m/s SYNTHÈSE

médecine/sciences 1995 ; 11 : 1643-51

Inhibition des NO synthases dans la défaillance circulatoire : effet bénéfique ou délétère ?

Christoph Thiemermann

Le monoxyde d'azote (NO) est produit, à partir de la L-arginine, par une famille d'enzymes, les NO synthases (NOS). Elles sont, soit constitutives comme les NOS endothéliales (eNOS) et neuronales (nNOS), soit inductibles (NOSi), synthétisées uniquement après stimulation par les cytokines. Produit en grande quantité par les NOSi du macrophage activé, NO est l'un des agents de la bactéricidie. Mais cette surproduction de NO pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la défaillance circulatoire du choc septique et, en outre, gêner l'extraction tissulaire de l'oxygène. L'inhibition non sélective des NOS corrige partiellement l'hypotension et l'hyporéactivité vasculaire liées à l'action des NOSi ; cependant, l'inhibition parallèle des eNOS, qui jouent un rôle majeur dans la vasodilatation locale, est délétère. L'utilisation couplée d'inhibiteurs non sélectifs des NOS et de l'inhalation de NO sous forme gazeuse, ou l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des NOSi comme l'aminoguanidine ou des dérivés isothio-urée, sont proposées.

Le monoxyde d'azote (NO) est un autacoïde de découverte récente, produit par une voie enzymatique mise en évidence dans de nombreuses cellules de mammifères. Il n'est donc pas étonnant que le NO possède de nombreuses fonctions biologiques, dans des domaines aussi variés que le système cardiovasculaire, le système nerveux ou la réponse immunitaire (*voir* [1] pour une revue complète). L'activité biologique du NO a été décrite pour la première fois par Furchgott et Zawadski en 1980 comme un facteur labile, vasodilatateur, sécrété par les cellules endothéliales en réponse à l'acétylcholine (mais aussi à d'autres vasodilatateurs dépendants de l'endothélium) et dès lors appelé *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) [2]. Nous savons aujourd'hui que la formation du NO par l'endothélium vasculaire est responsable des activités biologiques de l'EDRF [3-6]. NO est produit à partir

ADRESSE

C. Thiemermann : *professeur de pharmacologie.* The William Harvey Research Institute, St. Bartholomew's Hospital, Medical College, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, Royaume-Uni.

du groupement guanidine de la L-arginine par une famille d'enzymes, les NO synthases (NOS). Une fois produit, NO diffuse vers les cellules adjacentes et active la guanylyl cyclase soluble en se liant au fer de son groupement héminique. L'augmentation du GMPc est responsable de la majorité (mais pas de la totalité) des activités biologiques du NO [1].

Trois différentes isoformes des NOS ont été isolées. Leurs ADNc ont été clonés, séquencés et synthétisés [1, 7, 8]. Les NOS endothéliales (eNOS) et neuronales (nNOS) sont produites de façon constitutive dans les cellules et leur activation nécessite une augmentation du calcium intracellulaire. Dans les conditions physiologiques, le NO produit en continu par les eNOS, activées essentiellement par les forces de cisaillement, entraîne une vasodilatation locale. Parallèlement aux catécholamines vasoconstrictrices, il participe à la régulation du diamètre de la lumière vasculaire, des débits loco-régionaux et de la pression artérielle. En outre, NO inhibe l'adhérence des plaquettes et des polynucléaires à l'endothélium vasculaire [1].

L'activation des macrophages (ou de divers types cellulaires) par les cytokines ou les endotoxines bactériennes entraîne la synthèse d'une NOS « inductible » (NOSi) dont l'activité est indépendante d'une élévation du calcium intracellulaire. L'activation du système des NOSi s'accompagne de la production de grandes quantités de NO. Dans le cas des macrophages, cette production accrue de NO est un facteur important dans les mécanismes de défense de l'hôte puisque le NO est impliqué dans la bactéricidie et dans la lyse des cellules tumorales. Contrairement aux NOS constitutives (eNOS ou nNOS), la biodisponibilité de la L-arginine peut devenir un facteur limitant de la production de NO par les NOSi [1, 7-10].

Au cours de cette revue, nous aborderons les trois points suivants : tout d'abord souligner l'importance de la surproduction de NO dans la physiopathologie du choc septique ou des autres formes de défaillance circulatoire ; discuter ensuite brièvement les mécanismes de l'induction des NOSi et leur régulation ; enfin, proposer de nouvelles approches thérapeutiques, fondées sur la modulation de la synthèse du NO, et visant à améliorer les conditions hémodynamiques et la survie au cours des défaillances circulatoires.

Rôle du NO dans la physiopathologie du choc septique

La défaillance circulatoire associée au choc est caractérisée par une hypotension importante (avec vasodilatation périphérique), une hyporéactivité vasculaire aux vasoconstricteurs endogènes ou exogènes, un dysfonctionnement myocardique, une mauvaise répartition des débits régionaux et un trouble de l'extraction de l'oxygène conduisant à la défaillance multiviscérale puis au décès. Il apparaît maintenant qu'une surproduction de NO est impliquée dans la physiopathologie du choc septique. Ainsi, l'hypotension artérielle rencontrée dans divers modèles animaux de choc septique est liée, du moins en partie, à la surproduction de NO, secondaire d'abord à une activation des eNOS (phase aiguë du choc), et plus encore à l'expression dans la paroi artérielle de NOSi [9, 10].

