médecine/sciences 1997 ; 13 : 110-2

NO, pour le meilleur et pour le pire

Chacun sait que le monoxyde d'azote (NO) a tendance aujourd'hui à s'inviter à d'innombrables processus de régulation, normaux ou pathologiques, pour le meilleur… et pour le pire. Dans le choc septique, la conjonction de l'induction de la NO synthase et de la production de radicaux libres oxygène dans les fibres musculaires pourrait aboutir à la formation de peroxynitrites toxiques qui contribueraient, au niveau du diaphragme, à la dépression respiratoire aggravant souvent ces états. En revanche, l'action vasodilatatrice du NO sur le muscle lisse, relayée par la synthèse de GMP cyclique, protège de l'hypertension artérielle. Des rats spontanément hypertendus semblent souffrir d'une insuffisance de production du facteur de croissance FGF, qui serait un régulateur de la synthèse de la NO synthase constitutive par les cellules endothéliales ; le NO ainsi produit agirait alors en réduisant le tonus vasculaire.

NO et dysfonction des muscles respiratoires au cours des états septiques

Le système respiratoire peut être divisé en deux parties : d'une part, un échangeur gazeux – le poumon – et, d'autre part, une pompe qui assure la ventilation des poumons. Cette pompe est constituée par la cage thoracique, les muscles respiratoires, dont le diaphragme est le plus important, et les centres nerveux qui activent les muscles. L'intégrité de ces deux parties du système respiratoire est fondamentale car la survenue d'une insuffisance respiratoire peut être la conséquence d'une défaillance de l'échangeur gazeux et/ou de la pompe ventilatoire.

La survenue d'une insuffisance respiratoire aiguë au cours d'un état septique est fréquente. Elle est la conséquence d'importantes lésions structurelles et fonctionnelles du parenchyme pulmonaire liées au processus septique. Cependant, des données physiopathologiques récentes indiquent qu'une atteinte des muscles respiratoires pourrait constituer également un facteur important dans la genèse de l'insuffisance respiratoire aiguë au cours des états septiques. En effet, plusieurs études expérimentales ont démontré l'existence d'une dysfonction des muscles respiratoires, essentiellement du diaphragme, quelques heures ou quelques jours après le début d'un état septique. Cette dysfonction serait la conséquence de l'action de plusieurs médiateurs humoraux, tels que les métabolites de l'acide arachidonique (principalement les prostaglandines), les métabolites actifs de l'oxygène, et le *tumor necrosis factor* (TNF α) (voir [1] pour une revue complète). Néanmoins, les interrelations entre ces médiateurs et/ou le rôle d'autres médiateurs éventuels ne sont pas connues à l'heure actuelle. La réponse à cette question est essentielle pour la compréhension de l'état septique, processus très complexe, au cours duquel plusieurs médiateurs humoraux et cellulaires agissent de concert.

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre, gazeux à l'état naturel qui possède de nombreuses fonctions biologiques, dans des domaines aussi variés que le système cardio-vasculaire, le système nerveux ou la réponse immunitaire [2]. Il est synthétisé à partir de L-arginine et d'oxygène moléculaire, par une NO synthase (NOS) dont les ADNc codant pour trois isoformes ont été clonés *(m/s n° 12, vol. 11, p. 1743)*. Deux sont constitutives (NOSc), et la troisième est inductible (NOSi). La NOSi est présente dans de nombreux types cellulaires, en particulier dans les macrophages. La synthèse de cette enzyme, indépendante du calcium et de la calmoduline, est induite lors de stimulus inflammatoires, notamment au cours des états septiques. La NOSi produit alors de grandes quantités de NO (à l'inverse des NOSc), pendant des périodes assez longues (plusieurs jours). Cette isoforme de la NOS jouerait un rôle clé dans la physiopathologie de l'état septique, comme en témoignent deux travaux récents qui montrent une diminution de la mortalité après inoculation d'endotoxine d'*E. coli* chez des souris n'exprimant pas le gène de la NOSi *(m/s n° 12, vol. 11, p. 1743)*.

