or acetonitrile to give the new derivative 2.

Received: May 9, 2012

Published: September 7, 2012

As is evidenced by monitoring the reaction by UV–vis spectroscopy (Figure 1), excess hydrogen sulfide is required

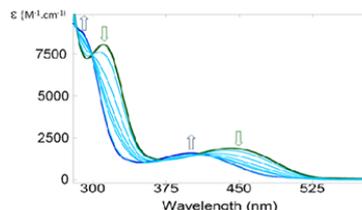


Figure 1. Evolution of the UV–visible spectrum of complex **1** (green, 0.07 mM in dichloromethane) upon the addition of 1, 2, 3, 4, 5, and 10 equiv of H₂S.

to ensure completeness of the reaction. The two absorptions corresponding to **1** are blue-shifted upon the addition of hydrogen sulfide, and the presence of four isosbestic points at 280, 297, 365, and 407 nm is indicative of a direct conversion of **1** to **2**. The electronic transition at lower energy ($\lambda = 402$ nm) is attributed to metal-to-ligand charge transfer by analogy with structurally related derivatives^{13,17} and is typical of high-spin systems ($\epsilon \approx 1500$ M⁻¹ cm⁻¹), which agrees with the effective magnetic moment in solution calculated by Evans method ($\mu_{\text{eff}} = 5.0 \mu_{\text{B}}$). Its significant blue shift compared to **2** is, however, less important than that observed on going from **1** to its protonated analogue [(LH)Fe]·2BPh₄ (**3**; $\lambda = 383$ nm), reflecting the relative strengths of the neutral carboxamidato, anionic hydrosulfido, and anionic carboxamido ligands. The second transition, at $\lambda = 287$ nm, is typical of a ligand-based π – π^* transition. It is located at the same wavelength as that in **3**,¹³ hinting that the carboxamidato moiety indeed acts as a base in this reaction. Further confirmation comes from the presence of a strong IR absorption at 1696 cm⁻¹ (see Figure S2 in the Supporting Information), corresponding to the protonated amide carbonyl, as well as the presence of an exchangeable proton in ¹H NMR at –69.2 ppm, attributed to the N–H moiety.¹⁸ However, no evidence for coordination of the hydrosulfido to the iron center is detected by these two spectroscopies.

The use of the intramolecular base is critical to cleanly preparing **2**: indeed, although the formation of **2** was detected during the reaction between complex **3** and 1 equiv of tetrabutylammonium hydrosulfide, it was always contaminated by a large amount of a black insoluble material (Figure S3 in the Supporting Information). To fully assess the structure of **2**, crystals were grown from a solution of **2** in dichloromethane layered with benzene. An ORTEP view of the structure of complex **2**, which cocrystallized with a solvent molecule, is presented in Figure 2.

The iron(II) center is in a pseudooctahedral environment, with the six positions being occupied by five nitrogen atoms from the amine/pyridine donor set and one sulfur atom from the (hydrogen)sulfido group. The coordination of HS⁻ and the release of the carboxamide function from the coordination sphere induce a rearrangement of the ligand backbone around the metallic center compared to the structure of **1**,¹³ with Fe–N_{pyridine} (average: 2.227 Å) and Fe–N_{amine} (average: 2.226 Å) bond distances typical of high-spin systems, in which they are expected to be close to 2.2 Å.^{17a} The Fe–SH distance (2.387 Å) compares well with those recently reported for (hydrogen)sulfido heme derivatives,^{12c} and protonation of the carbox-

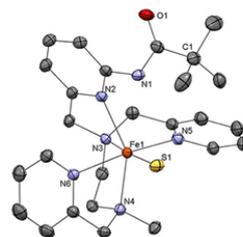


Figure 2. ORTEP view of complex **2** showing thermal ellipsoids at 50% probability and atom labeling. Hydrogen atoms, the CH₂Cl₂ molecule, and the BPh₄ anion are omitted for clarity. Selected bonds lengths (Å) and angles (deg) for **2**: Fe1–S1 2.387, Fe1–N_{py} (average) 2.227, Fe1–N_{amine} (average) 2.226, C1–N1 1.374, C1–O1 1.217; S1–Fe1–N3 173.73, N5–Fe1–N6 170.67, N4–Fe1–N2 144.78.

amidato moiety is clearly indicated by a shortening (1.217 vs 1.289 Å in **2** and **1**, respectively) of the C–O bond and an elongation of the C–N bond (1.374 vs 1.303 Å in **2** and **1**, respectively). The most interesting feature of the crystal structure is obviously the short N1–S1 bond (3.333 Å), which when correlated with the N–H...S angle (166.2°) clearly indicates a moderate hydrogen-bonding interaction¹⁹ between the sulfur atom and the amide proton. Although the structure of a ferrous hydrogen(sulfido) complex based on a porphyrin with carboxamide pickets has been described,^{12d} no hydrogen bonds were detected, with N–S bond lengths greater than 4.7 Å. In fact, there is so far in the literature only a single example of a hydrogen-bonded hydrogen(sulfido) metal complex, obtained fortuitously by the insertion of tolylthiocyanate into a S–H bond of the complex Cp*Ir(PMe₃)(SH)₂.²⁰

The equilibrium (1) presented in Scheme 1 implies that complex **2** should behave as a hydrogen sulfide donor. Only few inorganic complexes are known to release hydrogen sulfide,²¹ a feature that could be useful owing to the growing interest in biology for H₂S donors.²² Among these, ruthenium complexes^{21a,b,d} have been shown to reversibly coordinate H₂S or the dimeric rhodium complex [{Rh(μ-SH)(CO)(PR₃)₂}]₂ to slowly equilibrate to give H₂S and the trinuclear complex [Rh₃(μ-H)(μ₃-S)₂CO(PR₃)₃],²³ although both reactions must be carried out under anaerobic conditions. In this context, reversible protonation/deprotonation of the carboxamidato moiety between **1** and **2** could therefore provide a new strategy to release H₂S from a metallic center.

Indeed, solutions of analytically pure complex **2** in dichloromethane or acetonitrile are composed of a mixture of complexes **1** and **2** (35% and 65%, respectively, in a 5 mM solution in CD₃CN at 300 K) and hydrogen sulfide, under equilibrium.

Complex **2** is unreactive in solution toward dioxygen because its iron coordination sphere is saturated and the intramolecular hydrogen bond strongly reduces the electron density at the sulfur center. It is inert toward the addition of water up to 10 equiv in acetonitrile, with further addition leading to precipitation of the complex. Although the composition of the solution remains unchanged over 1 h, the slow evaporation of hydrogen sulfide gas progressively shifts the equilibrium (1) to the left, resulting in the almost complete back-conversion of **2** into **1** within 12 h, as shown in Figure 3.

On the other hand, if a hydrogen sulfide acceptor like the zinc complex TpZnOH²⁴ is added to a solution of **2**, **1** is instantaneously recovered, along with the formation of

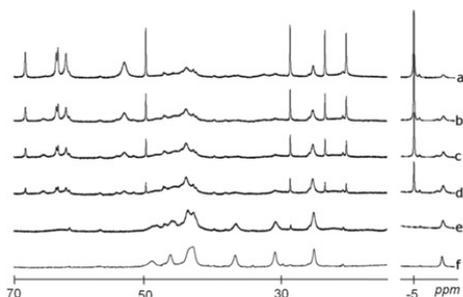


Figure 3. Zoom regions of the ^1H NMR spectra of complex **2** (5 mM in CD_3CN at 300 K) recorded at $t = 0$ (a) and then every 3 h (b–e) and the spectrum of **1** as a reference (f).

TpZnSH^{25} (Scheme 2 and Figure S4 in the Supporting Information).

Scheme 2



CONCLUSION

Starting from an iron(II) complex with an oxygen-bonded carboxamidato group, which can be used as a base toward an exogenous acid ligand, we synthesized a rare example of a hydrogen(sulfido) complex stabilized by an intramolecular hydrogen bond. The reversibility of the reaction makes this FeSH complex a slow hydrogen sulfide donor in solution.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Synthetic procedures and spectroscopic characterizations of complex **2** and crystallographic data for complex **2** in CIF format. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: erwan.galardon@parisdescartes.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the “Agence Nationale pour la Recherche” for funding through the “Programme JCJC CoordH₂S” to E.G.

REFERENCES

- (1) Desiraju, G. R.; Steiner, T. *The Weak Hydrogen Bond: In Structural Chemistry and Biology*; Oxford University Press: New York, 2001.
- (2) Pihko, P. M. *Hydrogen Bonding in Organic Synthesis*; Wiley-VCH: New York, 2009.
- (3) Lin, I. J.; Gebel, E. B.; Machonkin, T. E.; Westler, W. M.; Markley, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102* (41), 14581–14586.
- (4) Kolling, D. J.; Brunzelle, J. S.; Lhee, S.; Crofts, A. R.; Nair, S. K. *Structure* **2007**, *15* (1), 29–38.
- (5) Backes, G.; Mino, Y.; Loehr, T. M.; Meyer, T. E.; Cusanovich, M. A.; Sweeney, W. V.; Adman, E. T.; Sandersloehr, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (6), 2055–2064.
- (6) Beck, B. W.; Xie, Q.; Ichiye, T. *Biophys. J.* **2001**, *81* (2), 601–613.

- (7) He, C.; Hus, J. C.; Sun, L. J.; Zhou, P.; Norman, D. P. G.; Dotsch, V.; Wei, H.; Gross, J. D.; Lane, W. S.; Wagner, G.; Verdine, G. L. *Mol. Cell* **2005**, *20* (1), 117–129.

- (8) (a) Chiou, S. J.; Riordan, C. G.; Rheingold, A. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100* (7), 3695–3700. (b) Smith, J. N.; Shirin, Z.; Carrano, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (4), 868–869. (c) Morlok, M. M.; Janak, K. E.; Zhu, G.; Quarless, D. A.; Parkin, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (40), 14039–14050. (d) Ueyama, N.; Okamura, T. A.; Nakamura, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, *14*, 1019–1020. (e) Rao, P. V.; Holm, R. H. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (2), 527–559.

- (9) Gale, E. M.; Narendrapurapu, B. S.; Simonnet, A. C.; Schaefer, H. F.; Harrop, T. C. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (15), 7080–7096.

- (10) Kabil, O.; Banerjee, R. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (29), 21903–21907.

- (11) Nicoletti, F. P.; Comandini, A.; Bonamore, A.; Boechi, L.; Boubeta, F. M.; Feis, A.; Smulevich, G.; Boffi, A. *Biochemistry* **2010**, *49* (10), 2269–2278.

- (12) Pietri, R.; Lewis, A.; Leon, R. G.; Casabona, G.; Kiger, L.; Yeh, S. R.; Fernandez-Alberti, S.; Marden, M. C.; Cadilla, C. L.; Lopez-Garriga, J. *Biochemistry* **2009**, *48* (22), 4881–4894.

- (13) Kuwata, S.; Hidai, M. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *213*, 211–305.

- (14) (a) Divaira, M.; Midollini, S.; Sacconi, L. *Inorg. Chem.* **1977**, *16* (6), 1518–1524. (b) English, D. R.; Hendrickson, D. N.; Suslick, K. S.; Eigenbrot, C. W.; Scheidt, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (23), 7258–7259. (c) Arif, A. M.; Hefner, J. G.; Jones, R. A.; Koschmieder, S. U. *J. Coord. Chem.* **1991**, *23* (1–4), 13–19. (d) Dhifet, M.; Belkhiria, M. S.; Daran, J. C.; Nasri, H. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2009**, *65*, M967–U1355. (e) Pavlik, J. W.; Noll, B. C.; Oliver, A. G.; Schulz, C. E.; Scheidt, W. R. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (3), 1017–1026. (f) Jove, F. A.; Pariya, C.; Scoble, M.; Yap, G. P. A.; Theopold, K. H. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17* (4), 1310–1318.

- (15) Martinho, M.; Banse, F.; Sinton, J.; Philouze, C.; Guillot, R.; Blain, G.; Dorlet, P.; Lecomte, S.; Girerd, J. J. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (5), 1709–1717.

- (16) MacBeth, C. E.; Hammes, B. S.; Young, V. G., Jr.; Borovik, A. S. *Inorg. Chem.* **2001**, *40* (18), 4733–4741.

- (17) Kendall, A. J.; Zakharov, L. N.; Gilbertson, J. D. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (19), 8656–8658.

- (18) Ng, G. K. Y.; Ziller, J. W.; Borovik, A. S. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (17), 7922–7924.

- (19) (a) Mialane, P.; Nivorojkine, A.; Pratiel, G.; Azema, L.; Slany, M.; Godde, F.; Simaan, A.; Banse, F.; Kargar-Grisel, T.; Bouchoux, G.; Sinton, J.; Horner, O.; Guilhem, J.; Tchertanova, L.; Meunier, B.; Girerd, J. J. *Inorg. Chem.* **1999**, *38* (6), 1085–1092. (b) Ortega-Villar, N.; Ugalde-Saldivar, V. M.; Munoz, M. C.; Ortiz-Frade, L. A.; Alvarado-Rodriguez, J. G.; Real, J. A.; Moreno-Esparza, R. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (18), 7285–7293.

- (20) The attribution is based on the apparition of the same signal when H_2S is replaced by PhSH to give $[(\text{LH})\text{Fe}(\text{SPh})]\text{BPh}_4$ (Figure S5 in the Supporting Information). The exchange most certainly takes place through the equilibrium (1) by reaction of **1** with D_2S .

- (21) Steiner, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41* (1), 48–76.

- (22) Shaver, A.; El Moutassim, B.; Mortini, F.; Belanger-Gariepy, F.; Lough, A. *Organometallics* **2007**, *26* (17), 4229–4233.

- (23) (a) Sellman, D.; Lechner, P.; Knoch, F.; Moll, M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30* (5), 552–553. (b) Mudalige, D. C.; Ma, E. S.; Rettig, S. J.; James, B. R.; Cullen, W. R. *Inorg. Chem.* **1997**, *36* (24), 5426–5427. (c) Perez-Torrente, J. J.; Jimenez, M. V.; Hernandez-Gruel, M. A. E.; Fabra, M. J.; Lahoz, F. J.; Oro, L. A. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15* (45), 12212–12222. (d) Ma, E. S. F.; Rettig, S. J.; Patrick, B. O.; James, B. R. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (9), 5427–5434.

- (24) Caliendo, G.; Cirino, G.; Santagada, V.; Wallace, J. L. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (17), 6275–6286.

- (25) Alonso, P. J.; Benedi, O.; Fabra, M. J.; Lahoz, F. J.; Oro, L. A.; Perez-Torrente, J. J. *Inorg. Chem.* **2009**, *48* (16), 7984–7993.

- (26) Puerta, D. T.; Cohen, S. M. *Inorg. Chem.* **2002**, *41* (20), 5075–5082.

- (27) Rombach, M.; Vahrenkamp, H. *Inorg. Chem.* **2001**, *40* (24), 6144–6150.

Supporting Information

Synthesis of a Fe(II)-SH complex stabilized by intramolecular N-H...S H-Bond which acts as a H₂S donor.

Erwan Galardon,^{*a} Thomas Roger, Patrick Deschamps,^b Pascal Roussel,^c Alain Tomas,^b and Isabelle Artaud^a

Physical Measurements. ¹H NMR spectra were recorded at 300 K on a Bruker ARX-250 spectrometer and the chemical shifts are calibrated on the residual solvent peak.¹ UV-Visible spectra were recorded on a Jasco V600 spectrometer and ESI-MS on a Thermo spectrometer (20 μM solutions in CH₂Cl₂, voltage 4.5 kV). Elemental analyses were carried out by the microanalysis service at Gif-sur-Yvette CNRS. FT-IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer equipped with a MIRacle™ single reflection horizontal ATR unit (Zirconium-Selenium crystal). Effective magnetic moments were calculated using Evans method experiment² at 300 K using CD₂Cl₂ and a CD₂Cl₂/CH₂Cl₂ mixture as solvent.

Materials. Solvents were distilled using standard techniques and treated under argon prior to use when necessary. Chemicals were purchased from Aldrich or Thermo-Fischer and used as received. Complexes **1** and **3** were synthesized as described.³ Hydrogen sulfide solutions were prepared by bubbling the gas in dichloromethane for 1 minute. When necessary, it was titrated by reaction with the complex Tp^{Ph,Me}Zn(OH)⁴ followed by ¹H NMR, to typically give 0.2-0.3 M solutions.

Synthesis of complex 2: To a solution of complex **1** (45 mg, 55 μmol) in 2 mL of dichloromethane were added 200 μL of a solution of hydrogen sulfide in dichloromethane. After stirring for 5 minutes, the greenish yellow solution was transferred to cold diethylether, to yield a yellow powder (27 mg, 57%). For crystallization, 10 mg of this powder were

dissolved in 400 μL of dichloromethane to which were added 50 μL of the hydrogen sulfide solution, and layered with benzene. Yellow crystals were obtained, which were slowly decomposed upon drying under vacuum by loss of H_2S . ^1H NMR (δ , CD_2Cl_2): 142.8, 137.8, 109.1, 106.6, 67.9, 63.3, 61.4, 58.2, 49.3, 49.0, 30.6, 28.6, 24.0, 20.0, 17.7, 9.5, -4.6, -29.1, -69.2. MS (ESI +): 535 (15%, $[\text{2-BPh}_4]^+$), 501 (100%, $[\text{1-BPh}_4]^+$). UV-Vis (CH_2Cl_2): $\lambda(\epsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$: 287 (8100), 402 (1450). Anal. Calc. (found) for $\text{C}_{50}\text{H}_{55}\text{BFeN}_6\text{OS}\cdot 1.5\text{CH}_2\text{Cl}_2$: C, 62.98 (63.14); H, 5.95 (6.00); N 8.56 (8.68).

Reactivity of complex 2 with $\text{Tp}^{\text{Ph,Me}}\text{ZnOH}$: In a NMR tube were introduced 4.3 mg of complex 2 in 500 μL of CD_3CN (10 mM solution). A first spectrum was recorded, then 1 equiv. of solid $\text{Tp}^{\text{Ph,Me}}\text{ZnOH}$ (2.8 mg) added before recording a second spectra. Full conversion of the starting complexes was observed, and the new products identified as 1 and $\text{Tp}^{\text{Ph,Me}}\text{ZnSH}$, on the basis of the chemical shifts obtained from an authentic sample.

Conversion of complex 2 into complex 1: A sample of analytically pure 2 (2.2 mg) was dissolved in 500 μL of CD_3CN , and spectra recorded every three hours. The starting composition of the mixture was determined by integration of the tBu peaks of 2 and 1.

Reaction of complex 3 with NBu_4SH : In an NMR tube were introduced 4.3 mg of complex in 500 μL of CD_3CN (10 mM solution), to give a clear yellow solution. Addition of 1equiv of NBu_4SH (as a 0.1M solution in CD_3CN) resulted in the precipitation of a black solid, and the presence of a mixture of starting ligand and complex 2 was detected by NMR.

Crystallographic studies. Data (see Table below) were collected with a Bruker SMART APEX CCD diffractometer (Mo- $\text{K}\alpha$ radiation graphite-monochromated radiation, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) controlled by APEX2 software package.⁵ Data integration and global cell refinement were performed with the program SAINT.⁶ Data were corrected for absorption by the multiscan semiempirical method implemented in SADABS.⁷ The structure was solved by direct methods using SHELXS 97.⁸ Refinement, based on F^2 , was carried out by full matrix

least squares with SHELXL-97 software.⁹ Non hydrogen atoms were refined anisotropic thermal parameters. The hydrogen atoms were placed in their geometrically generated positions and allowed to ride on their parent atoms with an isotropic thermal parameter 20 % higher to that of the atom of attachment. For complex **2**, the hydrogen atom attached to S1 was deduced from a difference Fourier map and refined with isotropic temperature factor. In the final cycles of refinement, the peak pattern of electron density suggested that part of solvent was highly disordered; attempts to model this disorder were unsuccessful. In the final cycles of refinement, the contribution to electron density corresponding to the disordered solvent was removed from the observed data using the SQUEEZE option in PLATON.¹⁰ The resulting data vastly improved the precision of the geometric parameters for the remaining structure.

Table 1 - Crystal data and structure refinements for complexes **2**.