L'insensibilité des artères périphériques aux vasoconstricteurs, et en particulier à la noradrénaline, rencontrée dans les chocs septiques est responsable de la résistance aux agents vasoactifs et rend le traitement des défaillances circulatoires particulièrement difficile. Une production accrue de NO, secondaire à l'induction de NOSi dans les cellules musculaires lisses, a pu être impliquée dans l'hyporéactivité aux catécholamines (ou aux autres agents vasoconstricteurs) observée sur des vaisseaux provenant d'animaux soumis à un choc septique [11] ou hémorragique [12]. Dans les modèles animaux de choc septique, l'hyporéactivité vasculaire (relayée par NO) affecte la conductance et la résistance artérielle, mais aussi le système veineux. Une défaillance circulatoire prolongée entraîne une baisse de la contractilité cardiaque (dysfonctionnement myocardique) puis une baisse du débit cardiaque. Les cytokines (TNF et IL1) diminuent la contractilité des cardiomyocytes de rat [13] et du muscle papillaire de hamster [14] ; à l'inverse, l'inhibition

RÉFÉRENCES

1. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 2002-12.

2. Furgchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 ; 288 : 373-6.

3. Palmer RMJ, Ferridge AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 ; 327 : 524-6.

4. Ignarro LJ, Buja GM, Wood KS, Byrns RE, Chadhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 9265-9.

5. Michel J, Arnal J. Monoxyde d'azote et hypertension artérielle. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 1061-7.

6. Corvol P. L'endothélium, plaque tournante de la vasomotricité et de la trophicité de la paroi artérielle. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 1031-3.

7. Dinermann JL, Lowenstein CJ, Snyder SH. Molecular mechanisms of nitric oxide production. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res* 1993 ; 73 : 217-22.

8. Morris SM, Billiar TR. New insight into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1994 ; 266 : E829-39.

9. Thiemermann C. The role of the L-arginine : nitric oxide pathway in circulatory shock. *Adv Pharmacol* 1994 ; 28 : 45-79.

10. Szabo C, Thiemermann C. Regulation of the expression of the inducible isoforme of nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol* 1995 ; 34 : 113-54.

11. Julou-Schaefer G, Gray GA, Fleming I, Qchott C, Parratt JR, Stoclet JC. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves the L-arginine pathway. *Am J Physiol* 1990 ; 259 : H1038-43.

des NOS entraîne un effet inotrope positif sur les cardiomyocytes prétraités par TNF [14] ou provenant d'animaux en état de choc septique [15]. Dans ces conditions, il est possible qu'une production accrue de NO par les NOSi soit partiellement responsable du dysfonctionnement myocardique au cours du choc septique. Toutefois, aucune étude n'a encore été réalisée *in vivo* concernant l'effet de l'administration systémique d'inhibiteur des NOS sur la contractilité et le débit cardiaque d'animaux soumis à un choc septique.

Une diminution de l'extraction de l'oxygène par les tissus avec augmentation de la concentration veineuse en oxygène est une autre caractéristique de la défaillance circulatoire. Il est maintenant bien établi que l'abondante production locale de NO entraîne une inhibition de la respiration mitochondriale (comme dans les hépatocytes ou les cellules musculaires lisses). Cet effet autocrine est secondaire à l'inhibition par NO de plusieurs enzymes de la chaîne respiratoire (aconitase, NADH-ubiquinone réductase, succinate-ubiquinone oxydo-réductase) [7]. Il en résulte une diversion du métabolisme du glucose qui, d'aérobie, devient anaérobie avec accumulation de lactate. Par ailleurs, NO, présent dans les capillaires en forte concentration, peut réagir avec l'oxygène, qui diffuse normalement des érythrocytes vers les mitochondries des cellules adjacentes, former des nitrites et nitrates et agir ainsi comme un piège pour l'oxygène [16]. Au total, la surproduction de NO peut entraîner: (1) une inadéquation des débits régionaux (réduction de l'apport en oxygène); (2) une gêne à l'extraction de l'oxygène; (3) une inhibition de la respiration cellulaire. Associés au collapsus (et à la diminution de la perfusion tissulaire), ces effets peuvent grandement amplifier l'ischémie tissulaire et participer au développement du syndrome de défaillance multiviscérale.

Un état de choc prolongé (septique ou hémorragique) entraîne un dysfonctionnement endothélial, comme en témoigne l'altération de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium. Il semble que ce dysfonctionnement endothélial soit en partie secondaire à une diminution de la production de NO par les eNOS due à: (1) une régulation négative des eNOS par le TNF et les autres cytokines; (2) des lésions des cellules endothéliales liées aux effets cytotoxiques du NO lui-même; ou (3) à l'inactivation du NO par les radicaux libres. L'importance relative de ces altérations endothéliales dans la pathogénie du syndrome de défaillance multiviscérale est encore imprécise [7, 8, 16].

L'incidence des syndromes septiques et/ou des défaillances circulatoires liés aux infections à bacilles Gram+ augmente ; ceux-ci sont maintenant reconnus comme responsables de plus de 50% des infections nosocomiales [17]. Bien que ces bactéries ne possèdent pas d'endotoxine, leur paroi est riche en peptidoglycane, acide lipoteichoïque et acide teichoïque, qui peuvent entraîner un choc septique. L'acide lipoteichoïque peut induire l'expression des NOSi aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [18, 19] et le peptidoglycane et l'acide teichoïque agissent en synergie pour entraîner: (1) la production de cytokines pro-inflammatoires; (2) l'induction des NOSi *in vitro* et *in vivo*; et (3) un choc et une défaillance multiviscérale [20]. Il est donc probable que l'induction des NOSi par des toxines ou des fragments de la paroi bactérienne contribue à la physiopathologie du choc à bacilles Gram+.

