

LE MONOXYDE D'AZOTE

Francis Crépel
Geneviève Lemaire

Consacrée molécule de l'année en 1992 aux États-Unis, où en est-on aujourd'hui avec cette molécule à la fois simple et complexe qu'est le monoxyde d'azote (NO) ? Simple, le NO l'est certainement puisque c'est un gaz qui, à l'état dissous, peut aisément franchir les membranes biologiques et donc diffuser librement d'une cellule à l'autre, constituant ainsi le messenger paracrine idéal. Complexe, le NO l'est aussi sûrement puisque son électron célibataire en fait un radical extrêmement réactif dont la chimie reste encore mal comprise par bien des aspects, notamment lorsqu'il est en solution aqueuse, ce qui est bien sûr le cas des systèmes biologiques. Complexe, le NO l'est, enfin, par l'ubiquité de ses effets, puisqu'il peut être impliqué dans des processus aussi différents que la réponse immunitaire à une agression microbienne, les processus inflammatoires (voir l'article de N. Dugas *et al.*, p. 1653 de ce numéro), le choc septique, la mort neuronale au cours de l'ischémie, certains mécanismes cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire, et enfin de l'érection, pour finir sur deux rôles, somme toute positifs, du NO (*m/s n° 8, vol. 8, p. 844*).

Dans le cadre de cet éditorial, il est bien sûr impossible de faire un point exhaustif sur toutes les recherches menées actuellement sur le NO dans le monde entier. Nous nous limiterons donc aux études concernant le

système nerveux et le système immunitaire puisque, en particulier dans le cas du système nerveux, de nombreuses controverses subsistent encore quant aux possibles rôles du NO. Il convient toutefois de rappeler que l'histoire du NO comme messenger biologique a commencé dans le système vasculaire, avec les travaux de R. Furchgott et J. Zawadzki en 1980 à New York, lorsque ces auteurs ont montré que l'action vasodilatatrice de l'acétylcholine sur les vaisseaux requiert la libération, par les cellules endothéliales qui tapissent ces vaisseaux, d'un facteur myorelaxant. Celui-ci, baptisé EDRF (*endothelial-derived relaxing factor*), agit sur les muscles lisses en activant une enzyme, la guanylyl cyclase soluble, induisant ainsi une augmentation de la concentration intracellulaire de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (*m/s n° 10, vol. 7, p. 1094*). Cette molécule sert à son tour de second messenger diffusant à l'intérieur de la cellule le message extérieur apporté par le facteur relaxant. En 1987, l'EDRF a été identifié par l'équipe de S. Moncada des laboratoires Wellcome (Grande-Bretagne) comme étant le NO (pour référence voir [1]).

NO et système nerveux

En ce qui concerne le système nerveux central, l'idée que ce gaz pourrait être un messenger intercellulaire revient à J. Garthwaite, alors à l'université de Liverpool (Grande-Bre-

ADRESSE

F. Crépel : professeur. G. Lemaire : professeur.
Laboratoire de neurobiologie, Cnrs et université Paris-Sud, bâtiment 440, 91405 Orsay Cedex, France.

tagne), lorsqu'il montra en 1988 que la stimulation de neurones du cervelet par des acides aminés excitateurs comme le glutamate conduit effectivement à la production d'une substance ayant toutes les propriétés du NO, y compris celle de conduire à l'activation de la guanylyl cyclase soluble. Le NO est formé par une enzyme dépendante du calcium, la NO-synthase (NOS), à partir d'un précurseur banal, la L-arginine, qui est alors converti en citrulline et NO en présence d'oxygène et de NADPH. Il montre, enfin, qu'une catégorie particulière de récepteurs du glutamate – les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) – est impliquée dans l'activation de la NOS. En 1990, l'équipe de S. Snyder, à l'université Johns Hopkins de Baltimore (USA), parvient à fabriquer des anticorps dirigés contre l'enzyme, et cette même équipe clone le gène correspondant en 1991. Par immunocytochimie et hybridation *in situ*, il est alors possible de réaliser une cartographie de la localisation de la NOS dans le système nerveux. Il apparaît que l'enzyme semble localisée uniquement dans les neurones, ce qui la fait appeler NOS neuronale (*m/s n° 8, vol. 8, p. 844*) (pour référence voir [1]). En fait, on sait maintenant que les NOS des cellules immunitaires et des cellules endothéliales sont différentes. En particulier, la NOS des cellules immunitaires doit être induite par des cytokines pour être synthétisée, ce qui a conduit à l'appeler NOS inductible, par opposition aux NOS neuronale et endothéliale qui, elles, sont constitutives. La situation est compliquée par la découverte récente de la présence de NOS « endothéliale » dans certains neurones de l'hippocampe [2], et de NOS inductible dans certaines cellules gliales du système nerveux central. Pour cette raison, les NOS neuronales, inductibles et endothéliales sont désormais souvent simplement appelées respectivement NOS I, II, et III.

