

Les monoxyde d'azote (NO) synthases

NO — médiateur gazeux aux multiples fonctions (*m/s* n° 10, vol. 7, p. 1094, Tableau I) — est un radical libre, produit de la catalyse enzymatique de la L-arginine en citrulline. Cette catalyse est assurée de façon spécifique de tissu par une famille d'enzymes — les monoxyde d'azote synthases — dont trois représentantes ont maintenant leur ADN complémentaire cloné (Tableau I). Ces isoformes se partagent en deux groupes : les NO synthases constitutives et les NO synthases inductibles.

Membres du premier groupe, les NO synthases endothéliale et neuronale, initialement considérées comme produits d'un même gène, sont en fait codées par deux gènes différents [1, 2]. En effet, l'isoenzyme endothéliale bovine — produit d'expression dans des cellules COS d'un ADN complémentaire isolé après criblage d'une banque issue de cellules endothéliales — ne présente que 60 % d'homologie au niveau de la séquence peptidique avec l'isoenzyme neuronale de la même espèce, et l'existence d'au moins deux gènes codant respectivement pour chacune de ces enzymes est confirmée par le profil de migration de fragments de restriction obtenus après hybridation avec des sondes spécifiques (*Southern blot*) [2]. Toutes deux ont en commun des domaines de reconnaissance du complexe Ca²⁺/calmoduline et des transporteurs de protons FAD, FMN et NADPH. L'isoforme neuronale, de masse moléculaire plus importante, possède un domaine NH₂ terminal supplémentaire d'environ 200 acides aminés, dont la fonction est à ce jour inconnue. Ces deux enzymes ont une activité basale stimulable après activation : (1) des récepteurs membranaires type NMDA par les acides aminés neuroexcitateurs pour la forme neuronale, ou (2) des récepteurs endothéliaux reconnaissant divers vaso-médiateurs relaxants, dont l'acétylcholine et les bradykinines, pour la forme endothéliale.

A l'inverse des isoformes neuronale et

endothéliale, l'isoforme macrophagique, présente aussi dans le polynucléaire neutrophile, indépendante du complexe Ca²⁺/calmoduline, est inductible : l'apparition d'une activité NO synthase, après stimulation de lignées cellulaires macrophagiques par les LPS bactériens, l'interféron γ ou l'IL-1, est prévenue par un inhibiteur de la synthèse de protéines [3, 4]. La toxine staphylococcique TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin 1*) stimule aussi la production macrophagique de NO *ex vivo*, suggérant l'implication de ce dernier dans les manifestations hémodynamiques du *toxic shock syndrome* staphylococcique [5]. Une autre isoforme hépatique et inductible par des endotoxines a récemment été décrite [6]. Non encore clonée, elle possède la propriété curieuse d'avoir son activité fortement

dépendante de la présence de calmoduline, mais largement indépendante de la concentration en calcium. Cette particularité pourrait avoir des conséquences importantes sur les plans pharmacologique et thérapeutique, dans la mesure où de nombreux chocs septiques à bacilles Gram négatif sont à point de départ digestif, et s'accompagnent d'un passage hépatique obligatoire d'une quantité importante d'endotoxines.

En effet, l'emploi d'inhibiteurs de la synthèse du NO — comme la N^G monométhyl L-arginine (L-NMMA) ou la N^Gnitro L-arginine méthyl ester (L-NAME) — dans le traitement des manifestations hémodynamiques du choc septique ou de l'insuffisance hépatique a été récemment rapporté chez l'animal et chez l'homme, avec des

Tableau I
NO SYNTHASES : LES DIFFÉRENTES ISOFORMES

Spécificité	Cellule endothéliale	Neurone	Macrophage
Masse moléculaire	135 kDa	150 kDa	130 kDa
Activité	Constitutive et stimulable	Constitutive et stimulable	Inductible
Fonction du produit NO	EDRF (<i>endothelium-derived relaxing factor</i>)	Neurotransmetteur	Bactéricidie Tumoricidie
Cofacteur Ca ²⁺ / Calmoduline	Dépendante	Dépendante	Indépendante
Cofacteurs FAD, FMN, NADPH	Dépendante	Dépendante	Dépendante
Effecteurs membranaires	Acétylcholine Bradykinine Sérotonine — ATP	Acides aminés neuro-excitateurs	Lipopoly-saccharides Interféron Interleukine 1
Effet inhibiteur de la N-monométhyl-arginine	Présent	Présent	Présent