Comme dans le choc endotoxémique, une formation accrue de NO (secondaire à l'induction de NOSi) joue un rôle important dans la défaillance circulatoire associée au choc hémorragique [13]. Cette formation accrue de NO est impliquée dans la décompensation tardive et la constitution de l'hyporéactivité vasculaire observées chez le rat après un choc hémorragique prolongé [12]. Par ailleurs, l'hypotension associée au traitement par l'interleukine 2 [21] de patients présentant un adénocarcinome rénal ou un mélanome est due à une formation accrue de NO par les NOSi. Un rôle du NO a été aussi évoqué pour expliquer les manifestations hémodynamiques du cirrhotique, caractérisées par une hypotension, des résistances vasculaires périphériques abaissées et une augmentation du débit cardiaque [22]. Bien qu'une augmentation des nitrites plasmatiques (métabolites du NO) ait été rapportée dans les chocs anaphylactiques, traumatiques ou thermiques (brûlés), il est encore trop tôt pour préciser la participation d'une formation de NO aux perturbations hémodynamiques associées à ces situations [16].

Régulation et expression des NOSi

La régulation de l'expression des NOSi a fait l'objet de revues récentes [6-10]. Au cours de ce paragraphe nous n'indiquerons donc que quelques éléments essentiels de cette régulation. L'induction des NOSi *in vivo* ou *in vitro* par les endotoxines est secondaire à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, principalement du TNF *(tumor necrosis factor)*, de l'interleukine 1 (IL1) et de l'interféron γ. Ces cytokines agissent, soit isolément, soit en synergie entre elles, soit encore en synergie avec le PAF *(platelet activating factor)* [23] *(figure 1)*. Les mécanismes de transduction permettant l'induction des NOSi sont encore imprécis. On peut toutefois penser que l'activation d'une tyrosine kinase et du facteur de transcription nucléaire NF-κB joue un rôle de premier plan [8, 10]. Les glucocorticoïdes endogènes préviennent activement l'induction des NOSi [10] ; en outre, la tolérance aux endotoxines, obtenue par l'exposition répétée à de faibles doses d'endotoxine, s'accompagne d'une élévation des concentrations plasmatiques de corticoïdes endogènes [24]. L'inhibition de l'expression des NOSi par les corticoïdes est dépendante de la lipocortine [25], contrairement à ce qui est observé pour la cyclo-oxygénase inductible. Les polyamines endogènes, comme la spermine, peuvent, après leur transformation en aldéhydes par une polyamine oxydase, diminuer la synthèse des NOSi induite *in vivo* par les cytokines ou les endotoxines [10, 26]. Les cytokines anti-inflammatoires comme IL4, IL10 ou IL13 inhibent la synthèse des NOSi alors que IL6 et IL8 restent sans effet [10]. Pour plus de précisions sur les mécanismes impliqués dans la régulation et/ou l'expression des NOSi, les lecteurs peuvent se reporter aux récentes revues publiées sur ce sujet [6-10].

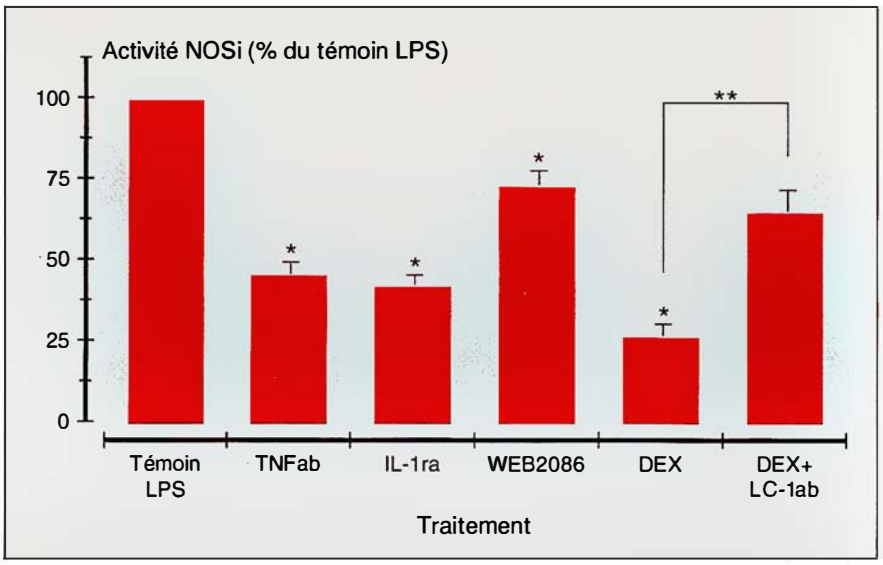

Figure 1. ***Activité de la NO synthase inductible sur des homogénats de poumon prélevés 3 heures après une injection de LPS (10 mg/kg/iv).*** *L'activité des NOSi pulmonaires est nettement diminuée par des anticorps anti-TNFα (TNFab), l'antagoniste du récepteur de l'IL1 (IL-1ra) ou du PAF (WEB2086), et par la dexaméthasone. Ces résultats montrent que le TNFα, l'IL1, et le PAF participent à l'induction des NOSi. L'inhibition de l'induction des NOSi par la dexaméthasone est diminuée en présence d'un anticorps monoclonal dirigé contre la lipocortine (LC-1ab). * p < 0,05, comparaison par rapport au groupe LPS seul; p < 0,001, comparaison entre LPS (lipopolysaccharides) + déxaméthasone et LPS + dexaméthasone + anticorps anti-lipocortine.*