Pour s'en tenir aux points suscitant encore des controverses majeures, nous aborderons successivement le problème de la régulation de la production de NO par les neurones, le problème du rôle du NO dans la mort neuronale, et celui de son rôle dans la plasticité synaptique.

En 1992, l'équipe de J. Bockaert (Cnrs, Montpellier, France) montrait pour la première fois que le NO bloque sélectivement les récepteurs NMDA qui, rappelons-le, sont responsables de la production de NO dans les neurones lorsqu'ils sont activés par le glutamate [3]. Cette rétroaction négative peut donc empêcher une surproduction de NO et ses effets délétères dont nous reparlerons ci-après. Si cet effet a été retrouvé par plusieurs groupes, le mécanisme sous-jacent, en revanche, reste controversé. Le NO peut, en effet, exister sous forme réduite (NO^-) ou oxydée (NO^+). Par ailleurs, le récepteur NMDA comporte plusieurs sites redox, dont l'oxydation conduit à une réduction des courants traversant les canaux ioniques couplés à ce récepteur, alors que leur réduction conduit à l'effet inverse. Pour Stuart Lipton et son groupe aux États-Unis, NO^+ induirait une nitrosylation des résidus thiol du récepteur NMDA, conduisant secondairement à la formation de ponts disulfures, et donc à la réduction des courants traversant les canaux ioniques couplés à ce récepteur. Le NO^- aurait, bien sûr, l'effet inverse, et on aurait donc là l'explication des effets neuroprotecteurs ou au contraire neurotoxiques attribués au NO dans le système nerveux central [4]. Cependant, les résultats expérimentaux obtenus par J. Bockaert et L. Fagny plaident pour un tout autre mécanisme puisque, pour ces auteurs, le NO agirait comme un modulateur allostérique du récepteur NMDA, en facilitant à la fois le blocage dépendant du potentiel et le blocage indépendant du potentiel de ces récepteurs par les cations divalents.

En ce qui concerne le deuxième point, on sait que la stimulation excessive des récepteurs NMDA par le glutamate peut causer une mort neuronale, un phénomène (excitotoxicité) qui peut jouer un rôle majeur dans plusieurs maladies neurodégénératives, ainsi qu'en cas d'ischémie cérébrale. Or, on sait également que le NO, outre ses effets sur les récepteurs NMDA, peut conduire en solution aqueuse à la production de peroxy-nitrite (ONOO^-) et de radicaux hydroxyl (OH^*), deux sub-

stances extrêmement toxiques pour les cellules. Ces considérations ont donc conduit à l'idée qu'en partie au moins l'excitotoxicité du glutamate pourrait être due à la production de NO. De fait, certains auteurs comme le groupe de V.L. Dawson et T.M. Dawson à l'université Johns Hopkins de Baltimore ont pu montrer qu'en culture, les neurones sont protégés de la mort neuronale par excitotoxicité par application d'inhibiteurs de NOS. De même, *in vivo*, de faibles doses d'inhibiteurs de NOS sont capables de réduire la taille de l'infarctus cérébral dans des modèles animaux d'ischémie focale (voir [5] pour revue). Cependant, d'autres auteurs comme J. Garthwaite n'ont pas retrouvé cet effet neuroprotecteur des inhibiteurs de NOS dans d'autres modèles, encore qu'au dernier congrès de l'IBRO (*international brain research organization*) en juillet 1995 à Kyoto, ce dernier auteur semble maintenant reconnaître que l'excitotoxicité du glutamate pourrait, pour partie, dépendre du NO et pour le reste en être indépendante. Les points de vue sont donc en train de se rapprocher...