2	
Formula	C ₅₁ H ₅₇ BCl ₂ FeN ₆ OS
Fw	939.66
T(K)	100 K
wavelength (Å)	0.71073
crystal system	triclinic
space group	P-1
a (Å)	11.5670(3)
b (Å)	13.1673(3)
c (Å)	17.9310(4)
α (°)	91.589(1)
β (°)	104.031(1)
γ (°)	109.794(1)
V (Å ³)	2474.87(10)
Z	2
d(calc) (Mg/m ³)	1.261
abs coeff (mm ⁻¹)	0.498

crystal size (mm ³)	0.35x0.15x0.10
crystal color	yellow
θ range [deg]	1.18-30.49
index ranges	-16<h<16 -18<k<18 -24<l<22
no. of reflns collected	55702
no. of indep reflns	13260
R(int)	0.0288
GOF on F^2	1.106
R1/wR2 ^{a,b} , [I>2 σ (I)]	0.0362/0.0913
R1/wR2 ^{a,b} , all data	0.0449/0.949
largest diff peak and hole [e. \AA^{-3}]	0.648 and -0.584

^aR1 = $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$. ^b wR2 = $\{ \sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2] \}$; where $w = 1/(\sigma^2(F_o^2) + (qp)^2 + bp)$. GOF = $S = \{ \sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / (n - p) \}^{1/2}$.

- (1) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (21), 7512-7515.
- (2) Sur, S. K., *Journal of Magnetic Resonance* **1989**, *82* (1), 169-173.
- (3) Martinho, M.; Banse, F.; Sainton, J.; Philouze, C.; Guillot, R.; Blain, G.; Dorlet, P.; Lecomte, S.; Girerd, J. J., *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (5), 1709-1717.
- (4) Ruf, M.; Vahrenkamp, H., *Inorg. Chem.* **1996**, *35* (22), 6571-6578.
- (5) *APEX2. Data Collection Software*, Bruker AXS Inc.: Madison, Wisconsin, USA, 2007.
- (6) Bruker *SAINT*, Bruker AXS Inc: Madison, Wisconsin, USA, 2007.
- (7) *SADABS.2008/1*, Bruker AXS Inc.: Madison, Wisconsin, USA, 2007.
- (8) Sheldrick, G. M. *SHELXS-97, Program for crystal structure solution*, University of Gottingen, Germany, 1997.
- (9) Sheldrick, G. M. *SHELXR-97, Program for crystal structure refinement*, University of Gottingen, Germany, 1997.
- (10) Spek, A. L., *J. Appl. Crystallogr.*, **2003** 362, 7-13.

Figure S1. ^1H NMR spectra recorded at 250 MHz in CD_2Cl_2 of complex **1** (10 mM) before (trace A) and after (trace B) addition of hydrogen sulfide. Trace C corresponds to the spectrum recorded after addition of D_2O .

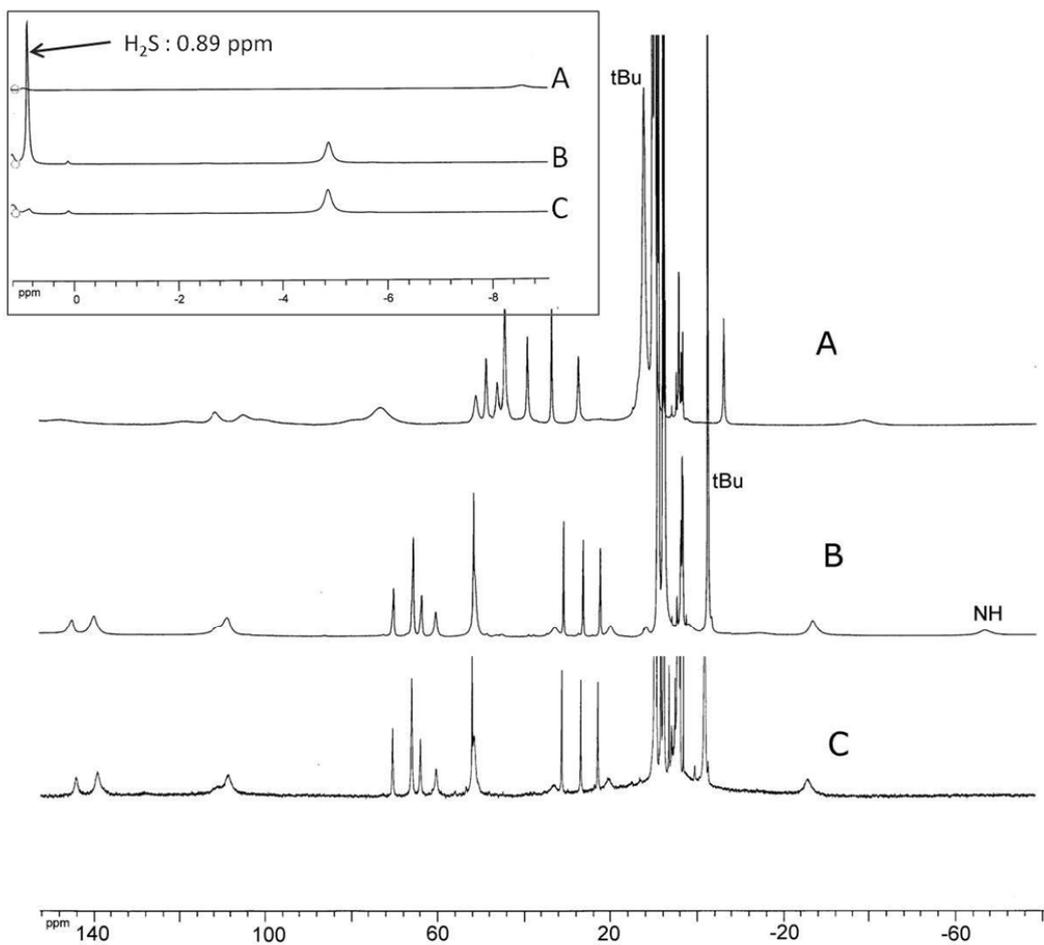


Figure S2. FT-IR spectra of complex **2** recorded neat (a) or in solution in CH₃CN (b).

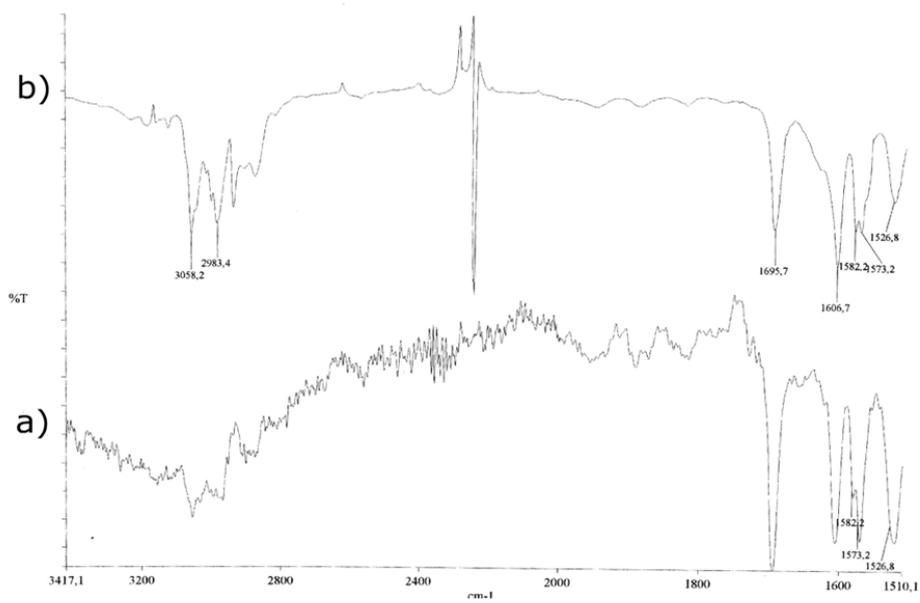


Figure S3. ^1H NMR spectra recorded at 250 MHz in CD_3CN of complex **3** (10 mM) before (trace A) and after (trace B and C) addition of 1 (B) and 2 (C) equivalents of NBu_4SH .

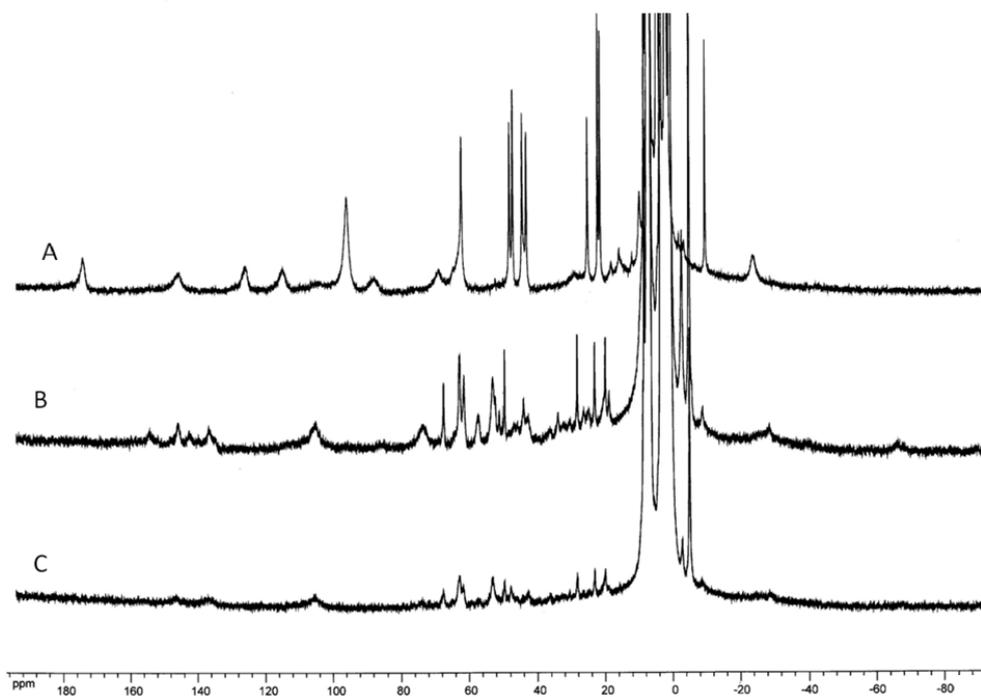


Figure S4. Diamagnetic zone of the ^1H NMR spectra recorded at 250 MHz in CD_3CN of complex **2** (10 mM) before (trace A) and after (trace B) addition of 1 equivalent of $\text{Tp}^{\text{Ph,Me}}\text{Zn}(\text{OH})$, with relevant proton labeling.

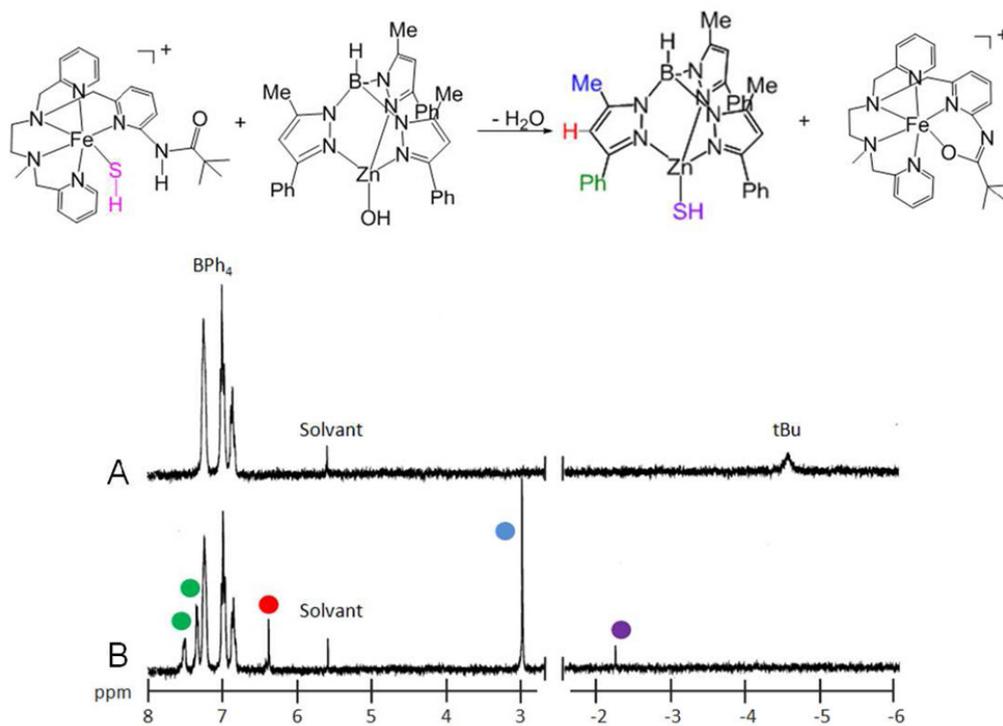
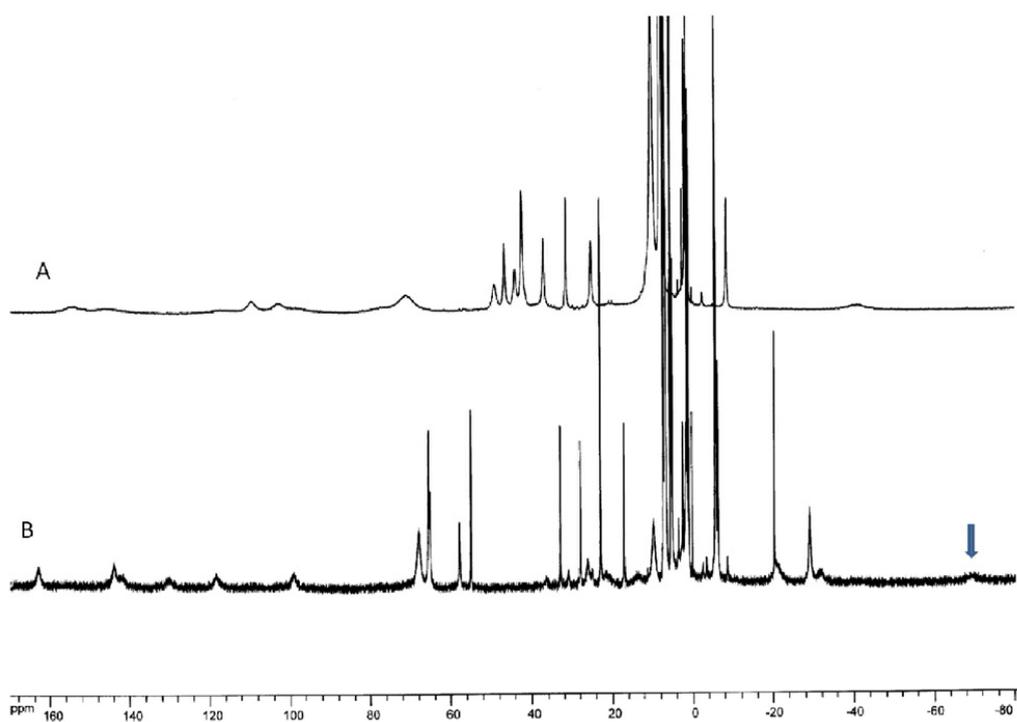


Figure S5. ^1H NMR spectra recorded at 250 MHz in CD_2Cl_2 of complex 1 (5 mM) before (trace A) and after (trace B) addition of thiophenol. The arrow shows the peak corresponding to the N-H proton.

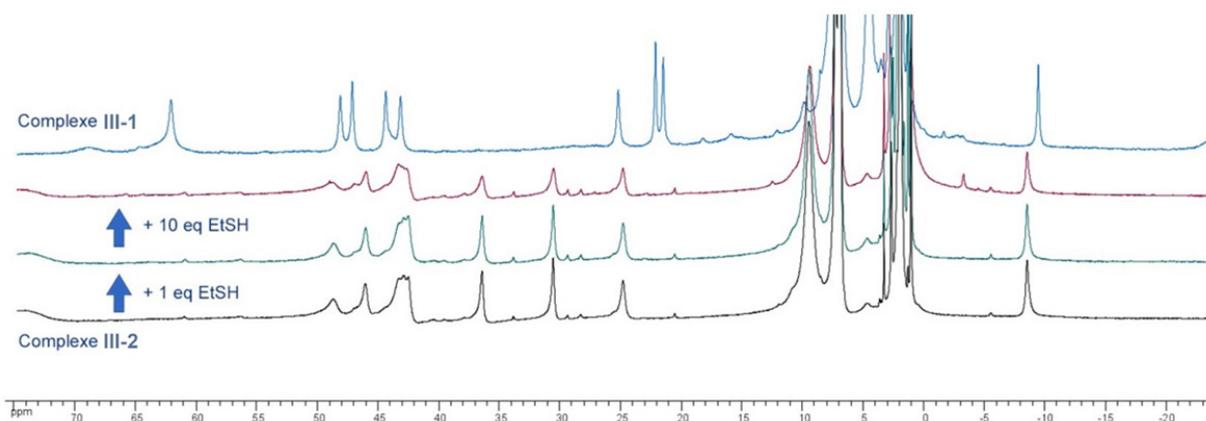


III Réactivité du complexe **III-2** avec les thiols

Après cette étude avec le sulfure d'hydrogène, nous avons entrepris d'étudier la réactivité de **III-2** avec deux autres thiols : le thiophénol, de pKa 6.5, et l'éthanethiol de pKa 10.6. En effet, l'étape clef de la formation du complexe [Fe(SH)] étant la déprotonation d'H₂S par le ligand amidato, celle-ci doit être sensible au pKa du composé soufré utilisé.

1. AVEC L'ETHANETHIOL

L'ajout d'un équivalent d'éthanethiol au complexe amidato en solution ne conduit à aucune réaction. L'ajout de 10 équivalents supplémentaires ne modifie pas non plus le spectre et on retrouve le complexe de départ inchangé, même après une nuit (Spectre C1).



Spectre C1 : Suivi RMN ¹H de la réaction du complexe amidato **III-2** avec 1 puis 10 eq EtSH dans CD₃CN

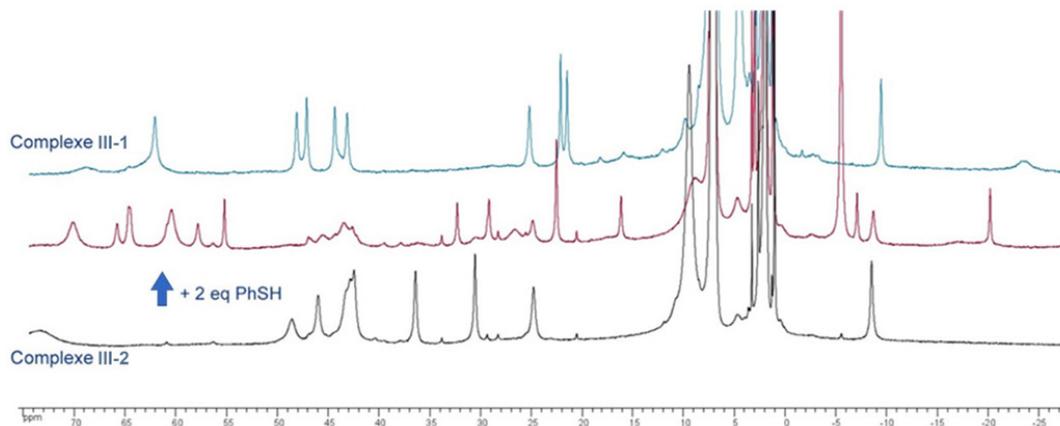
2. AVEC LE THIOPHENOL

Le thiophénol présente quant à lui un pKa très proche de celui d'H₂S, ce qui laisse supposer une réactivité similaire pour ces deux espèces.

2.1. RMN

En effet, l'ajout de deux équivalents de thiophénol conduit à la formation d'un nouveau composé **III-3** en RMN ¹H, différent du complexe amide **III-1** (Spectre C2). Le fort blindage des

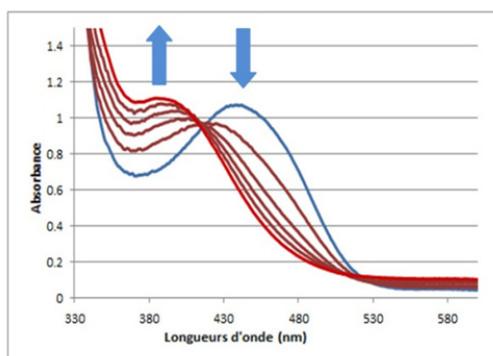
protons du groupement tBu, déjà observé dans la réaction entre **III-2** et H₂S, est en accord avec une protonation du ligand.