Interventions thérapeutiques pour moduler la formation de NO dans le choc septique

Deux approches sont possibles pour réduire la formation de NO dans la défaillance circulatoire : soit l'inhibition de la synthèse des NOSi, soit l'inhibition de leur activité *(m/s n°2, vol. 8, p. 187)*.

Inhibition de la synthèse des NOSi

Dans les modèles animaux, l'induction des NOSi peut être prévenue par un prétraitement (avant l'injection d'endotoxine) par la dexaméthasone [25], les antagonistes du PAF [23], l'antagoniste endogène de l'IL1 [10], les anticorps anti-TNF [27], les antagonistes calciques de la famille des dihydropyridines [28], le glibenclamide [29] ou la N-acétylsérotonine [30] ; les effets bénéfiques observés sur les constantes hémodynamiques sont, du moins en partie, liés à l'inhibition de l'induction des NOSi *(figure 1)*. Il faut toutefois souligner que, pour être actifs *in vivo* sur la défaillance circulatoire et/ou l'induction des NOSi, tous ces agents doivent être administrés avant l'injection d'endotoxines. Dans les modèles animaux, ces traitements, dont le but est de contrecarrer les effets des cytokines ou d'autres médiateurs précoces produits dans les 60 à 90 premières minutes après l'injection d'endotoxine, perdent tout ou partie de leur effet bénéfique s'ils sont administrés après le début de l'hypotension ou après l'induction des NOSi.

Inhibition de l'activité des NOSi

Les premières observations rapportant un effet bénéfique de la N^G-méthyl-L-arginine (L-NMMA) sur les conditions hémodynamiques d'animaux soumis à l'injection d'endotoxine [31, 32] ont été confirmées depuis avec d'autres inhibiteurs des

RÉFÉRENCES

12. Thiemermann C, Szabo C, Mitchell JA, Vane JR. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 267-71.

13. Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a calcium-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 1992 ; 10 : 575-80.

14. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Halter BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992 ; 257 : 387-9.

15. Brady AJB, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractivity in endotoxemia. *Am J Physiol* 1992 ; 263 : H1963-6.

16. Szabo C, Thiemermann C. Invited opinion : role of nitric oxide in hemorrhagic, traumatic and anaphylactic shock and thermal injury. *Shock* 1994 ; 2 :145-55.

17. Bone R. Gram-positive organisms and sepsi. *Arch Intern Med* 1994 ; 154 : 26-34.

18. Lonchampt MO, Auget M, Delaflotte S, Goulin-Schulz J, Chabrier PE, Braquet P. Lipoteichoic acid : a new inducer of nitric oxide synthase. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992 ; S145-7.

19. De Krimpe SJ, Hunter ML, Bryant CE, Thiemermann C, Vane JR. Delayed circulatory failure due to the induction of nitric oxide synthase by lipoteichoic acid from staphylococcus aureus in anaesthetised rats. *Br J Pharmacol* 1995 ; 114 :1317-23.

20. De Krimpe SJ, Kengatharan M, Thiemermann C, Vane JR. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 (sous presse).

21. Kilbourn RG, Griffith OW. Overproduction of nitric oxide in cytokin-mediated and septic shock. *J Natl Cancer Inst* 1992 ; 84 : 827-77.

Tableau I EFFETS BÉNÉFIQUES ET DÉLÉTÈRES DU NO DANS LE CHOC SEPTIQUE	
Effets bénéfiques	**Effets délétères**
• Maintien de la perfusion tissulaire (eNOS)	• Collapsus (NOSi)
• Inhibition de l'adhérence des polynucléaires (eNOS)	• Hyporéactivité vasculaire aux agents vasoconstricteurs (NOSi)
• Inhibition de l'adhérence des plaquettes (eNOS)	• Inhibition de la respiration cellulaire • Apoptose (NOSi)
• Bactéricidie et lyse des autres agents infectieux (NOSi)	• Dysfonction myocardique (NOSi)
	• Inhibition de l'extraction tissulaire de l'oxygène (NOSi)
	• Défaillances multiviscérales (secondaires aux autres actions) (NOSi)