Il pourrait bien en être de même pour le rôle du NO dans la plasticité synaptique. C'est aux groupes de M. Ito au Japon et de F. Crépel à l'université Paris-Sud à Orsay qu'il revient d'avoir présenté pour la première fois, en 1990, des preuves expérimentales du rôle du NO dans la dépression synaptique à long terme (DLT) du cervelet, une forme de plasticité synaptique pouvant sous-tendre les apprentissages moteurs cérébelleux (réf. dans [6]). De même, il revient à l'équipe d'A. Böhme (Rhône-Poulenc, France) d'avoir montré pour la première fois en 1991 que le NO pourrait être impliqué dans la potentialisation à long terme (PLT) des synapses excitatrices de l'hippocampe [7]. Pour ces deux modèles de plasticité synaptique, le rôle du NO est resté controversé jusqu'à ce jour. Ainsi, dans le cas de la DLT du cervelet, D. Linden et J. Connor, au Roche Institute of Nutley (USA), ne voient pas d'effet du NO dans l'induction de la DLT. Il faut cependant souligner que leurs études sont effectuées sur cultures

dissociées de neurones cérébelleux, alors que les études des groupes de M. Ito et de F. Crépel sont réalisées sur des neurones cérébelleux *in situ*. De même, dans le cas de la PLT, si les résultats d'A. Böhme ont été retrouvés et approfondis par plusieurs équipes américaines, dont celles d'E. Kandel et de D. Madison, ils n'ont, en revanche, pas été confirmés par plusieurs autres groupes, notamment au Royaume-Uni, comme les équipes de G. Collingridge, de T. Bliss, et de J. Garthwaite [1]. Il semblerait donc que les rats anglais aient délaissé le NO au cours de leur évolution insulaire, contrairement aux rats français et américains. Signaux toutefois qu'au congrès de l'IBRO mentionné précédemment, J. Garthwaite a rejoint le clan des « amis du NO », puisqu'il reconnaît maintenant que le NO joue bien un rôle à la fois dans la DLT du cervelet, et dans la PLT de l'hippocampe. De même, T. Bliss concède un rôle au NO dans la PLT chez le jeune rat, à condition que les expériences (*in vitro*) soient effectuées à 24 °C ! Là encore, il n'est pas impossible que les points de vue continuent à se rapprocher au cours des prochaines années...

NO et système immunitaire

Les cellules dans lesquelles la NO synthase de type II peut être induite par des cytokines et des micro-organismes émettent de façon continue et soutenue du monoxyde d'azote. Le flux de NO ainsi produit exerce dans la cellule émettrice et dans son environnement une action antivirale, antibactérienne et antiparasitaire. Au voisinage de la cellule productrice, ce flux est suffisant pour bloquer la prolifération de cellules tumorales mais aussi de lymphocytes T activés. Avec la découverte des NO synthases inductibles s'est en quelque sorte achevée la description du phénomène d'activation des macrophages mis en évidence par Mackaness dans les années 1960. L'action antimicrobienne et antitumorale non spécifique des macrophages activés ainsi que leur action immunosuppressive s'expliqueraient

maintenant ainsi : l'interféron γ et la phagocytose d'un agent infectieux induisent l'expression de la NO synthase qui, tant que de l'arginine est disponible, produit du NO. NO diffuse pour atteindre des cibles moléculaires privilégiées comme la ribonucléotide réductase, l'aconitase, les complexes I et II de la chaîne respiratoire, dont l'inhibition entraîne l'arrêt de la multiplication et la mort cellulaire.

Tout a-t-il été dit ? Jusqu'en 1993, les études sur l'action antiproliférative de NO avaient été conduites *in vitro*. Ces deux dernières années, par l'administration aux animaux d'inhibiteurs de NO synthase et par le dosage des nitrates sériques ou urinaires, il a été montré que l'expression de la NO synthase de type II et une forte production de NO accompagnent le développement d'infections par des parasites à développement intracellulaire [8]. L'inhibition de la NO synthase ou sa faible activation chez certaines souches d'animaux est parallèle à une exacerbation de l'infection. Des protocoles voisins ont permis de proposer un rôle important de la NO synthase inductible dans le développement de réactions inflammatoires, de réactions auto-immunes [9] et dans le phénomène de réaction du greffon contre l'hôte (GvH).

Puisque NO agit sur des cibles intracellulaires présentes dans toutes les cellules, il est évident que son action peut être bénéfique ou néfaste, suivant la cellule touchée (*voir* l'article de C. Thiemermann, p. 1643 de ce numéro). Dans un même modèle d'infection, la production de NO pourrait, selon le moment plus ou moins précoce de son déclenchement, soit contribuer directement à l'élimination du parasite, soit favoriser sa multiplication par un effet immunosuppresseur sur les lymphocytes T. De même, si une forte production de NO exerce un effet cytotoxique antitumoral, une production plus faible favoriserait *in vivo* la croissance tumorale par un effet positif sur la vascularisation [10]. Le bilan des actions *in vivo* du NO produit par la NO synthase inductible est donc loin d'être achevé.