Récemment, nous avons montré qu'une surproduction de NO liée à l'induction de NOSi constituait une autre voie humorale impliquée dans la dysfonction diaphragmatique au cours de l'état septique [3]. En effet,

l'inoculation d'endotoxine d'*E. coli* chez le rat entraîne l'induction de l'activité et de la protéine NOSi dans le diaphragme. Cette induction est maximale 6 heures après l'inoculation d'endotoxine, et se maintient en plateau pendant les 24 premières heures, pour disparaître après 48 heures. La NOSi est synthétisée par des types cellulaires différents selon le moment considéré : 6 heures après l'inoculation d'endotoxine, elle est produite par des cellules inflammatoires infiltrant l'espace périvasculaire, après 12 heures dans les cellules inflammatoires et dans les myocytes diaphragmatiques, et après 24 heures elle n'est plus synthétisée que par les myocytes. Cette production est localisée dans le cytoplasme de presque la totalité des cellules musculaires.

L'induction de NOSi dans les myocytes diaphragmatiques 12 et 24 heures après l'inoculation d'endotoxine s'accompagne d'une diminution significative de la force de contraction musculaire, qui se normalise 48 heures après inoculation. Cette diminution de la force diaphragmatique est prévenue par l'inhibition de l'induction de NOSi par la dexaméthasone, et par l'inhibition de la synthèse du NO par la NG-monométhyl-L-arginine (LNMMA).

Ces résultats suggèrent fortement qu'une surproduction de NO liée à l'induction de NOSi dans les myocytes diaphragmatiques serait impliquée dans la dysfonction contractile musculaire observée après l'inoculation d'endotoxine d'*E. coli*. Il faut souligner que l'induction de NOSi dans les cellules inflammatoires infiltrant l'espace périvasculaire des vaisseaux intradiaphragmatiques qui survient précocement ne s'accompagne pas d'une réduction significative de la force musculaire. Cela est observé en dépit d'une induction d'amplitude similaire à celle observée dans les myocytes. Ce phénomène montre que, malgré la diffusibilité du NO, et à l'inverse de ce qui a été rapporté dans le myocarde [4], la surproduction de NO doit avoir lieu dans les myocytes diaphragmatiques pour entraîner l'altération constatée du processus contractile.

Une interaction avec les métabolites actifs de l'oxygène (MAO) pourrait expliquer, au moins partiellement, l'effet délétère de la surproduction de NO sur la contractilité diaphragmatique. En effet, des MAO sont engendrés dans les muscles respiratoires après inoculation d'endotoxine bactérienne [5]. Le NO, quand il est en excès, réagit avec un des MAO, l'anion superoxide ($O_2^{\bullet-}$), pour donner du peroxynitrite ($ONOO^-$), radical extrêmement toxique pour les lipides et les protéines [6]. Il a été démontré récemment que le peroxynitrite est capable d'oxyder et d'inactiver les ATPases calciques du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique, protéines qui jouent un rôle clé dans le processus contractile musculaire [7] *(figure 1)*. Le peroxynitrite peut aussi altérer les protéines mitochondriales, affectant ainsi la respiration cellulaire et la fourniture d'énergie pour la contraction musculaire [8].

Quel(s) que soi(en)t le(s) mécanisme(s) causal(s), la défaillance de la pompe ventilatoire au cours des états septiques a d'importantes implications cliniques, notamment en ce qui concerne la survenue d'une insuffisance respiratoire aiguë. La mise en évidence du rôle du NO pourrait guider la mise en route d'une évaluation de la fonction des muscles respiratoires chez des malades septiques et faciliter le développement d'une approche thérapeutique rationnelle si un tel dysfonctionnement est mis en évidence chez l'homme.