NOS, aussi bien sur divers modèles animaux (rat, chien, porc, mouton) que chez l'homme [9]. Cependant, l'utilisation des inhibiteurs non sélectifs des NOS dans le choc septique est limitée par le fait que ces agents inhibent aussi les eNOS et diminuent donc la production de NO par l'endothélium. Nous avons rappelé, en effet, que l'inhibition des eNOS peut entraîner une vasoconstriction excessive et une importante adhérence plaquettaire à l'endothélium vasculaire responsables d'effets secondaires. Ainsi, dans les modèles animaux de choc septique, l'utilisation d'inhibiteurs non sélectifs des NOS s'acompagne d'une incidence élevée de microthromboses vasculaires et d'une diminution du débit sanguin dans des organes vitaux comme le cœur (entraînant une diminution du débit cardiaque), le foie (augmentation de la cytolyse), le rein (thrombose) et l'intestin [33-40] *(Tableau I)*. Il n'est donc pas surprenant que de fortes doses de L-NMMA augmentent la mortalité dans un modèle de choc septique chez le lapin [33]. Malgré ces nombreux effets secondaires observés dans les modèles animaux, il faut souligner que l'administration de faibles doses d'inhibiteurs non sélectifs des NOS corrige partiellement l'hypotension et les résistances vasculaires périphériques chez des malades en état de choc septique sans aggraver la thrombopénie. Toutefois, la perfusion de L-NMMA entraîne une élévation des résistances vasculaires pulmonaires et une baisse du débit cardiaque [33]. Les effets bénéfiques et les effets secondaires des inhibiteurs non sélectifs des NOS devraient être précisés par l'étude multicentrique européenne sur l'utilisation du L-NMMA dans le choc septique.

Pour optimiser l'effet thérapeutique potentiel des inhibiteurs des NOS dans le choc septique, plusieurs approches ont été proposées: (1) utilisation couplée d'inhibiteurs non sélectifs des NOS et inhalation de mélanges gazeux contenant du NO et/ou utilisation de donneurs de NO; et (2) utilisation d'inhibiteurs sélectifs des NOSi.

Inhalation de NO

Plusieurs études ont montré que l'inhalation de mélanges gazeux contenant du NO est bénéfique chez les malades souffrant d'hypertension artérielle pulmonaire ou de syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (SDRA) *(m/s n°8, vol. 8, p. 843)* [41]. L'inhalation de NO provoque une vasodilatation sélective en regard des alvéoles bien ventilées, sans aucun effet systémique puisque NO est rapidement inactivé par l'hémoglobine. Cette vasodilatation sélective augmente le débit sanguin dans les alvéoles bien ventilées au détriment des alvéoles non ventilées et améliore le rapport ventilation/perfusion *(m/s n°5, vol. 10, p. 608)*. Par ce mécanisme, NO améliore l'efficacité du réflexe de Euler-Liljestrand*. L'inhalation de NO a aussi été proposée dans le traitement des hypertensions artérielles pulmonaires chez l'adulte ou le nouveau-né *(m/s n°8, vol. 8, p. 843)* [41, 42]. On peut donc postuler que l'inhalation de NO est indiquée, soit pour améliorer les échanges gazeux chez les patients en état de choc septique, soit, en traitement combiné, pour s'opposer à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires provoquée par les inhibiteurs non spécifiques des NOS. Ainsi, dans un modèle porcin de choc septique, l'inhalation de NO améliore l'hémodynamique pulmonaire, le débit cardiaque et les échanges gazeux. Le traitement combiné par un inhibiteur non sélectif des NOS (L-NMMA par voie systémique) et inhalation de NO a une meilleure efficacité sur les désordres hémodynamiques, les échanges gazeux et la survie des animaux [43].

Inhibition sélective des NOSi

L'inhibition de la formation du NO par l'aminoguanidine a été rapportée initialement par Misko *et al.* en 1992 [44]. L'aminoguanidine est un

* *Réflexe de vasoconstriction pulmonaire provoqué par un mélange gazeux hypoxique.*

inhibiteur plus puissant des NOSi que les analogues de la L-arginine N^G substituée. *In vitro,* la moindre activité de l'aminoguanidine sur les eNOS que sur le NOSi a été vérifiée aussi bien sur les préparations enzymatiques que sur les cultures cellulaires et les vaisseaux isolés [44, 45]. Bien que relativement spécifique des NOSi, l'aminoguanidine n'est pas très puissante. D'autres guanidines comme la 1-amino-2-hydroxy-aminoguanidine, inhibitrices aussi des NOSi, sont douées d'une activité supérieure *(Tableau II).* Malgré son activité réduite *in vitro,* une faible dose d'aminoguanidine, normalement sans effet sur la pression artérielle des rats témoins (inhibition des eNOS), prévient le développement de la défaillance circulatoire, de l'insuffisance hépatique *(figure 2)* et améliore la survie des rats soumis à un choc endotoxémique [46]. Même s'il est tentant d'attribuer l'amélioration de la survie à une inhibition sélective de l'activité des NOSi, il ne faut pas oublier que l'aminoguanidine possède de nombreuses propriétés pharmacologiques, dont celles d'inhiber la glycosylation, le métabolisme de l'histamine, le catabolisme des polyamines et l'activité de la catalase [46]. Il est donc difficile de préciser dans quelle mesure l'effet bénéfique de l'aminoguanidine sur les conditions hémodynamiques et la survie de modèles murins de choc septique serait lié à l'inhibition sélective des NOSi.

Nous avons récemment démontré que certaines isothio-urées S-substituées sont de puissants inhibiteurs des NOS; leurs diverses isoformes ont des sélectivités différentes [47]. En particulier, les S-méthyl-urée (SMT), S-(2-aminoéthyl) isothio-urée (aminoéthyl-ITU), S-éthylisothio-urée (éthyl-TU) et S-isopropylisothio-urée (isopropyl-TU) inhibent fortement l'activité des NOSi de macrophages stimulés par le LPS, avec une IC_{50}* huit à vingt-quatre fois plus faible que celle du L-NMMA et deux cents fois plus faible que celle de la N^G-nitro-L-arginine. L'inhibition des NOSi par ces dérivés S-substitués de l'urée est supprimée par un excès de L-arginine, ce qui évoque une inhi-

* *Concentration nécessaire pour inhiber de 50 % l'activité de l'enzyme.*

RÉFÉRENCES

22. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337: 776-7.