Spectre C2 : Suivi RMN ¹H de la réaction du complexe amidato **III-2** avec 2 eq PhSH dans CD₃CN

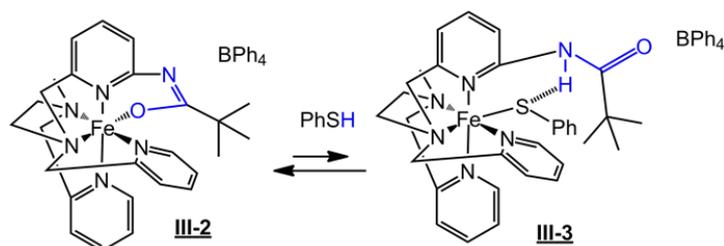
2.2. UV-VISIBLE

Nous pouvons toujours observer en spectrométrie UV-visible le déplacement vers l'UV de la bande MLCT analogue à celui observé pour le complexe [Fe(SH)], confirmant la protonation du ligand (Spectre C3). Nous avons cependant dû nous restreindre à la seule étude de cette bande, étant donné que la bande d'absorption du thiophénol couvre la bande π-π* du ligand.



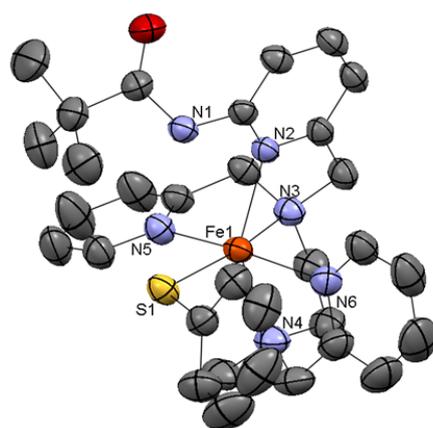
Spectre C3 : Suivi UV-visible de la titration du complexe **III-2** (560 μM dans CH₂Cl₂) par une solution de PhSH (0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 eq)

2.3. STRUCTURE RX



*Schéma C8 : Réaction entre le complexe **III-2** et PhSH*

La nature du complexe formé lors de la réaction entre **III-2** et PhSH (Schéma C8) a finalement été confirmée après l'obtention d'une structure par diffraction aux rayons X (Figure C1). Celle-ci présente les mêmes caractéristiques que celle du complexe [Fe(SH)] (**III-4**) décrite dans la publication, à savoir un complexe de Fe(II) mononucléaire dans un environnement octaédrique. Une liaison hydrogène entre l'atome de soufre du thiophénol et l'amide est présente, bien que celle-ci soit moins forte que dans le complexe **III-4** ($N-S_{\text{thiophénol}} = 3.409 \text{ \AA}$, contre 3.333 pour $N-S_{\text{H}}$). Cette élongation de la liaison hydrogène peut être attribuée à une plus faible densité électronique présentée par l'atome de soufre, ou à la présence additionnelle d'une interaction de type π -stacking présente dans la structure entre le cycle aromatique du thiophénol et le système π d'une pyridine du ligand (distance des centroïdes : 3.704 \AA).



*Figure C1 : Représentation ORTEP de la structure cristallographique du complexe **III-3***
Distances (Å) : Fe(1) S(1) : 2.373, Fe(1)-N_{py}(moyenne) : 2.241, Fe(1)-N_{amine}(moyenne) : 2.238

IV Conclusion du chapitre III : Synthèse d'un complexe Fe-SH comportant une liaison hydrogène

La stratégie utilisée dans ce chapitre nous a ouvert l'accès au premier complexe [Fe(SH)] comportant une liaison hydrogène impliquant le ligand hydrosulfure. Cette réaction peut être étendue à certains thiols, à condition qu'ils soient suffisamment acides pour être déprotonés par la fonction amidato (Schéma C9).

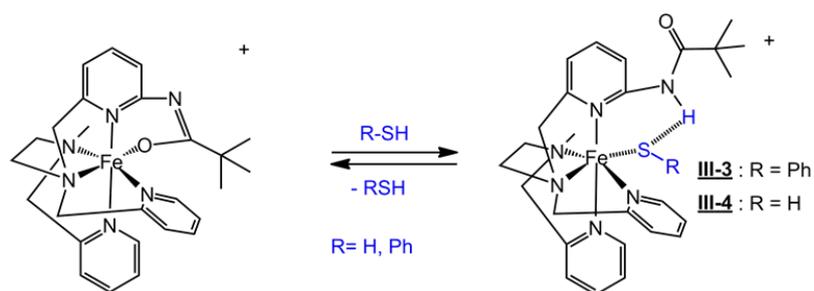


Schéma C9 : Réactivité du complexe **III-2** avec le sulfure d'hydrogène ou le thiophénol

La propriété de donneur lent du complexe **III-4** ouvre aussi de nouveaux horizons dans ce domaine récent où il n'existe actuellement que des molécules organiques. Notre complexe n'est malheureusement pas utilisable en tant que tel du fait de son insolubilité en milieu aqueux, et il s'agit là de la première étape à franchir en vue d'obtenir des outils moléculaires utilisables pour les études biologiques.

CHAPITRE IV : DONNEURS LENTS D'H₂S

Dans ce dernier chapitre, nous allons nous intéresser à des molécules capables de libérer lentement du sulfure d'hydrogène, afin de mimer la biosynthèse continue d'H₂S dans les systèmes biologiques et d'éviter les inconvénients des sels NaSH ou Na₂S. A l'origine de ce projet, nous souhaitions utiliser des complexes inorganiques, un exemple ayant été décrit dans le chapitre précédent. En effet, des composés de coordination sont déjà utilisés pour les études biologiques impliquant les deux autres gasotransmetteurs NO et CO (Schéma D1).^[165]

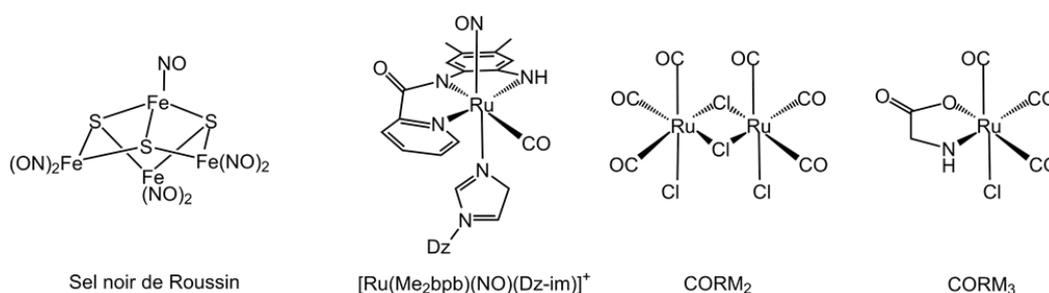


Schéma D1 : Exemples de donneurs de NO (à gauche) et de CO (à droite) basés sur la chimie de coordination^[165]

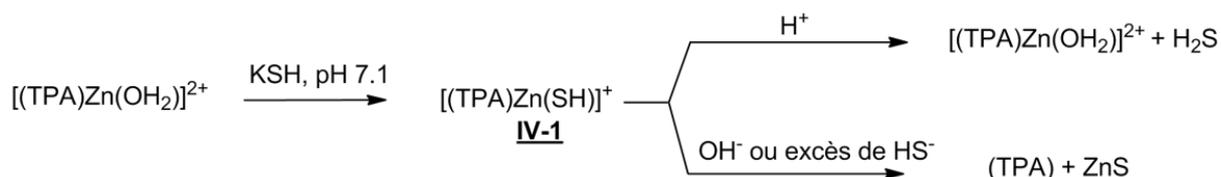
Cependant, nous nous sommes aussi penchés sur des donneurs organiques, pour notamment répondre à l'attente de collaborateurs biologistes peu enclins à tester des composés de coordination.

La stratégie visée dans les deux cas est identique : utiliser la forte concentration de thiol présente dans les cellules ou le plasma (sous forme respectivement de glutathion ou de cystéine) comme « déclencheur » de la libération d'H₂S, par une réaction de substitution de ligand dans le cas des complexes de coordination, ou de réduction dans le cas des molécules organiques.

I Donneurs à zinc

Cette première famille de donneurs s'appuie sur des travaux réalisés par le groupe.^[166] Comme nous l'avons vu dans le chapitre III, la chimie de coordination du sulfure d'hydrogène est très largement organométallique et menée dans des solvants organiques, ce qui est peu

compatible avec des molécules dont la finalité est d'être utilisée par des biologistes. Une première étude a été menée au laboratoire afin d'évaluer les conditions de stabilité de complexes comportant un ligand HS⁻ lié à un centre métallique en milieu aqueux. Ce travail, faisant intervenir le complexe précurseur [(TPA)Zn(OH₂)]²⁺ est résumé dans le Schéma D2. Ainsi, le complexe [(TPA)Zn(SH)]⁺ **IV-1** est stable dans une fenêtre de pH d'environ 5-8, et donc à pH physiologique.



*Schéma D2 : Synthèse et devenir du complexe **IV-1***

Aux concentrations utilisées en RMN (5 mM), aucune libération de H₂S du centre à zinc n'est détectée. En particulier, aucune formation du complexe [(TPA*)Zn(SH)]⁺ (avec TPA* = 1-(6-methylpyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridin-2-ylmethyl)methanamine) n'est détectée lors de l'addition du composé [(TPA*)Zn(OH₂)]²⁺ à une solution de [(TPA)Zn(SH)]⁺ dans du tampon HEPES (Schéma D3).

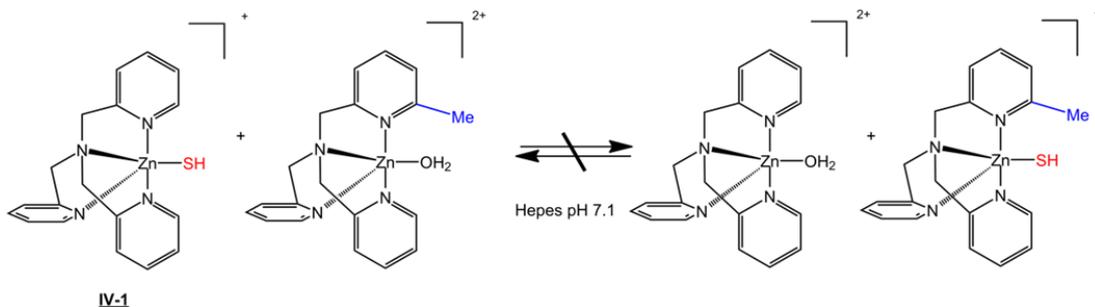
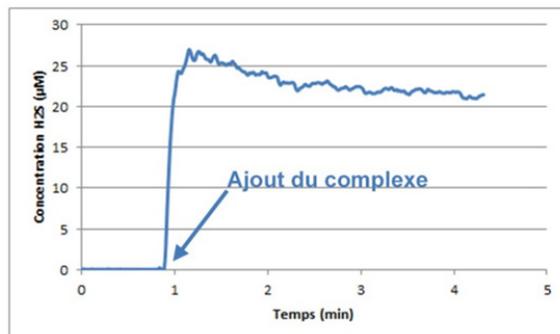


Schéma D3 : Étude de la formation du complexe [(TPA)Zn(SH)]⁺ dans l'HEPES pH 7.1*

Cependant, à de plus faibles concentrations (50 μM), le complexe **IV-1** se comporte comme un donneur rapide d'H₂S dans les tampons HEPES ou Tris, comme indiqué sur le Spectre D1. En effet, on peut observer une forte augmentation du signal enregistré à

l'électrode sélective à H₂S dès l'introduction du complexe, augmentation qui atteint un maximum en une vingtaine de secondes (27 μM, soit 54% de libération).



Spectre D1 : Libération d'H₂S par le complexe **IV-1** à 50 μM dans l'HEPES 50 mM pH 7.1

En vue d'obtenir un donneur moins rapide, nous avons cherché à utiliser la même stratégie que pour notre complexe de fer présenté dans le chapitre précédent et stabiliser la liaison Zn—SH par une liaison hydrogène. C'est d'ailleurs ainsi que le groupe de *Mareque-Rivas* avait réussi à augmenter l'affinité des phosphates pour des complexes de zinc similaires en 2004.^[167] Nous avons donc, dans un premier temps, étudié la complexation de H₂S sur les complexes [(TPA(NH₂))Zn(OH₂)]²⁺ **IV-2** et [(TPA(NH₂)₂)Zn(OH₂)]²⁺ **IV-3** formés *in situ* par complexation du ligand avec du nitrate de zinc Zn(NO₃)₂ dans le tampon HEPES (Schéma D4).

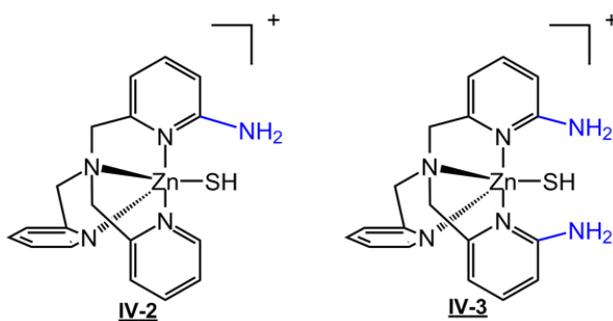
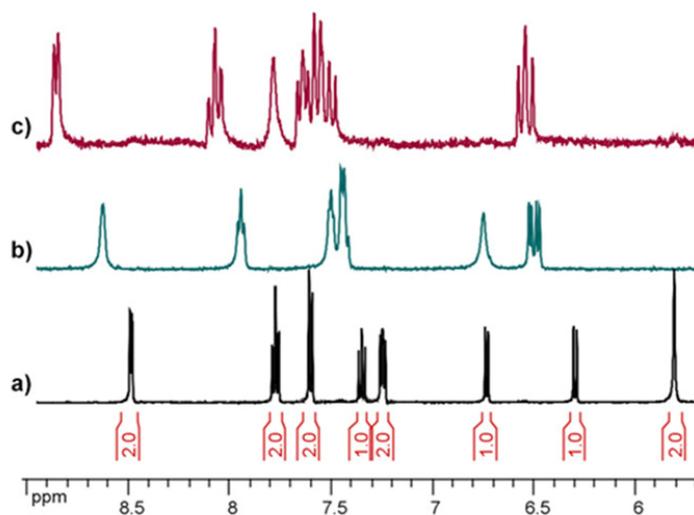


Schéma D4 : Dérivés aminés du complexe **IV-1** ciblés en vue de stabiliser le ligand hydrosulfure par liaison hydrogène

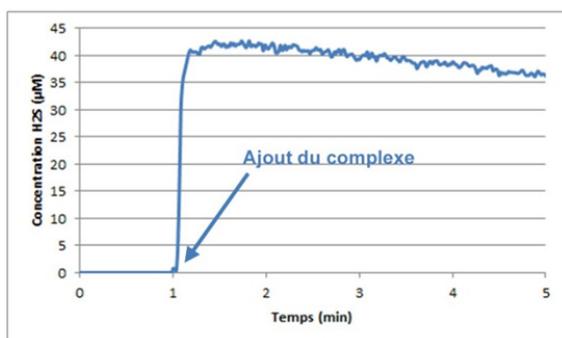
Au final, seul le dérivé **IV-2** a pu être préparé *in situ*, étant donné que nous avons observé la précipitation d'un composé blanc lors de la titration du complexe **IV-3** par HS⁻ simultanément à la libération du ligand libre en solution. Au contraire, les spectres RMN ¹H

avec le ligand ne comportant qu'un groupement 6-amino (Spectre D2) indiquent bien qu'une nouvelle espèce est formée lors de l'addition d'un équivalent de NaSH.



Spectre D2 : (a) Partie aromatique du spectre du ligand monoaminé, (b) du complexe correspondant après addition d'1 eq Zn(NO₃)₂(OH₂)₆ et (c) 1 eq NaSH

La libération de sulfure d'hydrogène par cette nouvelle entité est suivie par ampérométrie (Spectre D3) dans des conditions analogues à celles utilisées pour le complexe **IV-1**. Ainsi, le complexe [(TPA)(NH₂)Zn(SH)]⁺ **IV-2** libère instantanément 42 μM d'H₂S, soit 84% de libération (contre 54% pour le complexe **IV-1**).



Spectre D3 : Libération d'H₂S par le complexe **IV-2** (50 μM dans l'HEPES 50 mM pH 7.1)

L'introduction de groupements ortho-NH₂ sur les pyridines du ligand TPA a plusieurs conséquences sur ses propriétés coordinantes dans l'eau^[168] : l'affinité pour le cation Zn(II) diminue (logK_{ZnL} passe de 11.1 à 10.4 puis à 8.9 lorsque l'on ajoute un puis deux groupements amino), ainsi que le pKa de la molécule d'eau coordonnée au zinc (8.1, 7.6 puis 6.7 respectivement pour [(TPA)Zn(OH₂)]²⁺, [(TPA(NH₂))Zn(OH₂)]²⁺, et [(TPA(NH₂)₂)Zn(OH₂)]²⁺). Ce dernier résultat a été expliqué par l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'oxygène coordonné au zinc et les groupements NH₂ des ligands. La même explication a été utilisée pour expliquer la meilleure affinité des complexes pour les phosphates lorsque le nombre de donneurs de liaison-H augmente.^[167] Parallèlement, dans des structures cristallographiques de complexes analogues comportant un ligand chlorure, une élongation de la liaison Zn—Cl et des liaisons Zn—N_{py} associée à un raccourcissement de la liaison Zn—N_{ax} est notée lorsque le nombre de groupements ortho-NH₂ des pyridines augmente, malgré la présence évidente de liaisons hydrogènes.^[169] Ainsi, la décooordination du ligand (TPA(NH₂)₂ observée lors de l'addition de H₂S dans le tampon est probablement liée à sa faible affinité pour le Zn(II). Une baisse du pKa de la molécule d'H₂S coordonnée aurait le même effet en favorisant la formation de sulfure de zinc ZnS, mais impliquerait l'établissement de liaisons hydrogènes NH₂...S. Ceci paraît peu vraisemblable à la vue de la libération plus rapide d'H₂S enregistrée avec le dérivé [(TPA(NH₂))Zn(SH)]⁺ par rapport à [(TPA)Zn(SH)]⁺. En effet, dans **IV-2**, même si des interactions NH₂...S pourraient certainement être détectées dans un solvant apolaire ou dans une structure cristallographique, elles seront probablement trop faibles dans un solvant polaire protique pour contrebalancer la gêne stérique plus importante du ligand dérivé du TPA.

II Donneurs de type dithiopéroxyanhydride

La réticence de nos collaborateurs biologistes vis-à-vis de complexes de coordination, ainsi que les résultats peu encourageants décrits ci-dessus nous ont amenés à développer une nouvelle famille de donneurs organiques. Les dithiopéroxyanhydrides R(CO)S-S(CO)R' sont des composés peu étudiés dans la littérature, dont les quelques réactions connues laissent envisager un rôle potentiel de donneur d'H₂S dans des systèmes biologiques (Schéma D5).

En effet, les composés intermédiaires formés (mais non isolés) en particulier lors des réactions avec des thiols, amines ou phosphates en milieu réducteurs, devraient être susceptibles de libérer du sulfure d'hydrogène.