J.B.
T.F.
M.A

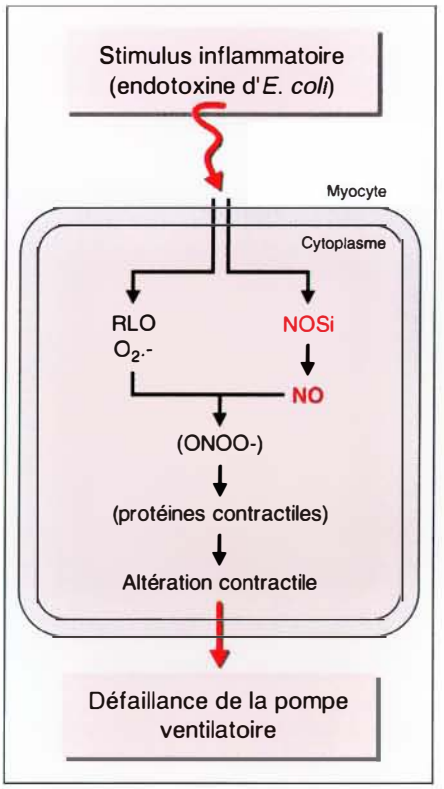

Figure 1. ***Mécanisme présomptif du rôle du NO dans la défaillance ventilatoire au cours d'un état septique.*** *Dans les myocytes diaphragmatiques, l'endotoxine bactérienne déclenche, d'une part, l'induction de la NOSi et, d'autre part, une surproduction des radicaux libres de l'oxygène (RLO), dont l'anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$). Le NO ainsi produit par la NOSi interagirait avec $O_2^{\cdot-}$ pour donner des peroxynitrites ($ONOO^-$) extrêmement toxiques. L'inactivation par ces radicaux de la Ca^{2+}-ATPase du réticulum sarcoplasmique ou des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale pourraient rendre compte de la diminution de la force musculaire et de la défaillance de la pompe ventilatoire.*

1. Boczkowski J, Aubier M. The respiratory muscles in sepsis. In : Roussos C, ed. *The Thorax (Part B)*. New York : Marcel Dekker Inc., 1995 : 1483-514.
2. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 2002-12.

3. Boczkowski J, Lanone S, Ungureanu-Longrois D, Danialou G, Fournier T, Aubier M with the technical assitance of Mechighel P. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin administration in rats. Role on diaphragmatic contractile dysfunction. *J Clin Invest* 1996; 98: 1550-9.

4. Ungureanu-Longrois D, Balligand JL, Okada I, Simmons W, Kobzik L, Lowestein C, Kunkel S, Michel T, Kelly R, Smith T. Contractile responsiveness of ventricular myocytes to isoproterenol is regulated by induction of nitric oxide synthase activity in cardiac microvascular endothelial cells in heterotypic primary culture. *Circ Res* 1995; 77: 486-93.

5. Van Surell C, Boczkowski J, Pasquier C, Du Y, Franzini E, Aubier M. Effects of N-acetylcysteine on diaphragmatic function and malondialdehyde content in *E. coli* endotoxemic rats. *Am Rev Resp Dis* 1992; 146: 730-4.

6. Beckman J, Beckman T, Chen J, Marshall P, Freeman B. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-4.

7. Viner R, Huhmer A, Bigelow D, Schoneich C. The oxidative inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase by peroxynitrite. *Free Rad Res* 1996; 24: 243-59.

8. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328: 309-16.

CERLIB

3es Conférences de Recherche Hivernales
9-14 mars 1997

Les Arcs 1800

Latitudes/l'Hôtel du Golf Les Arcs 1800
73700 Bourg-St-Maurice – France
Tél.: (33) 04 79 41 43 34
Fax: (33) 04 79 07 34 28

9-10 mars
Proteins and free radicals, from radical enzymes to damages
Marc Fontecave – Jean-Louis Pierre

11-12 mars
Oxidative effects of radiations on biomolecules and cells
Jean Cadet – Jean-Claude Beani

13-14 mars
Oxidative Stress and apoptosis
Alain Favier – Jacques Mathieu

Pour tout renseignement sur le CERLIB, contacter:

Arlette Alcaraz – Laboratoire de Biochimie C – CHU Grenoble BP 217 38043 Grenoble Cedex 9
Tél.: (33) 04 76 76 57 54
Fax: (33) 04 76 76 56 64
CERLIB@ujf-grenoble.fr