résultats variables et controversés ([7-10]; *m/s* n° 2, vol. 8, p. 187). La principale critique faite à un tel traitement est que, bien qu'elle contribue à une remontée de la pression artérielle systémique, la suppression de la synthèse endothéliale de NO majeure localement l'hypoperfusion et l'ischémie de nombreux tissus, notamment le myocarde, et pourrait favoriser la survenue de poussées d'hypertension artérielle pulmonaire en cas de syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (SDRA), complication fréquente des septicémies à bacilles Gram négatif et des chocs septiques. L'absence de spécificité de ces analogues a aussi pour effet d'inhiber la NO synthase macrophagique, privant ainsi l'organisme du pouvoir bactéricide de NO. Enfin, chez l'animal, l'effet de ces inhibiteurs est dépendant de la dose, avec des conséquences hémodynamiques variables selon la posologie [8]. Le clonage des ADN complémentaires codant pour les isoformes non macrophagiques et inductibles par les endotoxines, et leur expression dans un système cellulaire aspécifique, pourraient donc constituer l'étape préalable à la caractérisation d'inhibiteurs spécifiques utilisables lors de situations septiques graves, devenues l'une des principales causes de mortalité dans les unités de réanimation.

Au niveau endothélial, NO a un effet paracrine vaso-relaxant sur la cellule musculaire lisse, *via* la production de GMP cyclique et l'activation de protéine kinases dépendantes du GMP cyclique. Son instabilité intrinsèque et sa forte affinité pour les groupements prosthétiques héminiques, dont bien sûr celui de l'hémoglobine, rendent compte d'une durée de vie de l'ordre de quelques secondes. Cette caractéristique est l'une des raisons pour lesquelles NO a très rapidement acquis, en pathologie cardio-respiratoire, un potentiel thérapeutique considérable [11]. Il trouve aujourd'hui la principale de ses indications dans certaines formes d'hypertension artérielle pulmonaire, notamment celles secondaires à une hypoxie alvéolaire [12, 13]. Chez l'adulte, l'inhalation d'un mélange gazeux contenant entre 10 et 40 ppm de NO produit une baisse significative et durable des résistances pulmonaires de patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire sévère ou de

syndrome de détresse respiratoire aigu de l'adulte [14, 15]. L'avantage de cette voie d'administration est la spécificité d'action sur la circulation pulmonaire, l'inactivation quasi immédiate du gaz permise par la fixation à l'hémoglobine s'effectuant avant le retour veineux pulmonaire. La persistance d'une hypertension artérielle pulmonaire à la naissance, grave syndrome fréquemment observé chez le nouveau-né [16], pourrait aussi constituer une autre indication de l'inhalation de mélanges gazeux enrichis en NO. NO semble en effet jouer un rôle important dans la baisse des résistances vasculaires pulmonaires qui caractérise l'adaptation cardio-respiratoire du mammifère nouveau-né à la vie extra-utérine. Ajoutons enfin que des données expérimentales et préliminaires suggèrent que ce même mode d'administration pourrait trouver des indications dans les syndromes bronchiques obstructifs aigus ou chroniques [17]. Dans toutes ces situations, le danger d'un tel traitement est moins l'apparition d'une faible méthémoglobinémie que la production — favorisée par une fraction d'O₂ inspirée élevée — de NO₂, extrêmement toxique et potentiellement mutagène pour l'épithélium respiratoire [17]. Son usage présuppose donc une surveillance étroite des concentrations de NO inspiré et de NO₂ expiré [18], et une évaluation approfondie de sa toxicité pulmonaire chez l'animal.