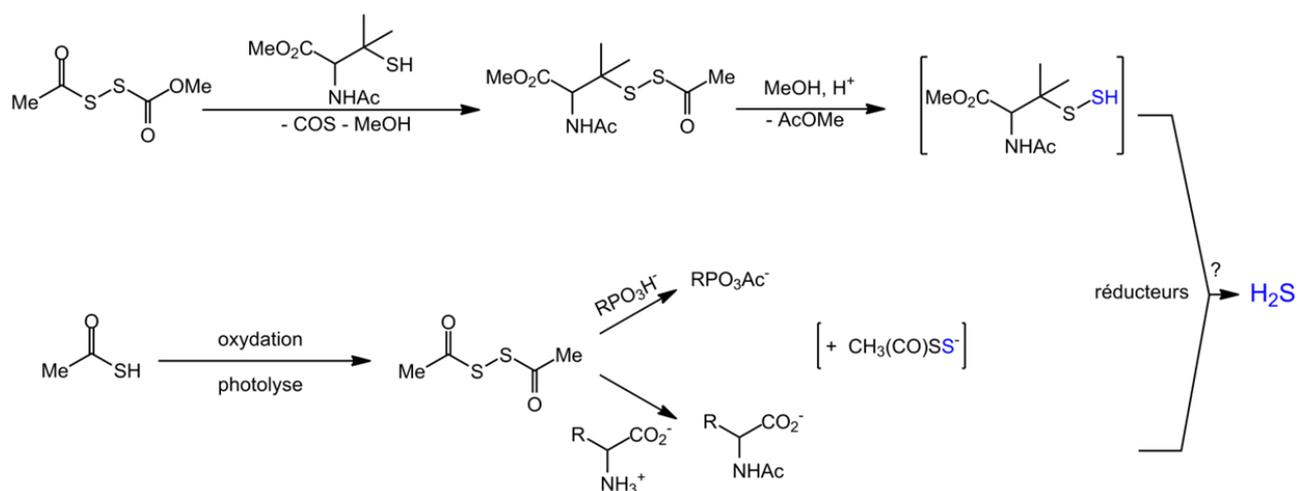


Schéma D5 : Réactions décrites de dithiopéroxyanhydrides avec la pénicillamine, des acides aminés ou des phosphates^[170]

Ce travail s'est fait en collaboration avec des biologistes de l'Institut Cochin pour la partie concernant les cellules sur-exprimant la SQR, ainsi qu'avec l'Institut de Recherche Servier pour les études ex-vivo de la fonction vasculaire. Il a été récemment publié dans ChemBioChem.^[171]

1. PUBLICATION

DOI: 10.1002/cbic.201300552

New Biologically Active Hydrogen Sulfide Donors

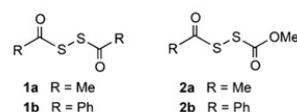
Thomas Roger,^[a] Françoise Raynaud,^[a] Frédéric Bouillaud,^[b] Céline Ransy,^[b] Serge Simonet,^[c] Christine Crespo,^[c] Marie-Pierre Bourguignon,^[c] Nicole Villeneuve,^[c] Jean-Paul Vilaine,^[c] Isabelle Artaud,^[a] and Erwan Galardon^{*[a]}

The crucial role played by hydrogen sulfide (H₂S) in biology^[1] has stimulated the development of new molecular tools to help biologists characterise and define the signalling effects of this gas. Thus, in the last two years, numerous probes have been synthesised to detect hydrogen sulfide within cells.^[2] They complete the polarographic sensor (now commercially available), which only allows quantification of hydrogen sulfide in fluids.^[3] During this time, hydrogen sulfide donors have also been synthesised to replace the widely used salts NaHS or Na₂S, which are instantaneous H₂S donors, and consequently do not reproduce the effects of continuous biosynthesis.^[4] The use of these fast donors, especially in the high micromolar range (too often considered "physiological") might indeed lead to responses that are not necessarily connected to the sulfide itself but to the hypoxic conditions created by the transient rise of H₂S.^[5] Aside from the naturally occurring slow donors like diallyl sulfides in garlic,^[6] the most common molecules used so far as tools for fundamental research or tested for potential therapeutic benefits are based on the dithiolethione structure or derived from Lawesson's reagent,^[7] although questions remain concerning the latter.^[7c] We anticipated that dithioperoxyanhydrides (often labelled diaryl or diacyl disulfide) might also be able to play this role. These species have been proposed as intermediates in the oxidation acylation of amines,^[8] and possibly of phosphates,^[9] with thioacetic acid (two reactions related to prebiotic synthetic pathways). They are also known to act as thioacetyl transfer agents with alkylphosphite,^[10] *N*- and *O*-protected penicillamine,^[11] carbon-centred radicals^[12] and iron(II) complexes.^[13] Interestingly, in both cases, hydrogen sulfide could theoretically be generated under reducing conditions, either through the intermediate formation of dithioperoxy acid RCO SSH from amines^[8a,9] or of trisulfides from thiols,^[11] thus making the amino acid cysteine a potential activator. Xian and co-workers successfully used a similar strat-

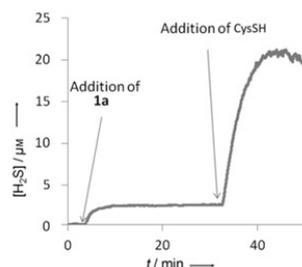
egy to generate hydrogen sulfide in plasma from the related *N*-(benzoylthio)benzamides, in which a S–N bond is found in place of the disulfide bond, but these donors are limited to poorly soluble aromatic molecules, and no biological activity was reported.^[14] They have also been used more recently in a related approach to design donors in which a cysteine is protected by an *S*-acyl moiety.^[15]

Herein, we show that dithioperoxyanhydrides allow more chemical diversity, with easily accessible alkyl as well as aryl derivatives, and that they not only release hydrogen sulfide in aqueous buffer, but also induce a response in cells in suspension and advantageously replace hydrogen sulfide in *ex vivo* assays of vascular function.

The donors (Scheme 1) were synthesised by oxidation of the corresponding thiocarboxylate with iodine^[16] (**1a** and **1b**) or by reaction between thiocarboxylic acid and methoxycarbonylsulfonyl chloride (**2a** and **2b**).^[11]

Scheme 1. H₂S donors used in this work.

The H₂S-releasing properties of molecules **1** and **2** were studied in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) solution containing 0.1% THF with the polarographic sensor ISO-H₂S-2 (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Although the donors alone did not significantly generate hydrogen sulfide (**1a** showed a slight increase in the current when added to the phosphate buffer), they were, however, activated by addition of a thiol (Figure 1).

Figure 1. H₂S release monitored by the ISO-H₂S-2 sensor with **1a** (50 μM) and CysSH (5 mM).

[a] T. Roger, Dr. F. Raynaud, Dr. I. Artaud, Dr. E. Galardon
UMR 8601, LCBPT, CNRS-Université Paris Descartes
PRES Sorbonne Paris Cité
45 rue des Sts Pères, 75006 Paris (France)
E-mail: erwan.galardon@parisdescartes.fr

[b] Dr. F. Bouillaud, C. Ransy
Institut Cochin, Inserm-U1016, CNRS UMR 8104
Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité
24 rue du Faubourg St. Jacques, 75014 Paris (France)

[c] Dr. S. Simonet, C. Crespo, Dr. M.-P. Bourguignon, Dr. N. Villeneuve,
Dr. J.-P. Vilaine
Institut de Recherches SERVIER, Unité de Cardiovasculaire
11 rue des Moulineaux 92150 Suresnes (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under
<http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201300552>.

Interestingly, both cysteine (CysSH) and glutathione (GSH) proved to be effective (see Figure S1 in Supporting Information). This is important, because GSH is ubiquitous in cells, thus removing the need to add extra cysteine in order to generate H_2S in low free-cysteine environments.^[14] Moreover, its concentration in the millimolar range and its tight regulation should avoid redox deregulation upon addition of physiological concentration of the donors to biological systems.

We used the parameters previously described by Xian^[14] to characterise their donors with the ISO- H_2S -2 sensor (peaking time and H_2S concentration at peaking time) to compare our molecules (Table 1). Both symmetric and disymmetric donors

Thiol	Concentration [μM]				Peaking time [min]			
	1a	1b	2a	2b	1a	1b	2a	2b
GSH	26	17	26	20	16	15	20	20
CysSH	34	17	24	19	12	11	10	12

(1b, 2a and 2b) yielded a maximum concentration of $\sim 20 \mu M$ (upon addition of 100 equiv of thiol to 50 μM donor), whereas 1a gave a slightly higher concentration (up to 34 μM with cysteine). Peaking times were consistently higher (by ~ 5 min) with GSH, relative to CysSH. The acyl-based donors 1a and 2a were clearly more stable in solution than aromatic 1b and 2b, as determined by H_2S generation upon addition of cysteine after incubating donors 1 or 2 in phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) for 60 min. Under these conditions, no changes in the H_2S -release profiles were observed for 1a and 2a, whereas the maximum concentrations for 1b and 2b decreased by 70 and 30%, respectively. For 1a in DPBS containing 10% DMSO, $t_{1/2}$ was found to be approximately 12 h (Figure S3), with acetate detected by 1H NMR as the single degradation product; poor solubility of the aromatic molecules hampered determination of their $t_{1/2}$ values.

To test the potential of our donors under biological conditions, we first studied their ability to generate hydrogen sulfide in cellular lysate. The release of H_2S by 1a in HeLa cell lysate was monitored by using the selective fluorescent probe DNS-Az^[18] and not by the polarographic sensor, as this was slowly deteriorated by the HNTG (HEPES/NaCl/Triton-X/glycerol) lysis buffer of the reaction mixture. Figure 2 clearly shows that 1a was able to generate H_2S in this complex biological medium. Indeed, strong DNS-Az fluorescence was detected for 1a and cellular lysate incubated in phosphate buffer; only basal fluorescence was recorded for 1a or lysate alone. However, the poor linearity of the calibration curves obtained from solutions of NaHS mixed with the lysate did not permit precise quantification of the hydrogen sulfide released.

The efficiency of 1a in biological systems is further highlighted by its ability to release hydrogen sulfide in nutrient medium containing CHO cells over-expressing human sulfide

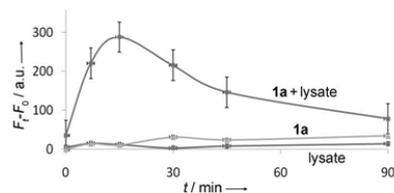


Figure 2. Fluorescence intensities ($F_t - F_0$, $\lambda_{em} = 520$ nm) recorded after mixing aliquots of the reaction between the donor 1a (20 μM) and HeLa cell lysate in DPBS for different reaction times with DNS-Az^[18] in DPBS/THF (1:1, blue curve). See the Supporting Information for the full experimental procedure.

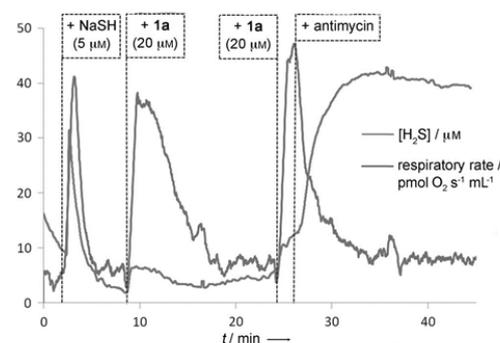


Figure 3. H_2S concentration (blue line) and respiratory rate (red line) recorded after addition of a solution of NaHS, 1a, then 1a followed by antimycin (1 $\mu g mL^{-1}$) to CHO cells overexpressing SQR (10^6 cells mL^{-1} , 2 mL) in Ham's F12 medium at 37 °C.

quinone reductase (SQR),^[19] as shown in Figure 3. SQRs are ubiquitous membrane-bound flavoproteins involved in sulfide detoxification.^[20] In mammals, they oxidise H_2S to thiosulfate or sulfate by using dioxygen, thus providing electrons to the respiratory chain by reduction of coenzyme Q.^[5a,21]

Addition of a solution of NaHS to cells in Ham's F12 medium led to an immediate increase in H_2S concentration, correlated to dioxygen uptake. In parallel, only minor H_2S production was detected after addition of 1a, although sustained dioxygen consumption was observed. Addition of 1a followed by antimycin (an inhibitor of complex III of the respiratory chain) when the dioxygen uptake was maximum led to a fast decrease in dioxygen consumption and detection of hydrogen sulfide (maximum concentration 8 μM , peaking time 5 min), thus indicating that 1a efficiently releases H_2S , which is quickly oxidised by the respiratory chain. Interestingly, generation of H_2S was clearly initiated by the cells, whereas 1a alone in the culture medium only generated traces of hydrogen sulfide ($< 1 \mu M$ after 30 min) under the same experimental conditions.

Finally, 1a was also able to induce total vasorelaxation of isolated rat aortic rings pre-contracted with phenylephrine (Figure S8). In rings with intact endothelium, administration of

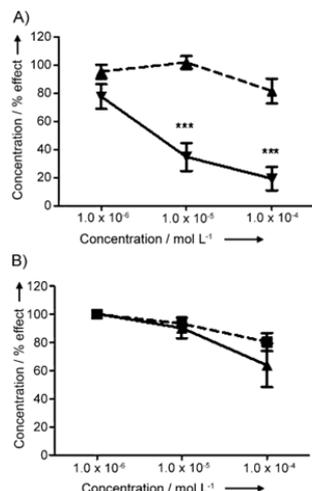


Figure 4. Compound **1a** (1–100 μM) induces relaxation in isolated aortic rings with intact endothelium (A), but not in those lacking endothelium (B). Aortic rings were contracted with phenylephrine. Data are mean \pm SEM; $n = 4$ –6 rats. A) \blacktriangle : solvent ($n = 6$), ∇ : **1a** ($n = 4$); B) \blacksquare : solvent ($n = 6$), \blacktriangle : **1a** ($n = 4$); *** $P < 0.001$, two way ANOVA.

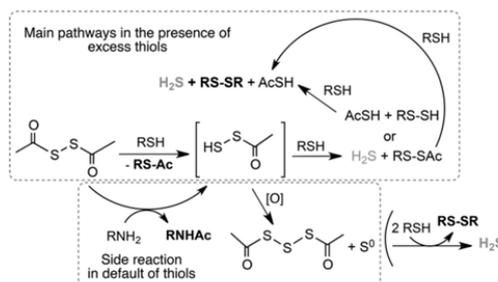
1a (1, 10 and 100 μM) produced concentration-dependent relaxation (EC_{50} 5.2 μM , $n = 4$; Figure 4). This EC_{50} value is at least an order of magnitude lower than those recorded under identical conditions for Xian's donor PhCONH-SCOPH^[14] or for GYY4137 (Figure S9). Interestingly, it was also lower than the EC_{50} values reported for H_2S ,^[22] and confirmed by us.

H_2S vasoactivity is strongly dependent on dioxygen concentration,^[23] because of the loss of sulfide by oxidation and the vasoconstrictor effect of these oxidised species. The usually high molecular oxygen (95% O_2 , 900 μM) used for isolated rat aortic ring assays might therefore explain the discrepancy between the EC_{50} of **1a** and those reported for H_2S . Indeed, a more physiologically relevant EC_{50} of 15 μM was proposed for hydrogen sulfide when a lower O_2 concentration was used (40 μM).^[23] This nicely fits the value found for **1a**, thus making this dithioperoxyanhydride a very advantageous, more stable source of H_2S for these studies.

Interestingly, the relaxation induced by **1a** is strongly endothelium dependent as no effect was observed for rings without endothelium (Figure 4). Such results are in a perfect agreement with previous studies that showed endothelium-dependant effects for GYY4137 and NaHS.^[22b] A complete study of the mechanisms underlying this vasorelaxant response is ongoing in our group.

The concentration of hydrogen sulfide released from **1** and **2** suggests a similar mechanism with the four donors. Although the reaction of *N*- and *O*-protected penicillamine with **2a** in methanol was reported to give the unsymmetrical disulfide resulting from the cleavage of the disulfide bonds of **2a** as major product,^[11] we observed no evidence for this reaction

under our experimental conditions. For instance, when equimolar quantities of GSH and **1a** were reacted in phosphate buffer containing THF (2–16%, see the Supporting Information), the main product detected by ^1H NMR or ESI-MS was the thioester GS-Ac, which resulted from nucleophilic attack of the thiol on the acyl carbonyl group (Figures S4 and S5). This reactivity is in accordance with the mechanism reported by Xian for the activation of its donors.^[15] In addition, products in which the terminal amino moiety was *N*-acylated were also detected; these were not observed in previous studies because *N*-protected cysteine was used as the thiol.^[15] These by-products were undetected when two or more equivalents of GSH were reacted with **1a**; but, in these cases the disulfide GS-SG was present in the reaction mixture (Figures S4 and S6). Indeed, as already reported, **1a** acts as an efficient acyl transfer agent towards amino acids like lysine or methionine (Figure S7),^[8a] but not to phosphate buffer.^[9] Although **1a** reacted with the amino groups of amino acids, this reaction did not generate H_2S . However, incubation of excess thiol with a mixture of **1a** and 100 equiv of amino acid for 30 min led to H_2S production, in concentrations similar to those recorded without incubation. The exact nature of the acetyl-moiety-containing intermediate formed upon reaction of the dithioperoxyanhydride **1a** with glutathione, lysine or methionine (Figure S7) remains speculative: all attempts to isolate and characterise this compound failed. A tentative rationalisation of the results involves formation of the intermediate acylpersulfide $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{SSH}$, which can directly lead to H_2S in the presence of excess thiols, or oxidation to the corresponding trisulfide (Scheme 2) in the absence of additional thiol, by analogy with



Scheme 2. Speculative mechanism for the release of H_2S from **1a**. Compounds in bold were clearly identified.

the reactivity of persulfides.^[23] The chemistry of acylpersulfides is so far largely unexplored, although they have been proposed (and detected) as intermediates in reactions involving thioacids.^[9,24]

Finally, it must be noted that although these reactions can cause side-effects, such as acetylation of lysines,^[25] no toxicity of **1a**, up to at least 200 μM , was observed on human fibroblasts (Figure S10).

In summary, dithioperoxyanhydrides are a new class of hydrogen sulfide donor: stable and easy to synthesise. Their ef-

fectiveness to induce biological responses in cellulo or ex vivo at physiological concentrations provides a basis for the development of new molecular tools to study the pathophysiological effects of this gaseous transmitter. They constitute a promising complement to very slow-releasing molecules, like GYY4137 and dithiolethione-based donors, which are better suited to in vivo studies.

Acknowledgements

We thank the ANR for funding through the program JCJC-2010. We are also grateful to Dr. Patrick Dansette, Jean-Luc Boucher and Dominique Padovani for useful discussions, and to Assia Hessani for HPLC-MS studies.

Keywords: biological activity • dithioperoxyanhydrides • hydrogen sulfide • oxidoreductases • SQR • vasorelaxation

- [1] a) Special Issue *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *17*, 1–185; b) T. Finkel, *Sci. Signaling* **2012**, *5*, pe10; c) B. D. Paul, S. H. Snyder, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 499–507; d) R. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8801–8802.
- [2] a) W. Xuan, C. Sheng, Y. Cao, W. He, W. Wang, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2328–2330; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2282–2284; b) J. Chan, S. C. Dodani, C. J. Chang, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973–984.
- [3] J. E. Doeller, T. S. Isbell, G. Benavides, J. Koenitzer, H. Patel, R. P. Patel, J. R. Lancaster, Jr., V. M. Darley-Usmar, D. W. Kraus, *Anal. Biochem.* **2005**, *347*, 40–51.
- [4] V. Vitvitsky, O. Kabil, R. Banerjee, *Antioxid. Redox Signaling* **2012**, *17*, 22–31.
- [5] a) F. Bouillaud, F. Blachier, *Antioxid. Redox Signaling* **2011**, *15*, 379–391; b) K. R. Olson, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2013**, *51*, 623–632; c) S. Mimoun, M. Andriamihaja, C. Chaumontet, C. Atanasiu, R. Benamouzig, J. M. Blouin, D. Tomé, F. Bouillaud, F. Blachier, *Antioxid. Redox Signaling* **2012**, *17*, 1–10.
- [6] G. A. Benavides, G. L. Squadrito, R. W. Mills, H. D. Patel, T. S. Isbell, R. P. Patel, V. M. Darley-Usmar, J. E. Doeller, D. W. Kraus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17977–17982.
- [7] a) G. Callendo, G. Cirino, V. Santagada, J. L. Wallace, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6275–6286; b) K. R. Olson, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2011**, *301*, R297–312; c) K. Kashfi, K. R. Olson, *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 689–703; d) K. Kashfi, *Antioxid. Redox Signaling* **2013**; DOI: 10.1089/ars.2013.5308.
- [8] a) R. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1997**, *389*, 52–54; b) W. T. Wu, Z. Zhang, L. S. Liebeskind, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14256–14259.
- [9] W. J. Hagan, Jr., *ChemBioChem* **2010**, *11*, 383–387.
- [10] P. C. J. Kamer, H. C. P. F. Roelen, H. van den Elst, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6757–6760.
- [11] N. E. Heimer, L. Field, R. A. Neal, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1374–1377.
- [12] A. C. Friedli, P. Kaszynski, J. Michl, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 455–458.
- [13] L. Deng, A. Majumdar, W. Lo, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 11118–11126.
- [14] Y. Zhao, H. Wang, M. Xian, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15–17.
- [15] Y. Zhao, S. Bhushan, C. Yang, H. Otsuka, J. D. Stein, A. Pacheco, B. Peng, N. O. Devarie-Baez, H. C. Aguilar, D. J. Lefer, M. Xian, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1283–1290.
- [16] R. L. Frank, J. R. Blegen, *Org. Synth.* **1948**, *28*, 16–19.
- [17] C. Appenzeller-Herzog, *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 847–855.
- [18] H. Peng, Y. Cheng, C. Dai, A. L. King, B. L. Predmore, D. J. Lefer, B. Wang, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9846–9849; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9672–9675.
- [19] E. Lagoutte, S. Mimoun, M. Andriamihaja, C. Chaumontet, F. Blachier, F. Bouillaud, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2010**, *1797*, 1500–1511.
- [20] a) M. Marcia, U. Ermiler, G. Peng, H. Michel, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2010**, *78*, 1073–1083; b) M. R. Jackson, S. L. Melideo, M. S. Jorns, *Biochemistry* **2012**, *51*, 6804–6815.
- [21] M. R. Jackson, S. L. Melideo, M. S. Jorns, *Biochemistry* **2012**, *51*, 6804–6815.
- [22] a) W. Zhao, R. Wang, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *283*, H474–H480; b) L. Li, M. Whiteman, Y. Y. Guan, K. L. Neo, Y. Cheng, S. W. Lee, Y. Zhao, R. Baskar, C.-H. Tan, P. K. Moore, *Circulation* **2008**, *117*, 2351–2360; c) Y. Sun, C.-s. Tang, H.-f. Jin, J.-b. Du, *Acta Pharmacol. Sin.* **2011**, *32*, 456–464.
- [23] J. R. Koenitzer, T. S. Isbell, H. D. Patel, G. A. Benavides, D. A. Dickinson, R. P. Patel, V. M. Darley-Usmar, J. R. Lancaster, Jr., J. E. Doeller, D. W. Kraus, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292*, H1953–1960.
- [24] J. Robert, M. Anouti, J. Paris, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, 473–478.
- [25] a) S. Zhao, W. Xu, W. Jiang, W. Yu, Y. Lin, T. Zhang, J. Yao, L. Zhou, Y. Zeng, H. Li, Y. Li, J. Shi, W. An, S. M. Hancock, F. He, L. Qin, J. Chin, P. Yang, X. Chen, Q. Lei, Y. Xiong, K.-L. Guan, *Science* **2010**, *327*, 1000–1004; b) A. Lundby, K. Lage, B. T. Weinert, D. B. Bekker-Jensen, A. Secher, T. Skovgaard, C. D. Kelstrup, A. Dmytriiev, C. Choudhary, C. Lundby, J. V. Olsen, *Cell Rep.* **2012**, *2*, 419–431.