23. Szabo C, Wu CC, Mitchell JA, Gross SS, Thiemermann C, Vane JR. Platelet-activating factor contributes to the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Circ Res* 1993; 73: 991-9.

24. Szabo C, Thiemermann C, Wu CC, Perretti M, Vane JR. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance *in vivo. Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 271-5.

25. Wu CC, Croxtall JD, Perretti M, Bryant CE, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Lipocortin mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3473-7.

26. Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C, Vane JR. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites. *Br J Pharmacol* 1994; 113: 757-66.

27. Thiemermann C, Wu CC, Szabo C, Perretti M, Vane JR. Tumor necrosis factor is an endogenous mediator of the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock in the rat. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 177-82.

28. Szabo C, Mitchell JA, Gross SS, Thiemermann C, Vane JR. Nifedipine inhibits the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265: 674-80.

29. Wu CC, Thiemermann C, Vane JR. Glibenclamide-induced inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in cultured macrophages and in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 1373-81.

30. Klemm P, Hecker M, Stockhausen H, Wu CC, Thiemermann C. Inhibition by N-acetyl-5-hydroxytryptamine of nitric oxide synthase expression in cultured cells and in the anaesthetised rat. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 1175-81.

31. Thiemermann C, Vane JR. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharide in the rat. *Eur J Pharmacol* 1990; 182: 591-5.

32. Kilbourn RG, Juburan A, Gross SS, Griffith OW, Levi R, Adams J, *et al.* Reversal of endotoxin-mediated shock by Ng-monomethyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 172: 1132-8.

33. Wright CE, Rees DD, Moncada S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 48-57.

34. Petros A, Lamb G, Leone A, Moncada S, Bennett D, Vallance P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 34-9.

35. Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, West MA, Bentz BG, Simmons RL. An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis *in vitro. J Exp Med* 1989; 169: 1467-72.

36. Cobb JP, Natanson C, Hoffman WD, Lodato RF, Banks S, Koev CA, Solomon MA, Elin RJ, Hosseini JM, Danner RL. N omega-amino-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, raises vascular resistance but increases mortality rates in awake guinea-pigs challenged with endotoxin. *J Exp Med* 1992; 176: 1175-82.

37. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa J, Curran RD, Simmonds RL. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxaemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen-radical mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 390-4.

38. Shultz PJ, Raij L. Endogenously synthetized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *J Clin Invest* 1992; 90: 1718-25.

39. Hutcheson IR, Whittle BJR, Boughton-Smith NK. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 815-20.

40. Pastor C, Teisseire B, Vicaut E, Payen D. Effects of L-arginine and L-nitro-arginine treatment on blood pressure and cardiac output in rabbit endotoxin shock model. *Crit Care Med* 1994; 22: 465-9.

41. Rossaint R, Pison U, Gerlach H, Falke KJ. Inhaled nitric oxide: its effects on pulmonary circulation and airway smooth muscle cells. *Eur Heart J* 1993; 14: 133-40.

42. Kinsalla JP, Abman SH. Recent developments in the pathology and treatment of persistent hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1995; 126: 835-64.

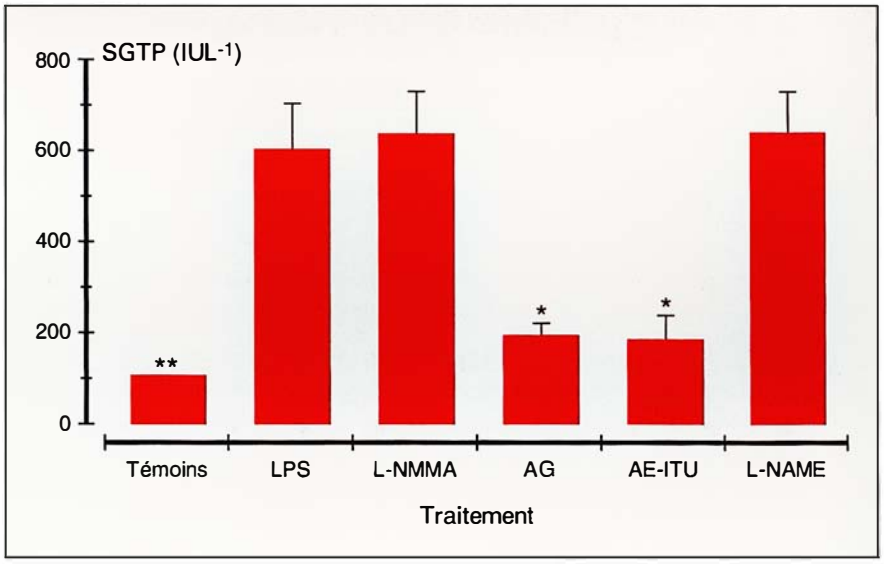

Figure 2. ***Taux plasmatiques des transaminases hépatiques (SGPT) chez des rats traités par LPS (10 mg/kg/iv) ou des animaux témoins (SGOT**).*** *L'élévation significative des SGTP indique une cytolyse hépatique. Elle est diminuée par le traitement (commencé 2 heures après l'injection de LPS) d'inhibiteurs spécifiques des NOSi comme l'aminoguanidine (AG) ou l'aminoéthylisothiourée (AE-ITU) mais n'est pas affectée par les inhibiteurs non spécifiques comme le N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) ou le N^G-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME). De la même façon, AG et AE-ITU diminuent les taux de bilirubine alors que L-NMMA et L-NAME restent sans effet. * $p < 0,005$, comparaison avec le groupe LPS (lipopolysaccharides).*