BRÈVES

FGF et hypertension artérielle. On n'avait encore jamais rapporté d'état pathologique à une concentration basse de FGF *(fibroblast gowth factor)*. L'équipe de Cuevas (Madrid, Espagne) propose aujourd'hui que le manque de FGF serait à l'origine de l'hypertension artérielle des rats spontanément hypertendus (rats SH). Cette équipe avait observé il y a quelques années que l'injection systémique de ces facteurs en concentration extrêmement faible (< 1 nmol/-kg) entraînait une vasodilatation aiguë qui pouvait être prévenue par les inhibiteurs de synthèse du monoxyde d'azote (NO) [1]. Ils ont poursuivi leurs études sur les rats SH [2]. Cette souche de rats Wistar-Kyoto a été développée en croisant entre eux des sujets spontanément hypertendus, jusqu'à obtenir une souche à hypertension artérielle stable; elle s'est révélée un bon modèle de l'hypertension artérielle essentielle humaine du fait de son développement progressif, accompagné d'anomalies neuro-endocriniennes qui pourraient être en cause dans le maintien de l'élévation de pression. Mais ce qui déclenche initialement l'hypertension lorsque le rat à 2-3 mois est resté mystérieux. Étudiant l'effet vasodilatateur des FGF sur ces animaux, les auteurs ont observé qu'une injection de aFGF purifié entraînait une baisse immédiate de la pression artérielle, suivie d'une remontée à son niveau antérieur dans l'heure suivante; mais, fait très surprenant, le lendemain la pression était à nouveau basse et ne remontait que très progressivement, retrouvant son niveau initial au bout de huit jours. Cet effet de longue durée, observé chez les rats SH tant jeunes (5 mois) qu'âgés (14 mois) était absent chez les animaux témoins. Le FGF injecté en bolus disparaît rapidement de la circulation, séquestré par les héparinoïdes à la surface de l'endothélium vasculaire. Il pouvait donc être capté par l'endothélium et compenser un déficit. C'est ce qui apparaît sur les coupes vasculaires où le FGF est détecté par immunohistochimie. Le FGF, déjà en très faible quantité dans l'endothélium vasculaire des rats SH de 5 mois, diminue avec l'âge et est quasiment absent avant traitement chez les rats SH de 18 mois. Après injection de FGF, on observe son accumulation à la surface de l'endothélium, de même qu'après transfert de son gène. Le mécanisme de baisse de la pression artérielle en présence de FGF fait intervenir la synthèse de NO synthase endothéliale constitutive (ecNOS) et la production de NO. L'abondance de ecNOS dans l'endothélium est corrélée très étroitement à celle du FGF: faible chez le rat SH de 5 mois, à l'état de trace chez le rat SH de 18 mois, elle se normalise sous l'effet du FGF. Le dysfonctionnement endothélial chez les rats SH serait donc lié au manque de ecNOS dont la synthèse dépend du FGF. En l'absence de régulation par le NO, la résistance vasculaire chez ces animaux est extrêmement sensible aux amines adrénergiques. Cette sensibilité disparaît après traitement par le FGF qui restaure la présence de ecNOS. Sans doute le rôle trophique du FGF ne s'arrête-t-il pas à la synthèse de ecNOS et ce facteur mitogène stimule-t-il la synthèse d'autres protéines, mais c'est la ecNOS qui semble jouer un rôle central dans la vasomotricité et la trophicité de la paroi artériolaire [3-5]. L'avenir dira si on a trouvé là le véritable orchestrateur de la vasomotricité et des expériences de transfection du gène de FGF devraient permettre l'étude à plus long terme de ce système. Encore des projets de thérapie génique en vue...

[1. Cuevas P, *et al. Science* 1991; 254: 1208-10.]
[2. Cuevas P, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11996-2001.]
[3. Corvol P. *Med Sci* 1993; 9: 1031-3.]
[4. Corvol P, *et al. Med Sci* 1993; 9: 1050-61.]
[5. Michel J, Arnal J. *Med Sci* 1993; 9 : 1061-7.]