Received: August 26, 2013
Published online on ■■■■■ 0000

2. ÉTUDES MECANISTIQUES

Le schéma réactionnel proposé dans la publication provient d'études que nous allons résumer ci-dessous. Ces études ont été menées par RMN ^1H et HPLC-MS avec le composé **MeCOS** $\text{Me}(\text{CO})\text{SS}(\text{CO})\text{Me}$ (notre donneur le plus efficace) et le glutathion comme activateur.

- i) La réaction entre le **MeCOS** et le glutathion conduit à un mélange de plusieurs produits. Ceux-ci dépendent du nombre d'équivalents de GSH utilisé pour la réaction (Schéma D6 et Spectre D4) mais on notera que la présence de GS-Ac est détectée comme produit majoritaire dans les deux réactions.

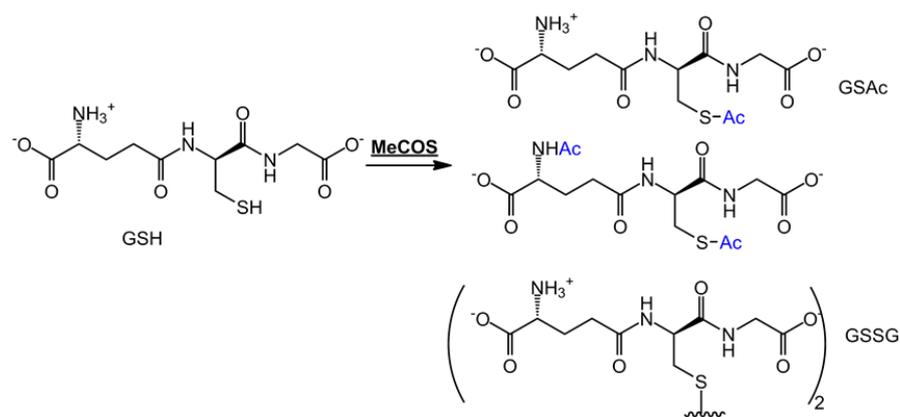
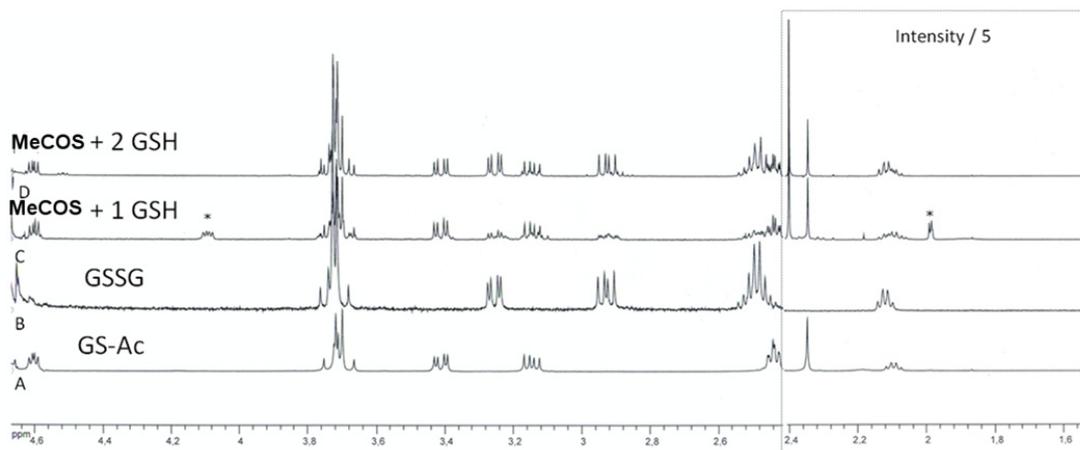


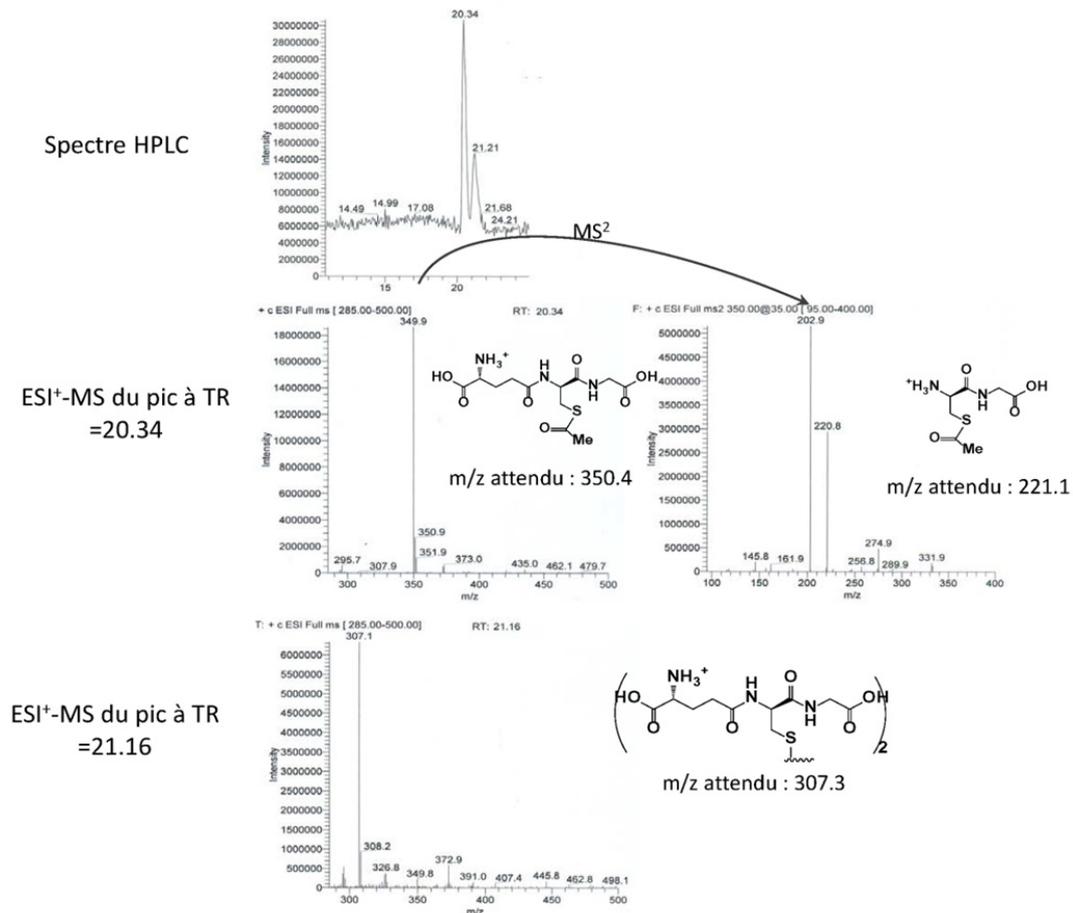
Schéma D6 : Structures de produits obtenus après réaction entre le **MeCOS** et 1 ou 2 eq GSH



Spectre D4 : Analyse RMN ^1H des bruts obtenus après réaction d'une solution de **MeCOS** avec le GSH (D) 2 eq ou (C) (1 eq) ainsi que les produits de référence (A) GS-Ac et (B) GSSG.

Les pics marqués « * » correspondent au glutathion N-acétylé.

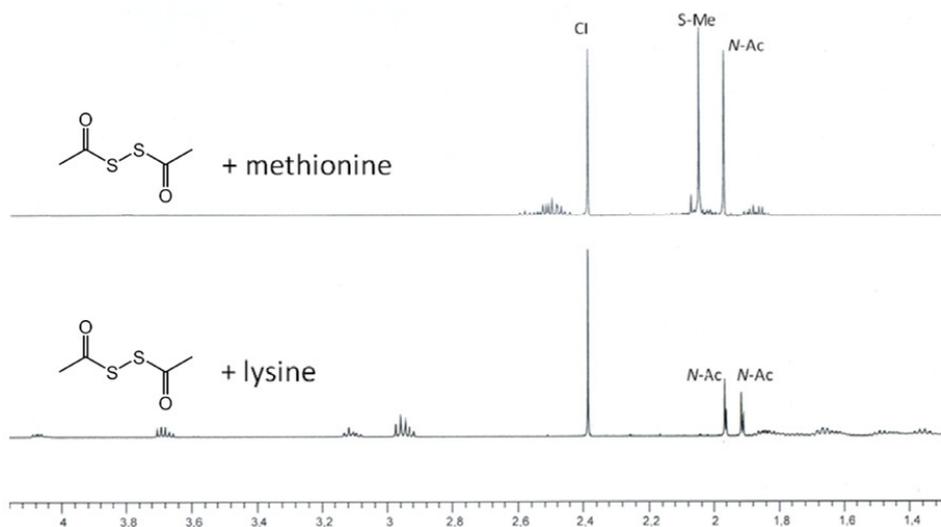
L'acétylation majoritaire du glutathion sur le soufre du thiol et non sur l'azote de l'amine a été confirmée par l'étude HPLC-MS, qui indique clairement sur le spectre MS² la présence du fragment Cys(SAc)-Gly (Spectre D5).



*Spectre D5 : Analyse HPLC-MS de la réaction du **MeCOS** avec 2 eq GSH*

- ii) L'amine libre du glutathion peut cependant réagir avec le **MeCOS**, bien que cette réaction ne se produise pas en présence d'un excès de thiol. Ceci confirme que le **MeCOS** est un réactif efficace pour acétyler les acides aminés,^[170a] comme l'indique le Spectre D6 qui présente les spectres RMN ¹H obtenus après réaction avec la méthionine ou la lysine. Ces derniers font clairement apparaître une

acylation de la fonction aminée, la structure des produits formés ayant été confirmée par spectrométrie de masse.



Spectre D6 : Spectres RMN issus de la réaction du **MeCOS** avec la méthionine ou la lysine (tampon phosphate deutéré, pH 7.4)

- iii) Si la première étape de l'activation du **MeCOS** est identifiée (Schéma D7), le devenir de l'intermédiaire $\text{Me}(\text{CO})\text{S-SH}$ qui doit être libéré durant cette réaction reste quant à lui à définir.

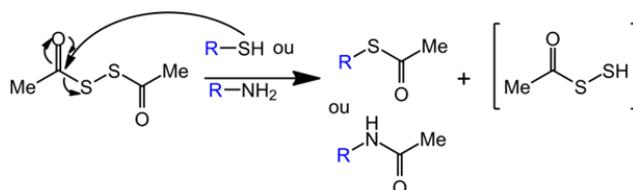


Schéma D7 : Première étape de l'activation du **MeCOS** par les thiols ou les amines

Les spectres RMN ^1H présentés ci-dessus laissent envisager un intermédiaire commun à toutes les réactions (Cl), qui présente un seul singulet en RMN ^1H à 2.37 ppm. L'hypothèse que ce dérivé soit le trisulfure $\text{Me}(\text{CO})\text{S-S-S}(\text{CO})\text{Me}$ reste

à démontrer, nos efforts pour synthétiser ce produit étant pour le moment restés vains. Mais cette proposition semble cependant la plus vraisemblable compte tenu :

- i) Du fait que ce signal ne corresponde à aucun des composés suivants : $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, CH_3COSH , $\text{CH}_3(\text{CO})\text{S}(\text{CO})\text{CH}_3$, et qu'il ne paraît pas envisageable que l'acylpersulfure CH_3COSSH soit stable en solution,
- ii) De la chimie des persulfures RSSH , qui conduisent en présence d'oxygène et en milieu polaire essentiellement au trisulfure correspondant, avec formation de soufre élémentaire (Schéma D8).

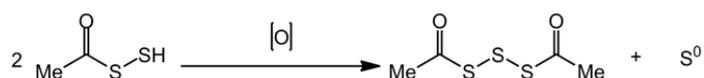


Schéma D8 : Formation du trisulfure à partir du persulfure correspondant en présence d'oxygène

III Conclusion du chapitre IV : Donneurs lents d' H_2S

L'utilisation des dérivés du zinc comme donneurs d' H_2S s'est avérée décevante, en raison d'une cinétique d'échange trop rapide du ligand SH^- lorsque les complexes sont dilués dans une solution tampon à des concentrations physiologiquement acceptables pour un donneur.

Par contre, les composés organiques dithiopéroxyanhydriques se sont eux révélés des donneurs très intéressants, puisqu'ils sont non seulement capables de libérer du sulfure d'hydrogène dans des solutions tampons, mais aussi dans des cellules et des tissus. En particulier, ils sont d'excellents substituts aux sels d' H_2S pour les études *ex-vivo* de la fonction vasculaire, avec les meilleures CE_{50} pour la relaxation d'aortes de rat pré-contractées actuellement rapportées dans la littérature.

I Conclusion générale

A travers ce manuscrit, nous avons pu voir le rôle ambivalent du sulfure d'hydrogène, à la fois fortement toxique, voire mortel à une concentration supérieure à 500 ppm, et nécessaire à la vie en tant que transmetteur gazeux, aux côtés des monoxydes d'azote et de carbone. C'est ce rôle biologique, et les implications qui en découlent pour les chimistes s'intéressant à l'interface chimie-biologie, que nous avons cherché à présenter dans le premier chapitre. Les trois chapitres suivants décrivent le travail de recherche effectué dans ce contexte : nous nous sommes attachés à développer des molécules susceptibles d'aider à la compréhension des actions biologiques d' H_2S , et à synthétiser de nouveaux complexes de coordination impliquant un ligand hydrosulfure HS^- .

La première étape de ce travail a été de synthétiser des sondes fluorescentes sélectives d' H_2S , pour permettre de détecter et de quantifier H_2S *in vivo*. Nous avons choisi un principe de réactivité nouveau basé sur la chimie de coordination, avec un métal inerte vis-à-vis de l'échange de ligand afin de favoriser la réaction sur le ligand lui-même, plutôt que sur le centre métallique utilisé ici comme quencheur de la fluorescence.

Nous avons synthétisé deux familles de sondes : une basée sur le ruthénium(II) et une sur le cobalt(III) (Schéma E1). Celles-ci sont, en accord avec nos objectifs initiaux, i) solubles dans un tampon aqueux avec un ajout minimal (1% maximum) de solvant organique ii) des sondes « turn-on » c'est-à-dire que la fluorescence augmente en présence de H_2S . Cette augmentation de la fluorescence induite par H_2S est importante, puisque des rapports (fluorescence en présence de H_2S / fluorescence initiale) de plus de 30 ont été enregistrés avec la sonde basée sur le cobalt(III). Ces rapports sont compétitifs avec ceux rapportés dans la littérature. Malheureusement, nos molécules ne sont pas (ou peu) sélectives pour d'autres molécules soufrées présentes dans les systèmes biologiques, et en particulier les thiols. Ce manque de sélectivité provient soit d'une réactivité similaire d' H_2S de la cystéine (sondes

basées sur le ruthénium), soit d'une réactivité différente mais inattendue d'H₂S (sonde basée sur le cobalt(III)). A la vue des énormes progrès réalisés dans ce domaine des sondes fluorescentes pour H₂S ces deux dernières années, la sélectivité obtenue dans ce travail n'est évidemment pas suffisante.

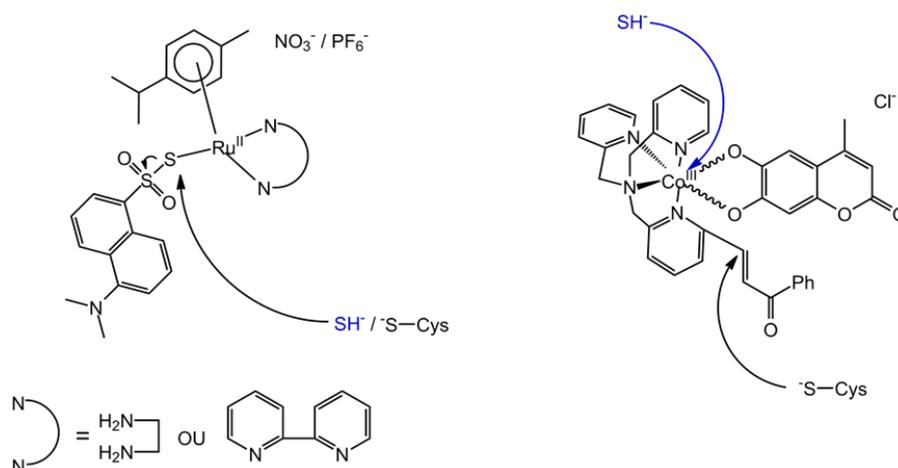


Schéma E1 : Sondes fluorescentes développées et mécanismes mis en jeu en présence de H₂S ou CysSH

Une seconde partie du travail a été consacrée à la synthèse de molécules libérant du sulfure d'hydrogène de manière lente et contrôlée par une activation endogène. Si des donneurs inorganiques à base de zinc ont donc été synthétisés, ils se comportent comme des donneurs rapides d'H₂S en milieu tamponné (Schéma E2).

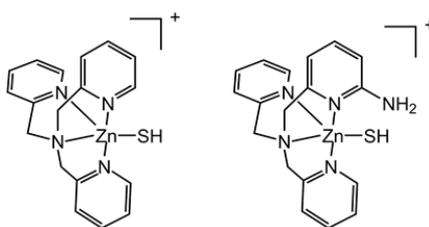
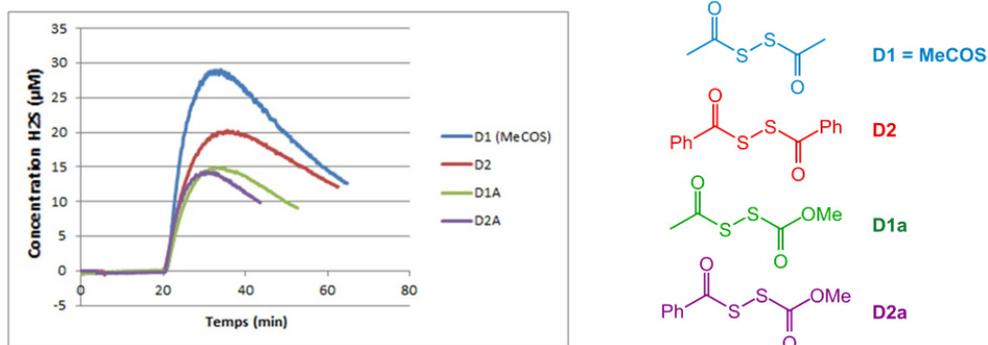


Schéma E2 : Structures des donneurs d'H₂S basés sur le zinc

Par contre, les donneurs organiques de type dithioperoxyanhydride se sont eux révélés prometteurs. Ils sont stables en milieu tamponné jusqu'à l'ajout d'un thiol activateur comme la cystéine dans le milieu (Spectre E1). La libération d'H₂S a été observée pour le donneur (CH₃COS)₂, notre donneur le plus efficace, en milieu tamponné et en présence de lysat cellulaire.