Tableau II

SÉLECTIVITÉ* DES DIFFÉRENTS INHIBITEURS DISPONIBLES DES NOS

Inhibiteur	Groupe	IC50 (mM) (NOSi murine)	Sélectivité
L-NMMA	Analogue de la L-arginine	48	eNOS > NOSI
L-NAME	Analogue de la L-arginine	> 1 000	eNOS > NOSI
S-éthyl-isothio-urée	Isothiourée	2	NOSi > eNOS[a, b]
S-méthyl-isothio-urée	Isothiourée	6	NOSi > eNOS[a, b]
S-aminoéthyl-isothio-urée	Isothiourée	3	NOSi > eNOS[a, b]
2-imino pipéridine	Amidine	10	NOSi > eNOS[a]
2-amino pyridine	Amidine	170	NOSi > eNOS[a]
Butyramidine	Amidine	60	NOSi > eNOS[a]

** Sélectivité appréciée (a) par l'augmentation de la pression artérielle chez des rats en l'absence de choc septique ou (b) par l'IC_{50} sur des eNOS bovines.*

bition compétitive au niveau du site de liaison de la L-arginine sur les NOSi. L'éthyl-TU et l'isopropyl-TU sont des inhibiteurs des eNOS *in vitro* quatre à six fois plus puissants que le L-NMMA; administrés *in vivo* chez le rat, ils ont un effet hypertenseur supérieur à celui du L-NMMA. SMT inhibe les eNOS de façon similaire au L-NMMA, alors que l'aminoéthylurée est six fois moins puissante *in vitro* et n'augmente que faiblement la pression artérielle *in vivo* (uniquement à forte dose). Ainsi, les isothiourées représentent une nouvelle classe d'inhibiteurs des NOS. La SMT et l'aminoéthyl-ITU sont les plus puissants inhibiteurs des NOSi connus jusqu'à présent et, comparés au L-NMMA, sont relativement spécifiques des NOSi [46]. Chez des rats soumis à un choc septique, la SMT corrige (plutôt que prévient) l'hypotension artérielle, suggérant que ces produits peuvent être actifs même après l'installation du choc septique [48]. En outre, administrée à des rats conscients après injection d'endotoxine, la SMT diminue la cytolyse hépatique sans aggraver l'insuffisance rénale, la thrombocytopénie ni la neutropénie [48]. Chez des rats soumis à un choc endotoxinique, l'administration continue d'aminoéthyl-ITU (commencée deux heures après l'injection d'endotoxine) prévient l'apparition des défaillances hépatique et pancréatique *(figure 2)* ainsi que de l'acidose métabolique mais reste sans effet sur l'insuffisance rénale [49].

A côté des isothio-urées, certaines amidines sont aussi de puissants inhibiteurs des NOS. Ainsi, la 2-iminopipéridine ou la butyramine sont plus puissantes que le L-NMMA sur les NOSi de macrophages ou de cellules musculaires lisses en culture [50]. Ces composés sont donc des inhibiteurs plus sélectifs des NOSi que les analogues structuraux de la L-arginine comme le L-NMMA.

L'utilisation d'inhibiteurs des NOS présentant un certain degré de sélectivité pour les NOSi comme l'aminoguanidine, la SMT ou l'aminoéthyl-ITU peut être considérée comme une étape prometteuse dans le développement d'inhibiteurs sélectifs des NOSi. De tels agents devraient certainement être de précieux outils pour préciser les rôles physiologiques (dé-

fense de l'hôte) et physiopathologiques de la production de NO par les NOSi.

Conclusion

On dispose maintenant de nombreux éléments démontrant que la surproduction de NO, liée principalement à l'induction de NOSi, contribue au développement des désordres hémodynamiques et aux atteintes multiviscérales secondaires à un choc septique ou à d'autres types de défaillance circulatoire dans les modèles animaux. Bien que les inhibiteurs non sélectifs des NOS puissent avoir des effets bénéfiques dans les modèles animaux et chez des patients en état de choc septique, ils présentent de nombreux effets secondaires liés à l'inhibition des eNOS. Le récent développement d'animaux transgéniques déficients en NOSi (souris au gène *NOSi* invalidé) *(voir nouvelle, p. 1743 de ce numéro)* devrait permettre une meilleure approche du rôle physiologique et physiopathologique des NOSi [51, 52]. Par exemple, l'équipe de MacMicking démontre que de telles souris sont incapables d'empêcher la réplication de *Listeria monocytogenes in vivo* ou dans des cellules lymphomateuses *in vitro*. En revanche, l'hypotension et la mortalité secondaires à un choc endotoxinique sont réduites chez ces animaux alors même que l'atteinte hépatique est inchangée [52]. Dans une autre étude, Wei *et al.* montrent que les souris déficientes en NOSi sont plus résistantes au choc septique (diminution de la mortalité), mais présentent une réponse diminuée à une stimulation inflammatoire non spécifique comme celle induite par la carragénine. En outre, ces souris (à la différence de la lignée normale ou des hétérozygotes) sont particulièrement sensibles aux infections par les protozoaires *(Leishmania major)* [51]. Ces résultats suggèrent que, dans les macrophages, une production importante de NO par les NOSi participe aux défenses de l'hôte contre les agents infectieux et les cellules cancéreuses alors que dans les autres tissus (l'arbre vasculaire, en particulier) l'expression d'une NOSi peut être délétère et entraîner un choc et des destructions tissulaires.