NO est aussi un neurotransmetteur, non seulement du système nerveux central, mais aussi du système nerveux périphérique. C'est ainsi le premier neurotransmetteur non cholinergique, non adrénérgique, et médiateur de la relaxation du tube digestif, caractérisé à ce jour [20]. Il participe au contrôle neuronal du tonus vasculaire cérébral [21], de l'érection [22], et de la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans [23]. Dans le cerveau, avec l'exception du cervelet — très riche en NO synthase neuronale —, la production de NO est limitée à une petite fraction de la population neuronale du cortex, de l'hippocampe et du corpus striatum. Ces mêmes populations neuronales sont caractérisées par une activité NADPH diaphorase, et par leur résistance à l'hypoxie *in vivo* ou à la toxicité de l'acide glutamique (acide aminé neuro-

excitateur) *ex vivo*. Co-cultivés en présence de neurones producteurs de NO stimulés par l'acide glutamique, les neurones non producteurs de NO meurent, sauf si le milieu est conditionné par l'absence d'arginine ou additionné de NMMA. Tous ces faits sont en faveur d'un rôle important joué par NO dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale, de certaines affections neurodégénératives, et peut-être, sécrété alors par les monocytes et macrophages cérébraux, dans l'encéphalite du SIDA [24]. L'importance du monoxyde d'azote en neurophysiopathologie apparaît donc considérable et pose le problème de la nature exacte des fonctions neurophysiologiques de NO, comme celui — ce n'est pas une plaisanterie — de l'existence d'autres neurotransmetteurs gazeux comme... le monoxyde de carbone CO [24, 25] ■

Thierry Lacaze-Masmonteil

Inserm U. 129, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

RÉFÉRENCES

1. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CH, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome p-450 reductase. *Nature* 1991; 351 : 714-8.
2. Lamas S, Marsden P, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 : 6348-52.
3. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 1992; 267 : 6370-4.
4. Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 : 6711-5.
5. Zembowicz A, Vane JR. Induction of nitric oxide synthase activity by toxic shock syndrome toxin 1 in a macrophage-monocyte cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 : 2051-5.
6. Evans T, Carpenter A, Cohen J. Purification of a distinctive form of endotoxin-induced nitric oxide synthase from rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 : 5361-5.
7. Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338 : 1557-8.
8. Nava E, Palmer RM, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet* 1991; 338 : 1555-7.

-
9. Hotchkiss RS, Karl IE, Parker JL, Adams HR. Inhibition of NO synthesis in septic shock. *Lancet* 1992 ; 339 : 434-5.
 10. Cohen J, Silva A. NO inhibitors and septic shock. *Lancet* 1992 ; 339 : 751.
 11. Collier J, Vallance P. Physiological importance of nitric oxide : an endogenous nitrovasodilator. *Br Med J* 1991 ; 302 : 1289-90.
 12. Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM. Inhaled nitric oxide, a selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991 ; 83 : 2038-47.
 13. Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P, Chabrier PE. Loss of endothelium-dependant relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1991 ; 87 : 155-62.
 14. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Tuan Dinh-Xuan A, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991 ; 338 : 1173-4.
 15. Falke K, Rossaint R, Pison V, et al. Inhaled nitric oxide selectively reduces pulmonary hypertension in severe ARDS and improves gas exchanges as well as right heart ejection fraction : a case report. *Am Rev Resp Dis* 1991 ; 143 : A248.
 16. Lacaze-Masmonteil T, Zupan V, Dehan M. Hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau-né : progrès et espoirs. *Arch Fr Pédiatr* 1991 ; 48 : 597-601.
 17. Dupuy PM, Shore SA, Drazen JM, Fzostell C, Hill WA, Zapol WM. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *J Clin Invest* 1992 ; 92 : 421-8.
 18. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 3030-4.
 19. Foubert L, Fleming B, Latimer R, Jonas M, Oduro A, Borland C, Higenbottam T. Safety guidelines for use of nitric oxide. *Lancet* 1992 ; 339 : 1615-6.
 20. Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food and fluid. *Nature* 1991 ; 351 : 477-9.
 21. Beckman JS. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J Dev Physiol* 1991 ; 15 : 53-9.
 22. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the *corpus cavernosum* in response to non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* 1992 ; 326 : 90-4.
 23. Schmidt HHHW, Warner TD, Ishii K, Sheng H, Murad F. Insulin-secretion from pancreatic B-cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science* 1992 ; 255 : 721-3.
 24. Snyder SH. Nitric oxide : first in a new class of neurotransmitters ? *Science* 1992 ; 257 : 494-6.
 25. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 1992 ; 70 : 705-7.

TIRÉS A PART

Th. Lacaze-Masmonteil.

m/s n° 8, vol. 8, octobre 92