Des réponses biologiques ont été enregistrées dans des cellules en suspension (consommation d'oxygène liée à une augmentation de la dégradation mitochondriale d'H₂S) ou dans des tissus (relaxation d'anneaux d'aorte de rat pré-contractées). Nos donneurs sont ainsi plus efficaces que les autres donneurs de la littérature, y compris les sels dérivés d'H₂S pour cette étude de la fonction vasculaire *ex-vivo*.



Spectre E1 : Libération d'H₂S par les donneurs de type dithioperoxyanhydride à 40 µM dans le tampon phosphate 20 mM pH 7.4

Enfin, nous nous sommes aussi attachés à la synthèse du premier complexe du fer possédant un ligand hydrosulfure accepteur de liaison hydrogène. Le point clef de cette synthèse est d'utiliser H₂S et non le sel HS⁻ comme source d'hydrosulfure, ce qui est possible grâce au choix du ligand coordonnant le fer, qui possède une fonction basique. La protonation de ce ligand fournit le donneur de liaison hydrogène (Schéma E3), ce qui a été confirmé par les structures aux rayons X du complexe hydrosulfure et de son analogue résultant de la réaction avec le thiophénol (Figure E1).

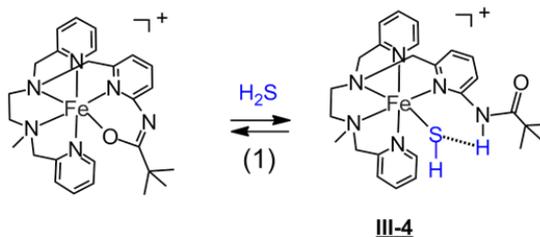


Schéma E3 : Synthèse du complexe **III-4**

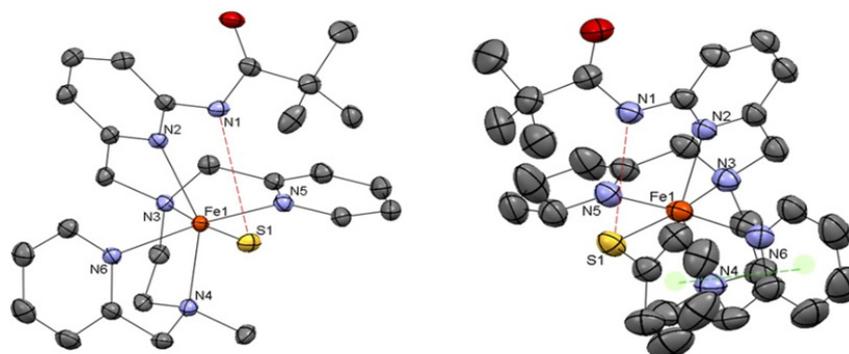


Figure E1 : Vues ORTEP des structures cristallographiques des complexes **III-4** (gauche) et **III-3** (droite). Les liaisons Hydrogène sont mises en évidence en rouge, et le π -stacking du ligand thiophénolate en vert

Ce complexe est l'un des rares exemples de complexe de coordination capable de libérer du sulfure d'hydrogène. Cette libération peut être lente, par le simple équilibre (1) du Schéma E3, ou rapide en présence d'un accepteur, tel qu'un complexe hydroxo du zinc (Schéma E4).

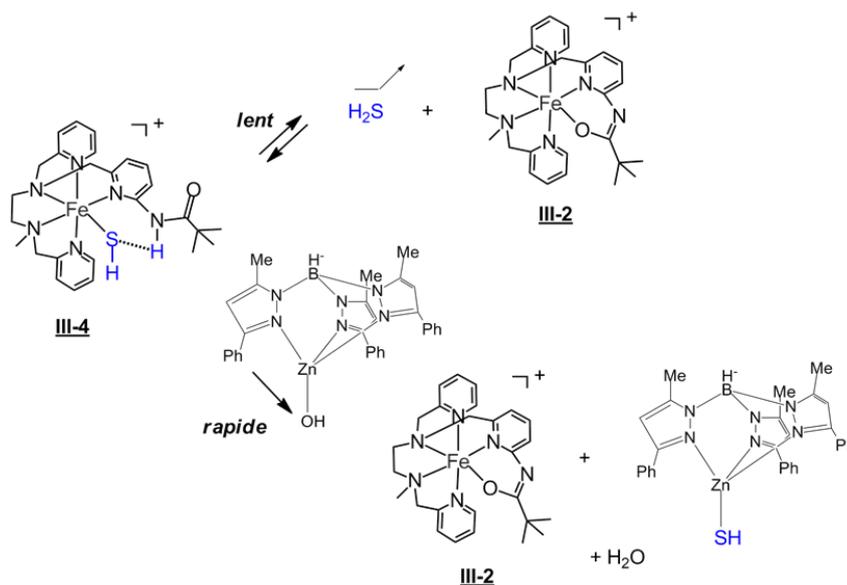


Schéma E4 : Le complexe **III-4** est un donneur de sulfure d'hydrogène

II Perspectives

Ce travail a mis en évidence la formation de dérivés de type persulfure ou trisulfure lors de réactions impliquant H_2S . Ces espèces poly-soufrées sont émergentes en biologie, et l'étude de tels composés, tant en chimie organique qu'inorganique est donc une suite logique à nos travaux. Il serait par exemple intéressant de comparer les réactivités d' H_2S et des persulfures RSSH vis à vis de biomolécules.

L'avenir des molécules capables de libérer du sulfure d'hydrogène se situe essentiellement dans le ciblage vers des organelles. Des premiers résultats prometteurs ont été présentés par le groupe de Moore, dans un brevet paru en 2013^[172] dans lequel il cible des donneurs classiques vers les mitochondries (Schéma E5). D'autres organelles pas encore ciblées présentent aussi un intérêt évident en lien avec H_2S , en particulier le noyau.

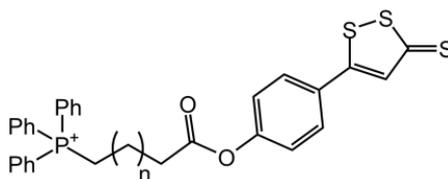


Schéma E5 : Donneur lent d' H_2S ciblant les mitochondries^[172]

Enfin, de nombreux challenges synthétiques susceptibles de motiver des chimistes inorganiciens restent encore à attaquer dans cette chimie du sulfure d'hydrogène. En particulier, la stabilisation d'un composé fer(III) comportant un ligand hydrosulfure lié au métal est particulièrement attractive.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les solvants proviennent des sociétés SDS et Aldrich. Ils sont distillés selon les procédés standards et conservés sous argon. Les produits ont été commandés chez les fournisseurs Acros, Aldrich, Fluka. Toutes les expériences nécessitant une atmosphère inerte ont été réalisées sur une rampe à vide/argon ou dans une boîte à gants Labmaster 130 de MBRAUN.

Les spectres infrarouge ont été obtenus avec un spectromètre Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR équipé d'une unité ATR MIRacle TM à réflexion horizontale unique (cristal de Zirconium-Selenium ou Germanium).

Les études fluorimétriques ont été effectuées sur un Hitachi F7000 et les spectres enregistrés ont été traités par le logiciel FL-solutions 4.0. Les études UV-visibles ont été menées sur un spectromètre JASCO V-570.

Les donneurs lents d'H₂S ont été évalués par ampérométrie avec l'électrode sélective à H₂S ISO-H2S-2 avec des interfaces APPOLLO 1000 et lab-trax-4/16 (WPI) avec le logiciel Labscribe 2.0.

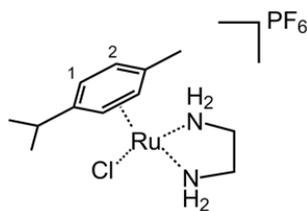
Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker ARX-250 ou Avance-500 et les déplacements chimiques sont calibrés par rapport au pic résiduel du solvant deutéré. Les spectres sont traités avec le logiciel NMR-notebook 2.5 pour l'analyse et la présentation des résultats.

Les spectres de masse en mode électrospray (ESI) ont été réalisés sur un spectromètre Thermo Finnigan LCD Advantage.

Les microanalyses sont effectuées au centre d'analyses de Gif-sur-Yvette.

Les nomenclatures sont données à l'aide du logiciel ACD/chemsketch, version ACD/Labs 6.00 suivant la nomenclature IUPAC ou en utilisant les abréviations utilisées dans la partie théorique le cas échéant.

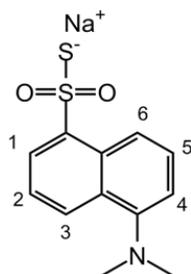
Composé 1 : $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$ ^[173]



À une solution de di-chloro-bis[chloro(η^6 -1-isopropyl-4-méthyl-benzène)ruthénium(II)] (306 mg, 0.5 mmol, 1 eq) dans le méthanol (60 ml) est ajoutée l'éthylènediamine (100 μ l, 1.5 mmol, 3 eq). Le mélange est ensuite mis sous agitation pendant 1 h 30 à température ambiante avant filtration. L'hexafluorophosphate d'ammonium (408 mg, 2.5 mmol, 5 eq) est ensuite additionné et la solution est concentrée à environ 15 ml puis laissée au congélateur pendant 6 h où un précipité est formé. Celui-ci est filtré puis lavé plusieurs fois à l'éther pour obtenir le produit pur sous forme d'un solide jaune (100 mg, R = 58%).

^1H NMR (δ , DMSO-*d*₆) : 6.13 (sl ; 2H ; NH₂), 5.48 (d ; J = 6.1 Hz ; 2H ; H₂), 5.32 (d ; J = 6.1 Hz ; 2H ; H₁), 4.22 (sl ; 2H ; NH₂), 2.71 (m ; 1H ; CH-iPr), 2.43 (m ; 2H ; CH₂), 2.23 (m ; 2H ; CH₂), 2.11 (s ; 3H ; Me), 1.25 (d ; J = 6.8 Hz ; 6H ; iPr).

Composé 2 : **DzSNa**^[138-139]



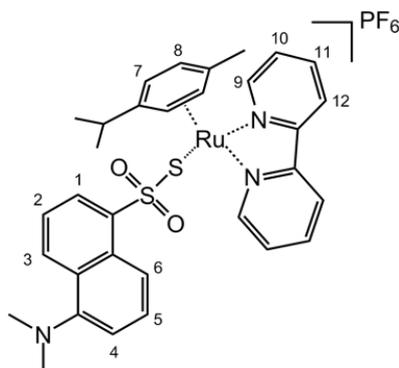
À une solution de sulfite de sodium (3.68 g, 29 mmol, 4 eq), et de bicarbonate de sodium (2.45 g, 29 mmol, 4 eq) dans l'eau (15 ml) à 70 °C, est ajouté le chlorure de dansyle (1.95 g, 7.25 mmol, 1 eq). Le mélange est laissé à la même température pendant 2 h 30, puis refroidi à température ambiante avant d'être acidifié à pH 6 à l'aide d'acide sulfurique. Le précipité formé est filtré sur papier puis lavé à l'eau pour obtenir l'acide correspondant sous la forme d'une poudre blanche. Après séchage, le composé est suspendu dans le méthanol (60 ml), puis une solution 1 M de méthanolate de sodium dans le méthanol est ajoutée goutte à goutte jusqu'à ce que le mélange devienne limpide. La solution est ensuite filtrée puis évaporée pour obtenir le sulfinate sous la forme d'un solide blanc. Ce dernier est re-solubilisé dans la pyridine distillée (10 ml) et du soufre élémentaire (0.23 g, 0.9 mmol, 1/8 eq) est additionné. Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 1 h. La solution jaune ainsi obtenue est concentrée, puis précipité dans l'éther froid (1.15 g ; R = 57%).

¹H NMR (δ , DMSO-*d*6) : 8.84 (d ; J = 7.6 Hz ; 1H ; H₃), 8.21 (d ; J = 7.6 Hz ; 1H ; H₁), 7.99 (t ; J = 7.6 Hz ; 1H ; H₂), 7.44 (m ; 2H ; H₅ + H₆), 7.14 (d ; J = 7.6 Hz ; 1H ; H₄), 2.81 (s ; 6H ; N(Me)₂).

UV (HEPES 50 mM pH 7.4/ MeOH (60/40)) : $\lambda = 321$ nm ($\epsilon = 4683$ M⁻¹.cm⁻¹)

m/z = 266.1 (M⁺)

Composé 3 : II-1



Le complexe $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (160 mg, 0.28 mmol, 1 eq) et le nitrate d'argent (48 mg, 0.28 mmol, 1 eq) sont introduits dans un ballon sous argon. Le méthanol distillé et dégazé (10 ml), est ajouté et le mélange est porté au reflux pendant 45 min. Les sels d'argent sont ensuite filtrés sur canule puis le thiosulfonate de dansyle (73 mg, 0.28 mmol, 1 eq) est ajouté au filtrat qui est laissé sous agitation pendant 1 h à température ambiante. La poudre jaune formée est finalement filtrée et séchée sous vide. (137 mg ; R = 57%).

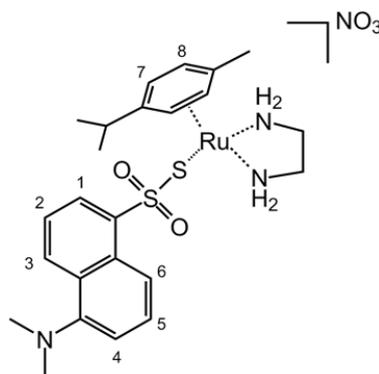
Anal. Calc. (trouvée) $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_2\text{PRuS}_2$: C, 47.88 (47.90) ; H, 4.27 (4.33) ; N, 5.23 (5.25)

^1H NMR (δ , DMSO- d_6) : 9.25 (d ; J = 5.6 Hz ; 2H ; H₉), 8.54 (d ; J = 7.9 Hz ; 2H ; H₁₂), 8.36 (d ; J = 7.9 Hz ; 1H ; H₃), 8.20 (t ; J = 7.9 Hz ; 2H ; H₁₁), 7.96 (d ; J = 7.9 Hz ; 1H ; H₁), 7.64 (m ; 3H ; H₁₀ + H₆), 7.46 (t ; J = 7.4 Hz ; 1H ; H₅), 7.30 (t ; J = 7.9 Hz ; 1H ; H₂), 7.13 (d ; J = 7.4 Hz ; 1H ; H₄), 6.20 (d ; J = 5.8 Hz ; 2H ; H₈), 6.07 (d ; J = 5.8 Hz ; 2H ; H₇), 2.81 (s ; 6H ; N(Me)₂), 2.58 (st ; J = 6.6 Hz ; 1H ; CH-iPr), 2.13 (s ; 3H ; Me), 0.91 (d ; J = 6.6 Hz ; 6H ; iPr).

UV (HEPES 50 mM pH 7.4/ MeOH (60/40)) : $\lambda_1 = 305$ nm ($\epsilon = 10567 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), $\lambda_2 = 316$ nm ($\epsilon = 10400 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), $\lambda_3 = 337$ nm (ep) ($\epsilon = 4667 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

$m/z = 657.9$ (M^+)

Composé 4 : II-2



Le composé $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$ (133 mg, 0.28 mmol, 1 eq) et le nitrate d'argent (48 mg, 0.28 mmol, 1 eq) sont introduits dans un ballon sous argon. Le méthanol, distillé et dégazé (10 ml), est ajouté et le mélange est porté au reflux pendant 45 min. Les sels d'argent sont filtrés sur canule puis le thiosulfonate de dansyle (73 mg, 0.28 mmol, 1 eq) est ajouté au filtrat qui est laissé sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Le brut obtenu est enfin purifié par chromatographie (Sephadex LH-20, méthanol) pour obtenir le produit sous la forme d'une poudre jaune (88 mg, R = 42%).

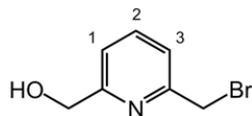
Anal. Calc. (trouvée) $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_5\text{RuS}_2$: C, 46.21 (46.51) ; H, 5.49 (5.60) ; N, 8.98 (8.61)

^1H NMR (δ , DMSO- d_6) : 8.66 (d ; J = 8.4 Hz ; 1H ; H₃), 8.55 (d ; J = 8.4 Hz ; 1H ; H₁), 8.11 (d ; J = 7.7 Hz ; 1H ; H₆), 7.69 (m ; 2H ; H₂ + H₅), 7.31 (d ; J = 7.7 Hz ; 1H ; H₄), 6.18 (sl ; 2H ; NH₂), 5.33 (d ; J = 6.1 Hz ; 2H ; H₈), 5.02 (d ; J = 6.1 Hz ; 2H ; H₇), 4.70 (sl ; 2H ; NH₂), 2.86 (m ; 7H ; $\underline{\text{CH}}$ -iPr + N(CH₃)₂), 2.81 (m ; 2H ; CH₂), 2.35 (m ; 2H ; CH₂), 2.05 (s ; 3H ; Me), 0.96 (d ; J = 6.9 Hz ; 6H ; iPr).

UV (HEPES 50 mM pH 7.4/ MeOH (60/40)) : $\lambda_1 = 332 \text{ nm}$ ($\epsilon = 4667 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

$m/z = 561.9$ (M^+)

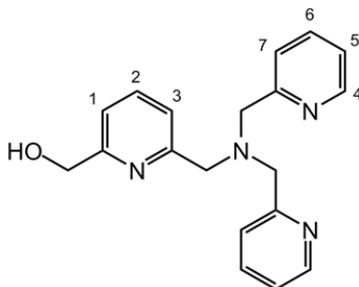
Composé 5 : 6-(bromométhyl)pyridin-2-méthanol^[174]



On ajoute l'acide bromhydrique (30 ml) à la pyridine-2,6-diméthanol (3.0 g, 21.7 mmol) et la suspension est mise 1 h au reflux avant d'être refroidie à 0 °C. La solution est neutralisée par ajout d'une solution de soude avant d'être extraite au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium avant d'être évaporée sous pression réduite. Les composés mono- et di-bromés sont séparés par chromatographie sur colonne (dichlorométhane 100% puis éther 100%) pour obtenir le composé pur final sous la forme d'un solide blanc. (1.34 g ; R = 31%)

¹H NMR (δ , $CDCl_3$) : 7.66 (t ; J = 7.7 Hz ; 1H ; H₂), 7.30 (d ; J = 7.7 Hz ; 1H ; H₁), 7.22 (d ; J = 7.7 Hz ; 1H ; H₃), 4.72 (s ; 2H ; CH₂OH), 4.50 (s ; 2H ; CH₂Br),

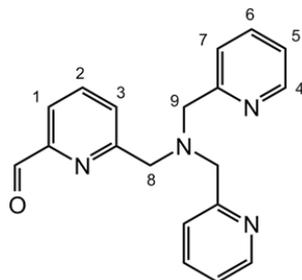
Composé 6 : TPA-CH₂OH



Le composé précédent (1.00 g, 5 mmol, 1 eq) est mis en solution dans l'acétonitrile distillée (24 ml) puis la dipicolylamine (900 μ l, 5 mmol, 1 eq) en solution dans l'acétonitrile distillée (24 ml) avec de la triéthylamine (700 μ l, 5 mmol, 1 eq) est ajoutée goutte à goutte au mélange réactionnel à température ambiante à l'aide d'une ampoule à brome. La solution est agitée à température ambiante pendant 3 h, puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est ensuite solubilisé dans l'eau et basifié à pH 12 à l'aide d'une solution de soude concentrée, avant extraction avec du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 avant d'être évaporée sous pression réduite pour obtenir le composé pur sous la forme d'une huile jaune-orange. (1.3 g, R = 81%)

^1H NMR (δ , CDCl_3) : 8.58 (d ; J = 4.9 Hz ; 2H ; H₄), 7.66 (m ; 3H ; H₂ + H₆), 7.60 (d ; 2H ; J = 7.7 Hz ; H₇), 7.44 (d ; J = 7.7 Hz ; 1H ; H₁), 7.18 (m ; 2H ; H₅), 7.09 (d ; J = 7.7 Hz ; 1H ; H₃), 4.76 (s ; 2H ; CH₂OH), 3.92 (s ; 6H ; CH₂).