Les données cliniques concernant les effets bénéfiques et les effets secondaires des inhibiteurs non sélectifs des NOS sont encore limitées. Il faut se souvenir que plusieurs essais thérapeutiques fondés, soit sur les antagonistes du récepteur de l'IL1, soit sur des anticorps anti-TNF, se sont soldés par des échecs lors de l'application clinique malgré des résultats encourageants sur les modèles animaux. Il faut donc rester très prudent quant aux éventuelles applications thérapeutiques de ces nouvelles molécules. De plus, les conséquences d'une inhibition des NOS dans une situation pathologique donnée sont difficiles à prévoir du fait de la diversité des NOS, des cibles potentielles et des actions biologiques du NO. Dans ce contexte, les résultats (effets bénéfiques et/ou effets secondaires) des essais thérapeutiques en cours avec un inhibiteur non sélectif des NOS (L-NMMA) sont très attendus. Toutefois, les études sur les modèles animaux suggèrent que la combinaison d'une inhibition des NOS couplée à l'inhalation de mélanges gazeux contenant du NO ou à l'utilisation de donneurs de NO, ou encore l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des NOSi, diminueraient les effets secondaires liés à l'inhibition des eNOS ■

Remerciements

I would like to take this opportunity to thank my collegues Csaba Szabo, Garry Southan, Chin-Chen Wu, Sjef de Kimpe, Muralitharan Kengatharan and Hartmut Ruetten for all their input in carrying out many of the experiments described in this review. I would also like to extend my gratitude to my friend and collegue Jean-Paul Cristol for his tremendous efforts in translating this article in french.

RÉFÉRENCES

43. Klemm P, Thiemermann C, Winklmaier G, Martorana P, Henning R. Effects of nitric oxide synthase inhibition combined with nitric oxide inhalation in a porcine model of endotoxin shock. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 363-8.

44. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, *et al.* Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1993; 233: 119-225.

45. Griffith MJD, Messent M, Mac Allister RJ, Evans TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 963-8.

46. Wu CC, Chen SJ, Szabo C, Thiemermann C, Vane JR. Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of endotoxic shock. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 1666-72.

47. Southan GJ, Szabo C, Thiemermann C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 510-6.

48. Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methyl-isothiourea sulfate, a novel, potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12472-6.

49. Thiemermann C, Wu CC, Ruetten H, Vane JR. The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1996 (sous presse).

50. Southan GJ, Szabo C, O'Conner M, Salzman AL, Thiemermann C. Amidines are potent inhibitors of nitric oxide synthases: preferential inhibition of the inducible isoform. *Eur J Pharmacol* 1996 (sous presse).

51. Wei X, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng G, Huang F, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 375: 408-11.

52. Macmicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie Q, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett JS. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995; 81: 641-50.

TIRÉS À PART

C. Thiemermann.

Summary

Inhibition of nitric oxide synthase activity in circulatory shock: friend or foe?

The free radical nitric oxide (NO) is synthetized from the guanidino group of L-arginine by a family of enzymes termed NO synthase (NOS). The continuous release of NO from the constitutive, endothelial isoform of NOS (eNOS) keeps the vasculature in a continuous state of active vasodilatation mediated through the guanylyl cyclase/cGMP system. The inducible isoform of NOS (iNOS) is expressed in response to immunological stimuli in macrophages and in a number of other cells and produces large amounts of NO which can act as a cytostatic and cytotoxic molecule. There is now good evidence that circulatory shock of various causes is associated with profound alteration of biosynthesis of NO from L-arginine. An enhanced formation of NO may contribute to the hypotension, the hyporeactivity of the vasculature and the myocardial dysfunction. In addition, the generation of large quantities of NO may reduce tissue oxygen extraction *via* (1) inhibition of mitochondrial respiration and (2) formation of a diffusive barrier for oxygen (formation of nitrite and nitrate from oxygen and NO). The induction of iNOS in circulatory shock is secondary to the release of the pro-inflammatory cytokines TNF and IL1. PAF may also be involved in the induction of iNOS in circulatory shock for authentic PAF itself causes iNOS induction *in vivo* and PAF receptor antagonists prevent the induction of iNOS caused by endotoxin *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, anti-inflammatory cytokines including IL4, IL10, IL13 inhibit the induction of iNOS. In addition to glucocorticoïds, endogenous polyamines may attenuate the degree of iNOS expression. Thus, novel therapeutic approaches could be designed to modulate the biosynthesis of NO with the aim to improve hemodynamics and survival in animal models and patients with septic shock. Although non-selective NOS inhibitors exert beneficial hemodynamic effects in animals and man with circulatory shock, these agents also exert adverse effects which are due to the inhibition of eNOS. To maximize any potential therapeutic effects of NOS inhibitors, several novel approaches have been suggested: (1) combination of non-selective NOS inhibitors with NO-gas inhalation therapy, (2) use of agents which are relatively selective inhibitors of iNOS such as aminoguanidine or some S-substituted isothioureas.