

Les affaires de cœur du monoxyde d'azote : les NOS cardiaques

Jean-Luc Balligand
Dan Longrois
Alexandre Mebazaa
Pierre-François Méry

Le monoxyde d'azote (NO) est l'un des médiateurs impliqués dans la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Dans le tissu cardiaque, le NO participerait non seulement à la régulation du tonus vasculaire, mais aussi à la régulation de la contractilité cardiaque. La mise en évidence de cibles pour le NO dans les myocytes cardiaques a permis de conforter cette hypothèse. La présence de sources de NO endogène, les NO-synthases (NOS), a été documentée plus récemment dans plusieurs types cellulaires cardiaques. Cette voie du NO réglerait la contraction *in vitro* et *in vivo*, notamment en modulant les effets cardiaques des systèmes sympathique et parasympathique. De plus, la voie du NO apparaît modifiée dans différentes affections cardiovasculaires humaines. L'isoforme inductible iNOS est souvent exprimée dans le myocarde, dans le contexte du choc septique, ainsi que dans les cardiomyopathies dilatées chez l'homme. Le rôle, bénéfique ou délétère, de la iNOS, demeure un sujet très étudié, mais controversé.

ADRESSES

J.L. Balligand: *professeur des universités*. Département de médecine, unité de pharmacologie FATH 53.49, Université Catholique de Louvain, Tour Pasteur, 53, avenue Mounier, 1200 Bruxelles, Belgique. D. Longrois: *professeur d'anesthésie-réanimation chirurgicale*. Département d'anesthésie-réanimation chirurgicale et laboratoire de médecine et chirurgie expérimentale-UPRESS X971068/EA2403, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy et Université Henri-Poincaré-Nancy I, 4, rue du Morvan, 54500 Vandœuvre-les-Nancy, France. A. Mebazaa: *praticien hospitalier*. Département d'anesthésie-réanimation, Hôpital Lariboisière, AP-HP, IFR Circulation-Lariboisière, 2, rue Amboise-Paré, 75475 Paris Cedex 10, France. P.F. Méry: *chargé de recherche à l'Inserm*. Inserm U. 446, Laboratoire de cardiologie cellulaire et moléculaire, Université Paris-Sud, Faculté de pharmacie, 5, rue Jean-Baptiste-Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

«...David came into my office from the laboratory. He said that something was going wrong; that the first additions of carbachol were causing a relaxation rather than a contraction of the aortic rings. I told David that could not be...* »

R.F. Furchgott [1]

En proposant que l'endothélium intervienne dans le contrôle du tonus vasculaire, Furchgott fait circuler un sang neuf dans bien des esprits. Il montre que certains agonistes exercent leurs effets vasore-

laxants quand la paroi endothéliale vasculaire est saine et intacte (pour revue, voir [1]). L'altération de l'endothélium a pour résultat d'inverser l'effet de ces agonistes, qui agissent alors comme des constricteurs. L'endothélium engendre un facteur paracrine, l'EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*), qui sera assimilé au monoxyde d'azote (NO)

* David passa du laboratoire dans mon bureau. Il dit qu'il se passait quelque chose d'anormal, que les premiers essais d'ajout de carbachol se concluaient par une relaxation des anneaux aortiques, pas par une contraction. Je lui dis que ce n'était pas possible.

dans l'aorte (pour revue, voir [2]). Les effets vasorelaxants du NO sont rapidement déchiffrés. En amont, les élévations du niveau de calcium intracellulaire provoquent l'activation d'une NO-synthase, la eNOS, qui rend compte de la synthèse de NO dans les cellules endothéliales. En aval, le NO est capable de stimuler l'activité d'une guanylyl cyclase, qui synthétise le GMP cyclique (GMPc). Dans les cellules musculaires lisses, l'augmentation du niveau de GMPc entraîne la vasorelaxation.

Ces travaux rationalisent la prescription des dérivés nitrés dans le traitement de l'angine de poitrine. Une pratique courante depuis près d'un siècle ! Elles fournissent un schéma de communication intercellulaire applicable à d'autres tissus, en particulier le tissu cardiaque. Nous concentrerons notre exposé sur les arguments en faveur du rôle du NO sur la fonction cardiaque. Nous n'aborderons pas les effets, non moins importants, du NO sur le réseau coronaire [3].