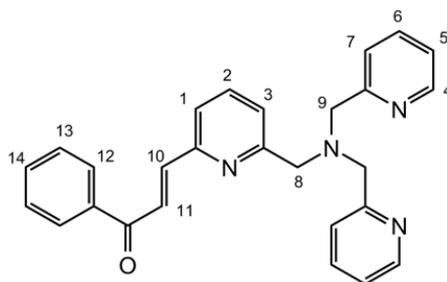
Composé 7 : TPA-CHO



L'alcool précédent (1.00 g, 3.1 mmol, 1 eq) est dissous dans le chloroforme distillé (22 ml). L'acide 2-iodoxybenzoïque (2.60 g, 9.3 mmol, 3 eq) est ajouté à la solution qui est laissée sous agitation pendant 3 h à 55 °C. Le mélange est refroidi et laissé au congélateur une nuit avant d'être filtré sur célite, et évaporé sous pression réduite pour obtenir le produit avec un rendement quantitatif (1.00 g).

^1H NMR (δ , CDCl_3) : 10.07 (s ; 1H ; CHO), 8.58 (d ; J = 4.8 Hz ; 2H ; H₄), 7.84 (m ; 3H ; H₁ + H₂ + H₃), 7.67 (m ; 2H ; H₆), 7.59 (d ; J = 7.6 Hz ; 2H ; H₇), 7.19 (m ; 2H ; H₅), 4.02 (s ; 2H ; H₈), 3.95 (s ; 4H ; H₉).

Composé 8 : TPA-Michael



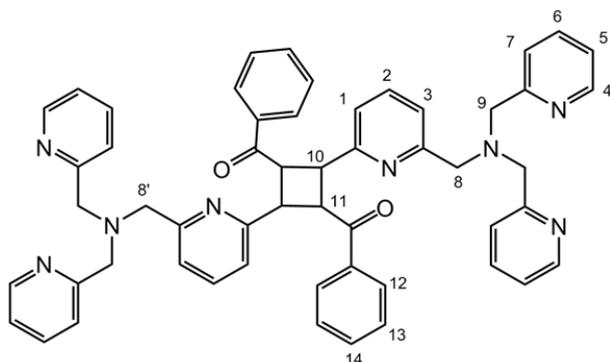
Le composé **TPA-CHO** (1.00 g, 3.13 mmol, 1 eq) est mis en solution dans le tétrahydrofurane (22 ml). De la potasse 1.7 M (1.66 ml, 2.82 mmol, 0.9 eq) et de l'acétophénone (330 μ l, 2.82 mmol, 0.9 eq) sont ajoutées à la solution qui est laissée 1 nuit à température ambiante sous agitation à l'abri de la lumière. Le brut est ensuite évaporé à sec, extrait à pH 9 à l'aide de dichlorométhane et purifié sur colonne d'alumine à l'abri de la lumière. Un produit blanc rosé est obtenu (600 mg, R = 49%).

^1H NMR (δ , CDCl_3) : 8.57 (d ; J = 5.3 Hz ; 2H ; H₄), 8.14 (d ; J = 14.9 Hz ; 1H ; H₁₁), 8.10 (m ; 2H ; H₁₂), 7.77 (d ; J = 14.9 Hz ; 1H ; H₁₀), 7.72 (t ; J = 8.0 Hz ; 1H ; H₂), 7.68 (dt ; J = 8.0 Hz ; J = 1.5 Hz ; 2H ; H₆), 7.63 (m ; 3H ; H₇ + H₁₄), 7.59 (d ; J = 8.0 Hz ; 1H ; H₃), 7.54 (m ; 2H ; H₁₃), 7.35 (d ; J = 8.0 Hz ; 1H ; H₁), 7.17 (m ; 2H ; H₅), 3.98 (s ; 2H ; H₈), 3.97 (s ; 4H ; H₉).

UV (HEPES 50 mM pH 7.4 avec 3% DMSO) : $\lambda_1 = 261$ nm ($\epsilon = 11200$ M⁻¹.cm⁻¹), $\lambda_2 = 311$ nm ($\epsilon = 8400$ M⁻¹.cm⁻¹).

m/z : 421.1 (M + H⁺)

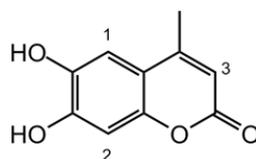
Composé 9 : [TPA]₂-cyclo



Formé par photodimérisation du composé TPA-Michael à l'état solide comme décrit dans le chapitre II.

¹H NMR (δ, CDCl₃) : 8.56 (d ; J₁ = 4.7 Hz ; 4H ; H₄), 7.75 (d ; J = 7.5 Hz ; 4H ; H₁₂), 7.65 (d ; J = 7.5 Hz ; 4H ; H₆), 7.59 (d ; J = 7.5 Hz ; 4H ; H₇), 7.32 (m ; 4H ; H₁ + H₂), 7.18 (m ; 10H ; H₅ + H₁₃ + H₁₄), 6.95 (d ; J = 7.5 Hz ; 2H ; H₃), 5.12 (m ; 2H ; H₁₀), 7.59 (m ; 2H ; H₁₁), 3.78 (s ; 8H ; H₉) ; 3.67 (s ; 2H ; H₈), 3.65 (s ; 2H ; H_{8'}).

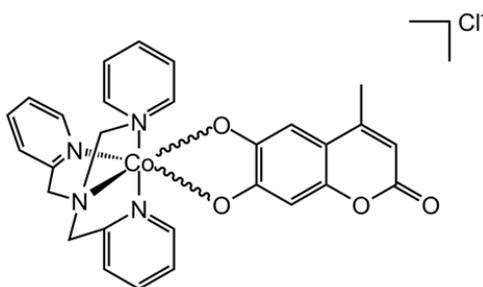
Composé 10 : **MLH₂**



Le benzène-1,2,4-triol (3.05 g, 24 mmol, 1 eq) est ajouté à l'acétoacétate d'éthyle (6.16 ml, 48 mmol, 2 eq) en solution dans l'acide perchlorique (8.4 ml). Le mélange est chauffé à 95 °C pendant 3 h avant d'être versé dans de l'eau glacée (20 ml). Le solide est recristallisé dans de l'éthanol bouillant (20 ml) et récupéré par filtration sur canule (2.7 g, 14 mmol, R = 59%).

¹H NMR (δ , MeOD) : 7.08 (s ; 1H ; H₁), 6.77 (s ; 1H ; H₂), 6.13 (d ; J = 1.2 Hz ; H₃), 2.4 (d ; J = 1.2 Hz ; 3H ; Me).

UV (HEPES 50 mM pH 7.4 avec 3% DMSO) : $\lambda = 362$ nm ($\epsilon = 10600$ M⁻¹.cm⁻¹)

Composé 11 : **II-3**

Le dichlorure de cobalt (31 mg, 0.24 mmol, 1 eq) est ajouté au ligand **TPA-Michael** (100 mg, 0.24 mmol, 1 eq) en solution dans le diméthylformamide (11 ml) et la solution est laissée sous agitation pendant 15 min. Le ligand **MLH₂** (46 mg, 0.24 mmol, 1 eq) déprotoné par de la potasse (27 mg, 0.48 mmol, 2 eq) en solution dans le diméthylformamide (3 ml), est ajouté au mélange précédent qui est laissé sous agitation à température ambiante pendant 30 min puis est oxydé à l'air pendant une nuit. Le solvant est évaporé puis le produit est récupéré sous la forme de cristaux vert-noir par redissolution dans le minimum de dichlorométhane suivi d'une précipitation dans l'éther.

Anal. Calc. (trouvée) C₃₇H₃₈ClCoN₄O₉.KCl : C, 52.18 (52.05) ; H, 4.50 (4.35) ; N, 6.58 (6.70).

UV (HEPES 50 mM pH 7.4 avec 3% DMSO) : $\lambda_1 = 303$ nm (ep) ($\epsilon = 9600$ M⁻¹.cm⁻¹),
 $\lambda_2 = 392$ nm ($\epsilon = 8400$ M⁻¹.cm⁻¹).

m/z : 669.1 (M⁺)

- [1] J. A. Brito, F. L. Sousa, M. Stelter, T. M. Bandejas, C. Vonrhein, M. Teixeira, M. M. Pereira, M. Archer, *Biochemistry-Us* **2009**, *48*, 5613-5622.
- [2] R. J. Reiffenstein, W. C. Hulbert, S. H. Roth, *Annu Rev Pharmacol* **1992**, *32*, 109-134.
- [3] aLci **2009**, <http://lci.tf1.fr/science/environnement/2009-08/algues-vertes-un-cheval-mort-et-des-inquietudes-4896765.html>; bP. H. Allain, *Libération* **2009**, <http://www.liberennes.fr/libe/2009/07/un-cheval-meurt-asphyxi%C3%A9-par-les-algues-vertes.html>.
- [4] F. Bouillaud, F. Blachier, *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 379-391.
- [5] aD. W. Kraus, J. B. Wittenberg, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 16043-16053; bD. W. Kraus, J. B. Wittenberg, J. F. Lu, J. Peisach, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 16054-16059.
- [6] J. F. Flores, C. R. Fisher, S. L. Carney, B. N. Green, J. K. Freytag, S. W. Schaeffer, W. E. Royer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 2713-2718.
- [7] K. Abe, H. Kimura, *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 1066-1071.
- [8] R. Wang, *FASEB J.* **2002**, *16*, 1792-1798.
- [9] R. Tenhunen, H. S. Marver, R. Schmid, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6388-6394.
- [10] M. H. Stipanuk, P. W. Beck, *Biochem. J.* **1982**, *206*, 267-277.
- [11] R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki, *Nature* **1980**, *288*, 373-376.
- [12] L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, G. Chaudhuri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 9265-9269.
- [13] D. J. Stuehr, S. S. Gross, I. Sakuma, R. Levi, C. F. Nathan, *J. Exp. Med.* **1989**, *169*, 1011-1020.
- [14] aA. Verma, D. J. Hirsch, C. E. Glatt, G. V. Ronnett, S. H. Snyder, *Science* **1993**, *259*, 381-384; bS. H. Snyder, *Science* **1992**, *257*, 494-496.
- [15] Z. Weimin, Z. Jing, L. Yanjie, W. Rui, *EMBO J.* **2001**, *20*, 6008-6016.
- [16] G. Yang, L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A. K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S. H. Snyder, R. Wang, *Science* **2008**, *322*, 587-590.
- [17] M. G. Mohaupt, J. Schwobel, J. L. Elzie, G. S. Kannan, B. C. Kone, *Am. J. Physiol.* **1995**, *268*, F770-777.
- [18] T. W. Sedlak, S. H. Snyder, *JAMA* **2006**, *295*, 81-89.
- [19] A. C. Bulmer, K. Ried, J. T. Blanchfield, K. H. Wagner, *Mutat. Res.* **2008**, *658*, 28-41.
- [20] R. Wang, Z. Wang, L. Wu, *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *121*, 927-934.
- [21] A. K. Mustafa, M. M. Gadalla, S. H. Snyder, *Sci. Signal.* **2009**, *2*, re2.
- [22] aJ. C. Mathai, A. Missner, P. Kügler, S. M. Saparov, M. L. Zeidel, J. K. Lee, P. Pohl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16633-16638; bE. Cuevasanta, A. Denicola, B. Alvarez, M. N. Möller, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34562.
- [23] A. D. Ang, A. Königstorfer, G. I. Giles, M. Bhatia, *Adv. Biol. Chem.* **2012**, *2*, 360-365.
- [24] D. Rickard, G. W. Luther, 3rd, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 514-562.

- [25] O. Kabil, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21903-21907.
- [26] aQ. Li, J. R. Lancaster Jr, *Nitric Oxide* **2013**, *35*, 21-34; bS. Carballal, M. Trujillo, E. Cuevasanta, S. Bartesaghi, M. N. Möller, L. K. Folkes, M. A. García-Bereguiaín, C. Gutiérrez-Merino, P. Wardman, A. Denicola, R. Radi, B. Alvarez, *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 196-205.
- [27] aC. L. Ulrey, L. Liu, L. G. Andrews, T. O. Tollefsbol, *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14 Spec No 1*, R139-147; bR. A. Waterland, *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1706S-1710S.
- [28] aL. K. Moran, J. M. Gutteridge, G. J. Quinlan, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 763-772; bW. Wang, N. Ballatori, *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 335-356.
- [29] J. Marcinkiewicz, E. Kontny, *Amino Acids* **2012**, 1-14.
- [30] M. M. Gadalla, S. H. Snyder, *J. Neurochem.* **2010**, *113*, 14-26.
- [31] C. G. Zou, R. Banerjee, *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, *7*, 547-559.
- [32] aH. J. Blom, D. P. E. Engelen, G. H. J. Boers, A. M. Stadhouders, R. C. A. Sengers, R. Abreu, M. T. W. B. TePoele-Pothoff, J. M. F. Trijbels, *J. Inherit. Metab. Dis.* **1992**, *15*, 419-422; bC.-F. Sun, T. R. Haven, T.-L. Wu, K.-C. Tsao, J. T. Wu, *Clin. Chim. Acta* **2002**, *321*, 55-62; cL. L. Wu, J. T. Wu, *Clin. Chim. Acta* **2002**, *322*, 21-28.
- [33] P. W. Beatty, D. J. Reed, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *204*, 80-87.
- [34] aT. Chiku, D. Padovani, W. D. Zhu, S. Singh, V. Vitvitsky, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 11601-11612; bS. Singh, D. Padovani, R. A. Leslie, T. Chiku, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 22457-22466.
- [35] aC. G. Zou, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16802-16808; bS. Singh, P. Madzellan, R. Banerjee, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 631-639.
- [36] aM. Puranik, C. L. Weeks, D. Lahaye, O. Kabil, S. Taoka, S. B. Nielsen, J. T. Groves, R. Banerjee, T. G. Spiro, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 13433-13438; bC. L. Weeks, S. Singh, P. Madzellan, R. Banerjee, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12809-12816; cS. Carballal, E. Cuevasanta, I. Marmisolle, O. Kabil, C. Gherasim, D. P. Ballou, R. Banerjee, B. Alvarez, *Biochemistry-Us* **2013**, *52*, 4553-4562.
- [37] aR. Banerjee, C. G. Zou, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *433*, 144-156; bS. Taoka, R. Banerjee, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *87*, 245-251; cS. Taoka, M. West, R. Banerjee, *Biochemistry-Us* **1999**, *38*, 7406.
- [38] aA. Prudova, Z. Bauman, A. Braun, V. Vitvitsky, S. C. Lu, R. Banerjee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6489-6494; bJ. D. Finkelstein, W. E. Kyle, J. L. Martin, A. M. Pick, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *66*, 81-87; cS. Taoka, L. Widjaja, R. Banerjee, *Biochemistry-Us* **1999**, *38*, 13155-13161; dM. Koutmos, O. Kabil, J. L. Smith, R. Banerjee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 20958-20963.
- [39] M. H. Stipanuk, *Annu. Rev. Nutr.* **1986**, *6*, 179-209.
- [40] X. Chen, K. H. Jhee, W. D. Kruger, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52082-52086.
- [41] aN. Shibuya, M. Tanaka, M. Yoshida, Y. Ogasawara, T. Togawa, K. Ishii, H. Kimura, *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 703-714; bM. Dudek, J. Frendo, A. Koj, *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol* **1980**, *65*, 383-386.
- [42] N. Shibuya, S. Koike, M. Tanaka, M. Ishigami-Yuasa, Y. Kimura, Y. Ogasawara, K. Fukui, N. Nagahara, H. Kimura, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1366.
- [43] R. A. Williams, S. M. Kelly, J. C. Mottram, G. H. Coombs, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1480-1486.

- [44] aY. Mikami, N. Shibuya, Y. Kimura, N. Nagahara, Y. Ogasawara, H. Kimura, *Biochem. J.* **2011**, *439*, 479-485; bN. Nagahara, A. Katayama, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34569-34576.
- [45] P. K. Yadav, K. Yamada, T. Chiku, M. Koutmos, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 20002-20013.
- [46] N. Nagahara, *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, doi:10.1089/ars.2012.5031.
- [47] V. Vitvitsky, O. Kabil, R. Banerjee, *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *17*, 22-31.
- [48] T. M. Hildebrandt, M. K. Grieshaber, *FEBS J.* **2008**, *275*, 3352-3361.
- [49] E. Lagoutte, S. Mimoun, M. Andriamihaja, C. Chaumontet, F. Blachier, F. Bouillaud, *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg* **2010**, *1797*, 1500-1511.
- [50] D. R. Linden, J. Furne, G. J. Stoltz, M. S. Abdel-Rehim, M. D. Levitt, J. H. Szurszewski, *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 2178-2190.
- [51] C. Griesbeck, M. Schutz, T. Schodl, S. Bathe, L. Nausch, N. Mederer, M. Vielreicher, G. Hauska, *Biochemistry-Us* **2002**, *41*, 11552-11565.
- [52] M. R. Jackson, S. L. Melideo, M. S. Jorns, *Biochemistry-Us* **2012**, *51*, 6804-6815.
- [53] O. Kabil, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 44561-44567.
- [54] C. Coletta, A. Papapetropoulos, K. Erdelyi, G. Olah, K. Módis, P. Panopoulos, A. Asimakopoulou, D. Gerö, I. Sharina, E. Martin, C. Szabo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 9161-9166.
- [55] A. Papapetropoulos, A. Pyriochou, Z. Altaany, G. Yang, A. Marazioti, Z. Zhou, M. G. Jeschke, L. K. Branski, D. N. Herndon, R. Wang, C. Szabo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21972-21977.
- [56] S. C. Bir, G. K. Kolluru, P. McCarthy, X. Shen, S. Pardue, C. B. Pattillo, C. G. Kevil, *J. Am. Heart. Assoc.* **2012**, *1*, doi: 10.1161/JAHA.1112.004093.
- [57] aW. J. Cai, M. J. Wang, L. H. Ju, C. Wang, Y. C. Zhu, *Cell. Biol. Int.* **2010**, *34*, 565-572; bC. Szabo, C. Coletta, C. Chao, K. Módis, B. Szczesny, A. Papapetropoulos, M. R. Hellmich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**.
- [58] E. Blackstone, M. Morrison, M. B. Roth, *Science* **2005**, *308*, 518.
- [59] aK. R. Olson, R. A. Dombkowski, M. J. Russell, M. M. Doellman, S. K. Head, N. L. Whitfield, J. A. Madden, *J. Exp. Biol.* **2006**, *209*, 4011-4023; bK. R. Olson, S. F. Perry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, E141.
- [60] aS. Mimoun, M. Andriamihaja, C. Chaumontet, C. Atanasiu, R. Benamouzig, J. M. Blouin, D. Tome, F. Bouillaud, F. Blachier, *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *17*, 1-10; bG. K. Kolluru, X. Shen, S. C. Bir, C. G. Kevil, *Nitric Oxide* **2013**, *35*, 5-20.
- [61] A. K. Mustafa, M. M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. T. Mu, S. K. Gazi, R. K. Barrow, G. D. Yang, R. Wang, S. H. Snyder, *Sci. Signal.* **2009**, *2*, ra72.
- [62] J. I. Toohey, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 803.
- [63] J. I. Toohey, *Anal. Biochem.* **2011**, *413*, 1-7.
- [64] N. E. Francoleon, S. J. Carrington, J. M. Fukuto, *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *516*, 146-153.
- [65] B. B. Tao, S. Y. Liu, C. C. Zhang, W. Fu, W. J. Cai, Y. Wang, Q. Shen, M. J. Wang, Y. Chen, L. J. Zhang, Y. Z. Zhu, Y. C. Zhu, *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 448-464.