Des controverses persistent aussi sur

la forme « active » de NO : NO[•], NO⁺, NO⁻, ou des dérivés comme des nitrosothiols... Quelle est la place à conserver à d'autres mécanismes antiprolifératifs anciennement décrits : dérivés activés de l'oxygène, dégradation du tryptophane... Y a-t-il coopération avec, par exemple, production de dérivés plus toxiques comme le peroxy-nitrite, ou incompatibilité, puisque NO peut inhiber les enzymes à hème que sont la NADPH oxydase et l'indolamine dioxygénase ? Une dernière question, peut-être la plus lancinante. Les macrophages humains sont-ils capables, à l'image des macrophages murins, de produire de fortes quantités de NO ? De très nombreuses équipes ont accumulé dans ce domaine des résultats négatifs ; la polémique est relancée par la description d'un système entièrement original d'induction (*voir* l'article de N. Dugas *et al.*, p. 1653 de ce numéro).

Si la production de NO par les macrophages humains s'avère faible ou non dépendante de l'interféron γ , il restera à expliquer la très nette stimulation des capacités antimicrobiennes des macrophages humains lors de leur « activation » par l'interféron γ . Les hépatocytes murins et humains possèdent une NO synthase inductible qui pourrait participer aux réactions de l'hôte contre le plasmodium [11]. Comment peut-on alors interpréter la capacité des formes érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* de produire du NO et un facteur susceptible d'induire une activité NO synthase dans les cellules endothéliales [12] ? Pour les trois types de NO synthases, il existe maintenant des souris chez lesquelles le gène codant a été inactivé [13] (*voir* la nouvelle de A. Mignon et E. Bursaux, p. 1743 de ce numéro) : ces modèles devraient permettre de préciser la contribution de chaque enzyme et de mettre en évidence d'éventuels phénomènes de redondance et de compensation ■

RÉFÉRENCES

1. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995 ; 57 : 683-706.

-
2. Dinerman JL, Dawson T, Schell MJ, Snowman A, Snyder S. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells : implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 4214-8.
 3. Manzoni O, Prézeau L, Marin P, Deshager S, Bockaert J, Fagni L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron* 1992 ; 8 : 653-62.
 4. Lipton S, Stamle JS. Action of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor. *Neuropharmacology* 1994 ; 33 : 1229-34.
 5. Dawson TM, Snyder S. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbone monoxide in the brain. *J Neurosci* 1994 ; 14 : 5147-59.
 6. Crepel F, Audinat E, Daniel H, Hemart N, Jaillard D, Rossier J. Cellular locus of nitric oxide synthase involved in cerebellar long-term depression induced by high external potassium concentration. *Neuropharmacology* 1994 ; 33 : 1399-405.
 7. Böhme GA, Christelle B, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 1991 ; 399 : 379-81.
 8. Evans TG, Thai L, Granger D, Hibbs JB. Effects of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol* 1993 ; 151 : 907.
 9. Corbett JA, McDaniel ML. Intra-islet release of interleukin 1 inhibits β cell function by inducing β cell expression of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995 ; 181 : 559.
 10. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis P, Rhodes SA, Westmore K, Emson PC, Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 4392.
 11. Mellouk S, Hoffman SL, Liu ZZ, de la Vega P, Billiar TR, Nussler AK. Nitric oxide-mediated antiplasmodial activity in human and murine hepatocytes induced by gamma interferon and the parasite itself : enhancement by exogenous tetrahydrobiopterin. *Infect Immun* 1994 ; 62 : 4043.
 12. Ghigo D, Todde R, Ginsburg H, Costamagna C, Gautret P, Bussolino F, Ulliers D, Garibaldi G, Deharo E, Gabrielli G, Pescarmora G, Bosia A. Erythrocytes stages of *Plasmodium falciparum* exhibit a high nitric oxide synthase (NOS) activity and release an NO-inducing soluble factor. *J Exp Med* 1995 ; 182 : 677.
 13. Snyder SH. No endothelial NO. *Nature* 1995 ; 377 : 196.

TIRÉS A PART

F. Crépel.