- [66] N. Krishnan, C. Fu, D. J. Pappin, N. K. Tonks, *Sci. Signal.* **2011**, *4*, ra86.
- [67] K. A. Broniowska, N. Hogg, *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *17*, 969-980.
- [68] B. D. Paul, S. H. Snyder, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2012**, 499-507.
- [69] M. S. Vandiver, B. D. Paul, R. Xu, S. Karuppagounder, F. Rao, A. M. Snowman, H. S. Ko, Y. I. Lee, V. L. Dawson, T. M. Dawson, N. Sen, S. H. Snyder, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1626.
- [70] M. Nishida, T. Akaike, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 714-724.
- [71] T. Sawa, M. H. Zaki, T. Okamoto, T. Akuta, Y. Tokutomi, S. Kim-Mitsuyama, H. Ihara, A. Kobayashi, M. Yamamoto, S. Fujii, H. Arimoto, T. Akaike, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 727-735.
- [72] T. Sawa, H. Ihara, T. Akaike, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1854-1860.
- [73] M. Whiteman, L. Li, I. Kostetski, S. H. Chu, J. L. Siau, M. Bhatia, P. K. Moore, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *343*, 303-310.
- [74] M. R. Filipovic, J. L. Miljkovic, T. Nauser, M. Royzen, K. Klos, T. Shubina, W. H. Koppenol, S. J. Lippard, I. Ivanović-Burmazović, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12016-12027.
- [75] C. G. Tocchetti, B. A. Stanley, C. I. Murray, V. Sivakumaran, S. Donzelli, D. Mancardi, P. Pagliaro, W. D. Gao, J. van Eyk, D. A. Kass, D. A. Wink, N. Paolocci, *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 1687-1698.
- [76] aY. Zhang, N. Hogg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7891-7896; bK. A. Broniowska, Y. Zhang, N. Hogg, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 33835-33841.
- [77] aL. David, *Trends Microbiol.* **2006**, *14*, 456-462; bC. Cooper, G. Brown, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2008**, *40*, 533-539.
- [78] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1995**, *269*, 1069-1074.
- [79] J. Collman, S. Ghosh, A. Dey, R. A. Decreau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 22090-22095.
- [80] R. Pietri, E. Roman-Morales, J. Lopez-Garriga, *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 393-404.
- [81] F. P. Nicoletti, A. Comandini, A. Bonamore, L. Boechi, F. M. Boubeta, A. Feis, G. Smulevich, A. Boffi, *Biochemistry-Us* **2010**, *49*, 2269-2278.
- [82] R. J. Carrico, W. E. Blumberg, J. Peisach, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 7212-7215.
- [83] aM. J. Chatfield, G. N. La Mar, A. L. Balch, K. M. Smith, D. W. Parish, T. J. LePage, *FEBS Lett.* **1986**, *206*, 343-346; bM. J. Chatfield, G. N. La Mar, J. T. J. Lecomte, A. L. Balch, K. M. Smith, K. C. Langry, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7108-7110.
- [84] S. V. Evans, B. P. Sishita, A. G. Mauk, G. D. Brayer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4723-4726.
- [85] D. Padovani, Travaux en cours de publication.
- [86] A. Innocenti, M. Hilvo, S. Parkkila, A. Scozzafava, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1155-1158.
- [87] J. J. Childress, C. R. Fisher, J. A. Favuzzi, A. J. Arp, D. R. Oros, *J. Exp. Biol.* **1993**, *179*, 131-158.
- [88] K. R. Olson, *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1787*, 856-863.

- [89] R. R. Moest, *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 1204-1205.
- [90] G. N. Lewis, O. Goldschmid, T. T. Magel, J. Bigeleisen, *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 1150-1154.
- [91] A. Sparatore, E. Perrino, V. Tazzari, D. Giustarini, R. Rossi, G. Rossoni, K. Erdman, H. Schröder, P. D. Soldato, *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 586-592.
- [92] J. Hongfang, B. Cong, B. Zhao, C. Zhang, X. Liu, W. Zhou, Y. Shi, C. Tang, D. Junbao, *Life Sci.* **2006**, *78*, 1299-1309.
- [93] J. E. Doeller, T. S. Isbell, G. Benavides, J. Koenitzer, H. Patel, R. P. Patel, J. R. Lancaster Jr, V. M. Darley-Usmar, D. W. Kraus, *Anal. Biochem.* **2005**, *341*, 40-51.
- [94] N. L. Whitfield, E. L. Kreimier, F. C. Verdial, N. Skovgaard, K. R. Olson, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *294*, R1930-R1937.
- [95] G. A. Benavides, G. L. Squadrito, R. W. Mills, H. D. Patel, T. S. Isbell, R. P. Patel, V. M. Darley-Usmar, J. E. Doeller, D. W. Kraus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17977-17982.
- [96] A. R. Lippert, E. J. New, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10078-10080.
- [97] D. Maurel, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagramme_de_Jablonski.png **2008**.
- [98] B. Valeur, in *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH Verlag GmbH, **2001**.
- [99] E. Galardon, A. Tomas, P. Roussel, I. Artaud, *Dalton Trans.* **2009**, 9126-9130.
- [100] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515-1566.
- [101] L. R. Lin, W. Fang, Y. Yu, R. B. Huang, L. S. Zheng, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectros.* **2007**, *67*, 1403-1406.
- [102] H. S. Jung, J. H. Han, Z. H. Kim, C. Kang, J. S. Kim, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5056-5059.
- [103] aM. G. Choi, S. Cha, H. Lee, H. L. Jeon, S. K. Chang, *Chem. Commun.* **2009**, 7390-7392; bK. Sasakura, K. Hanaoka, N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, H. Kimura, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18003-18005.
- [104] aX. Cao, W. Lin, L. He, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4716-4719; bL. Zhang, X. D. Lou, Y. Yu, J. G. Qin, Z. Li, *Macromolecules* **2011**, *44*, 5186-5193; cR. Zhang, X. J. Yu, Y. J. Yin, Z. Q. Ye, G. L. Wang, J. L. Yuan, *Anal. Chim. Acta.* **2011**, *691*, 83-88; dX. Qu, C. Li, H. Chen, J. Mack, Z. Guo, Z. Shen, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7510-7512; eJ. Wang, L. Long, D. Xie, Y. Zhan, *JOL* **2013**, *139*, 40-46; fF. Hou, J. Cheng, P. Xi, F. Chen, L. Huang, G. Xie, Y. Shi, H. Liu, D. Bai, Z. Zeng, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 5799-5804.
- [105] D. Huber, G. Andermann, G. Leclerc, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 635-638.
- [106] aT. Kraus, M. Buděšínský, I. Císařová, J. Závada, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, *2004*, 4060-4069; bS. Kusumoto, K. Sakai, T. Shiba, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 1296-1298.
- [107] aB. Chen, W. Li, C. Lv, M. Zhao, H. Jin, H. Jin, J. Du, L. Zhang, X. Tang, *Analyst* **2013**, *138*, 946-951; bM.-Y. Wu, K. Li, J.-T. Hou, Z. Huang, X.-Q. Yu, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8342-8347; cM. K. Thorson, T. Majtan, J. P. Kraus, A. M. Barrios, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 4641-4644; dZ. Wu, Z. Li, L. Yang, J. Han, S. Han, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10120-10122.
- [108] aV. S. Lin, A. R. Lippert, C. J. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 7131-7135; bH. Zhang, P. Wang, G. Chen, H.-Y. Cheung, H. Sun, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 4826-4829.

- [109] aL. A. Montoya, M. Pluth, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4767-4769; bL. Wang, Y. Kang, Y. Wang, B. Zhu, S. Zhang, W. Huang, S. Wang, *Materials Science and Engineering: C* **2012**; cG. Zhou, H. Wang, Y. Ma, X. Chen, *Tetrahedron* **2012**, *69*, 867-870.
- [110] W. Xuan, R. Pan, Y. Cao, K. Liu, W. Wang, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10669-10671.
- [111] Y. Chen, C. Zhu, Z. Yang, J. Chen, Y. He, Y. Jiao, W. He, L. Qiu, J. Cen, Z. Guo, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 1688-1691.
- [112] J. Liu, Y. Q. Sun, J. Zhang, T. Yang, J. Cao, L. Zhang, W. Guo, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4717-4722.
- [113] aX. Cao, W. Lin, K. Zheng, L. He, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10529-10531; bT. Liu, Z. Xu, D. R. Spring, J. Cui, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2310-2313.
- [114] Y. Qian, J. Karpus, O. Kabil, S.-Y. Zhang, H.-L. Zhu, R. Banerjee, J. Zhao, C. He, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 495.
- [115] C. Liu, J. Pan, S. Li, Y. Zhao, L. Y. Wu, C. E. Berkman, A. R. Whorton, M. Xian, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 10327-10329.
- [116] X. Wang, J. Sun, W. Zhang, X. Ma, J. Lv, B. Tang, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2551-2556.
- [117] aS. K. Das, C. S. Lim, S. Y. Yang, J. H. Han, B. R. Cho, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8395-8397; bW. Sun, J. Fan, C. Hu, J. Cao, H. Zhang, X. Xiong, J. Wang, S. Cui, S. Sun, X. Peng, *Chem. Commun.* **2013**; cS. K. Bae, C. H. Heo, D. J. Choi, D. Sen, E.-H. Joe, B. R. Cho, H. M. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9915-9923; dG.-J. Mao, T.-T. Wei, X.-X. Wang, S.-y. Huan, D.-Q. Lu, J. Zhang, X.-B. Zhang, W. Tan, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7875-7881.
- [118] K. Kashfi, K. R. Olson, *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 689-703.
- [119] O. Kabil, R. Banerjee, *Antioxid. Redox Signal.* **2013**.
- [120] L. Li, M. Whiteman, Y. Y. Guan, K. L. Neo, Y. Cheng, S. W. Lee, Y. Zhao, R. Baskar, C.-H. Tan, P. K. Moore, *Circulation* **2008**, *117*, 2351-2360.
- [121] aZ. W. Lee, J. B. Zhou, C. S. Chen, Y. J. Zhao, C. H. Tan, L. Li, P. K. Moore, L. W. Deng, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21077; bL. Li, M. Salto-Tellez, C. H. Tan, M. Whiteman, P. K. Moore, *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 103-113; cM. Whiteman, L. Li, P. Rose, C. H. Tan, D. B. Parkinson, P. K. Moore, *Antioxid. Redox Signal.* **2010**, *12*, 1147-1154.
- [122] D. Giustarini, P. Del Soldato, A. Sparatore, R. Rossi, *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48*, 1263-1272.
- [123] M. Lee, A. Sparatore, P. Del Soldato, E. McGeer, P. L. McGeer, *Glia* **2010**, *58*, 103-113.
- [124] M. Chattopadhyay, R. Kodela, N. Nath, Y. M. Dastagirzada, C. A. Velázquez-Martínez, D. Boring, K. Kashfi, *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 715-722.
- [125] M. Lee, V. Tazzari, D. Giustarini, R. Rossi, A. Sparatore, S. P. Del, E. McGeer, P. L. McGeer, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 17318-17328.
- [126] J. L. Wallace, *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 501-505.
- [127] M. S. Vandiver, B. D. Paul, R. Xu, S. Karuppagounder, F. Rao, A. M. Snowman, H. S. Ko, Y. I. Lee, V. L. Dawson, T. M. Dawson, N. Sen, S. H. Snyder, *Nat Commun* **2013**, *4*, 1626.
- [128] Z. Zhou, M. von Wantoch Rekowski, C. Coletta, C. Szabo, M. Bucci, G. Cirino, S. Topouzis, A. Papapetropoulos, A. Giannis, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2675-2678.

- [129] Y. Zhao, H. Wang, M. Xian, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15-17.
- [130] Y. Zhao, S. Bhushan, C. Yang, H. Otsuka, J. D. Stein, A. Pacheco, B. Peng, N. O. Devarie-Baez, H. C. Aguilar, D. J. Lefer, M. Xian, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1283-1290.
- [131] R. Kodela, M. Chattopadhyay, K. Kashfi, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 257-262.
- [132] L. Li, P. K. Moore, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1138-1141.
- [133] T. W. Failes, T. W. Hambley, *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 396-403.
- [134] H. B. Gray, C. H. Langford, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1968**, *19*, 193-214.
- [135] E. Galardon, P. Deschamps, A. Tomas, P. Roussel, I. Artaud, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 9119-9121.
- [136] F. Zobi, B. B. Mood, P. A. Wood, F. P. A. Fabbiani, S. Parsons, P. J. Sadler, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 2783-2796.
- [137] B. A. Aird, J. Lane, J. Westley, *Anal. Biochem.* **1987**, *164*, 554-558.
- [138] S. Aoki, Y. Tomiyama, Y. Kageyama, Y. Yamada, M. Shiro, E. Kimura, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 561-573.
- [139] J. M. Chalker, Y. A. Lin, O. Boutureira, B. G. Davis, *Chem. Commun.* **2009**, 3714-3716.
- [140] M. A. Bennett, T. N. Huang, T. W. Matheson, A. K. Smith, S. Ittel, W. Nickerson, in *Inorg. Synth.*, John Wiley & Sons, Inc., **2007**, pp. 74-78.
- [141] aA. M. Pizarro, A. Habtemariam, P. J. Sadler, in *Med. Organomet. Chem.*, Vol. 32, Springer-Verlag, **2010**, pp. 21-56; bS. J. Dougan, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 10882-10894.
- [142] E. Galardon, H. Daguet, P. Deschamps, P. Roussel, A. Tomas, I. Artaud, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 2817-2821.
- [143] aH. Petzold, J. Xu, P. J. Sadler, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 3008-3011; bH. Chen, J. A. Parkinson, S. Parsons, R. A. Coxall, R. O. Gould, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3064-3082.
- [144] R. Ziessel, C. Stroh, *Synthesis-Stuttgart* **2003**, 2145-2154.
- [145] E. Szajna, M. M. Makowska-Grzyska, C. C. Wasden, A. M. Arif, L. M. Berreau, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7595-7605.
- [146] aJ. D. More, N. S. Finney, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3001-3003; bH. R. F. Karabulut, M. Kacan, H. Ozyildirim, *Turkish J. Chem.* **2003**, *27*, 713-716.
- [147] A. Basnet, P. Thapa, R. Karki, Y. Na, Y. Jahng, B. S. Jeong, T. C. Jeong, C. S. Lee, E. S. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4351-4359.
- [148] R. K. Sharma, *Stereochemistry*, Discovery Publishing House Pvt. Limited, **2008**.
- [149] aG. Lem, N. A. Kaprinidis, D. I. Schuster, N. D. Ghatlia, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7009-7010; bH. Ziffer, B. W. Matthews, *J. Chem. Soc. D: Chem. Commun.* **1970**, 294-294; cD. I. Schuster, G. Lem, N. A. Kaprinidis, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 3-22; dP. E. Eaton, *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 50-57.
- [150] N. J. Curtis, G. A. Lawrance, P. A. Lay, A. M. Sargeson, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 484-488.
- [151] aD. Sellman, P. Lechner, F. Knoch, M. Moll, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1991**, *30*, 552-553; bD. C. Mudalige, E. S. Ma, S. J. Rettig, B. R. James, W. R. Cullen, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 5426-5427; cE. S. F. Ma, S. J. Rettig, B. O.

- Patrick, B. R. James, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 5427-5434; dS. L. Chatwin, R. A. Diggle, R. F. R. Jazzar, S. A. Macgregor, M. F. Mahon, M. K. Whittlesey, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 7695-7697; eD. Sellmann, P. Lechner, F. Knoch, M. Moll, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 922-930; fE. S. F. Ma, S. J. Rettig, B. R. James, *Chem. Commun.* **1999**, 2463-2464.
- [152] B. C. Wiegand, C. M. Friend, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 491-504.
- [153] aB. R. James, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 2213-2220; bS. Kuwata, M. Hidai, *Coordin. Chem. Rev.* **2001**, *213*, 211-305.
- [154] R. Hille, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2757-2816.
- [155] aS. C. Lee, R. H. Holm, *Chem. Rev.* **2003**, *104*, 1135-1158; bl. Dance, *Chem. Commun.* **1997**, 165-166.
- [156] aS. H. Knauer, W. Buckel, H. Dobbek, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4342-4347; bF. Forouhar, S. Arragain, M. Atta, S. Gambarelli, J. M. Mouesca, M. Hussain, R. Xiao, S. Kieffer-Jaquinod, J. Seetharaman, T. B. Acton, G. T. Montelione, E. Mulliez, J. F. Hunt, M. Fontecave, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 333-338.
- [157] P. Venkateswara Rao, R. H. Holm, *Chem. Rev.* **2003**, *104*, 527-560.
- [158] D. R. English, D. N. Hendrickson, K. S. Suslick, C. W. Eigenbrot, W. R. Scheidt, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7258-7259.
- [159] J. W. Pavlik, B. C. Noll, A. G. Oliver, C. E. Schulz, W. R. Scheidt, *Inorg. Chem.* **2009**, *49*, 1017-1026.
- [160] M. Martinho, F. Banse, J. Sainton, C. Philouze, R. Guillot, G. Blain, P. Dorlet, S. Lecomte, J.-J. Girerd, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 1709-1717.
- [161] A. S. Borovik, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *38*, 54-61.
- [162] M. Alimi, *Thèse* **2012**.
- [163] H. S. Soo, A. C. Komor, A. T. Iavarone, C. J. Chang, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 10024-10035.
- [164] E. Galardon, T. Roger, P. Deschamps, P. Roussel, A. Tomas, I. Artaud, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 10068-10070.
- [165] aK. L. Haas, K. J. Franz, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4921-4960; bA. Janczyk, A. Wolnicka-Glubisz, A. Chmura, M. Elas, Z. Matuszak, G. Stochel, K. Urbanska, *Nitric Oxide* **2004**, *10*, 42-50.
- [166] E. Galardon, A. Tomas, P. Roussel, I. Artaud, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, *2011*, 3797-3801.
- [167] J. C. Mareque-Rivas, R. Torres Martin de Rosales, S. Parsons, *Chem. Commun.* **2004**, 610-611.
- [168] J. C. Mareque-Rivas, R. Prabakaran, R. T. Martin de Rosales, *Chem. Commun.* **2004**, 76-77.
- [169] J. C. M. Rivas, R. Prabakaran, R. T. M. de Rosales, L. Metteau, S. Parsons, *Dalton Trans.* **2004**, 2800-2807.
- [170] aR. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1997**, *389*, 52-54; bN. E. Heimer, L. Field, R. A. Neal, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1374-1377; cW. J. Hagan, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 383-387.
- [171] T. Roger, F. Raynaud, F. Bouillaud, C. Ransy, S. Simonet, C. Crespo, M.-P. Bourguignon, N. Villeneuve, J.-P. Vilaine, I. Artaud, E. Galardon, *ChemBioChem* **2013**, DOI 10.1002/cbic.201300552.
- [172] M. Wood, M. Whiteman, A. Perry, *Vol. WO/2013/045951*, The University of Exeter, UK., **2013**, pp. 86, WO/2013/045951.

- [173] R. E. Morris, R. E. Aird, P. del Socorro Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3616-3621.
- [174] X. S. Zeng, D. Coquiere, A. Alenda, E. Garrier, T. Prange, Y. Li, O. Reinaud, I. Jabin, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6393-6402.

RESUME

Après avoir été considéré pendant des années comme un polluant environnemental, il a récemment été mis en évidence que le sulfure d'hydrogène est le troisième transmetteur gazeux, aux côtés des monoxydes d'azote et de carbone.

Dans ce travail de thèse, deux types d'outils moléculaires ont été visés :

a) Des sondes fluorescentes pour détecter H_2S , basées sur une utilisation originale de la chimie de coordination cherchant à favoriser l'attaque du sulfure d'hydrogène sur le ligand plutôt que sur le métal. Malgré leur forte réponse à H_2S en solution tampon, celles-ci ne se sont malheureusement pas révélées sélectives vis-à-vis d'autres thiols biologiques.

b) Des donneurs lents de sulfure d'hydrogène. Les premiers composés développés, basée sur la chimie de coordination, se comportent malheureusement comme des donneurs rapides. Par contre, la seconde famille, constituée de molécules organiques, s'est révélée être un excellent substitut des sels d' H_2S couramment utilisés dans les études biologiques malgré leurs effets indésirables.

De plus, nous avons aussi répondu à un défi synthétique en obtenant le premier complexe $Fe-SH$ comportant un ligand hydrosulfure impliqué dans une liaison hydrogène, telle que celle trouvée dans les hémoglobines des bactéries *Bacillus subtilis* et *Thermobifida fusca*.

Mots-clefs : chimie de coordination, fer, sulfure d'hydrogène, sonde fluorescente, donneurs lents.