Les effets cardiaques du GMPc suggèrent un rôle pour le NO

Les myocytes cardiaques expriment le récepteur le plus classique du NO, la guanylyl cyclase hétérodimérique, dite soluble (pour revues, voir [2, 4, 5]). De plus, des cibles potentielles du GMPc sont isolées du cœur, et en premier lieu, des phosphodiésterases, responsables de l'hydrolyse du GMPc et surtout de l'AMP cyclique (AMPc) (pour revues, voir [4, 6]). En autorisant une dialyse directe du GMPc dans les myocytes isolés, la technique de *patch-clamp* a permis d'illustrer les effets du GMPc sur les canaux ioniques membranaires. Tour à tour, une phosphodiésterase activée par le GMPc (PDE2), une phosphodiésterase inhibée par le GMPc (PDE3), et une protéine-kinase dépendante du GMPc (PK-GMPc) seront impliquées dans la régulation de l'activité des canaux ioniques [5, 6]. Ces travaux montrent que le GMPc contrôle la régulation β -adrénergique, ainsi que les effets des agonistes qui stimulent la production d'AMPc dans les myocytes. D'autres travaux montrent que la PK-GMPc

peut provoquer une baisse de sensibilité de l'appareil contractile du calcium, un effet qui pourrait s'expliquer par la phosphorylation de la troponine I [3]. De plus, *in vitro*, la PK-GMPc phosphoryle le récepteur de la ryanodine, un canal calcique du réticulum sarcoplasmique [7]. La PK-GMPc est aussi capable de stimuler la synthèse d'ADP-ribose cyclique, un activateur endogène du récepteur de la ryanodine [8]. Le GMPc apparaît donc comme un régulateur de plusieurs grandes fonctions du myocyte cardiaque.

Effets des donneurs de NO dans les myocytes cardiaques

L'hypothèse précédente méritait d'être confortée dans le cadre d'une production endogène de GMPc. De faibles concentrations de donneurs de NO (et/ou de modestes activations endogènes de guanylyl cyclase) stimulent le courant calcique (myo-

cyte auriculaire humain), potentialisent la stimulation β -adrénergique du courant calcique (myocytes ventriculaires), et amplifient l'inotropisme de myocytes isolés [3-6]. Ces effets impliquent le GMPc par l'inhibition de la PDE3 (figure 1). A plus fortes concentrations, les donneurs de NO (et/ou de fortes activations endogènes de guanylyl cyclase) inhibent la stimulation β -adrénergique du courant calcique et réduisent l'effet inotrope positif des agonistes β -adrénergiques sur des myocytes isolés [3-6]. Ces effets anti- β -adrénergiques des donneurs de NO font intervenir la PDE2 ou la PK-GMPc, selon l'espèce animale et/ou l'origine anatomique (oreillette, ventricule) des myocytes étudiés (figure 1). Ce schéma est valable pour les myocytes adultes, mais ne s'applique pas chez le nouveau-né chez lequel l'activation de la PK-GMPc par le NO provoque une stimulation du courant calcique [9]. Le développement s'accompagnerait de changements qualitatifs de l'effet

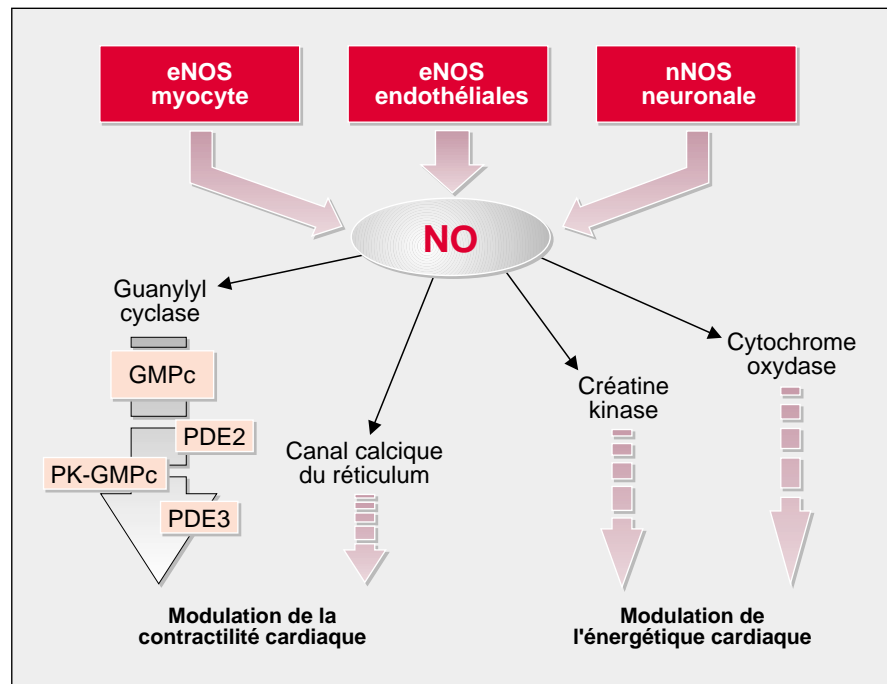


Figure 1. **Cibles et sources constitutives potentielles du monoxyde d'azote (NO) dans le cœur.** Le NO pourrait être engendré dans certains neurones par la nNOS, dans les cellules endothéliales endocardiques et vasculaires, et dans les myocytes cardiaques par la eNOS. Dans les myocytes, l'une des cibles du NO est la guanylyl cyclase hétérodimérique, qui en produisant le GMPc, module l'activité de phosphodiésterases (PDE2, PDE3) et de protéine-kinase (PK-GMPc). Le NO module aussi l'activité d'un canal calcique du réticulum sarcoplasmique, de la créatine kinase, et de la cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire mitochondriale. (D'après [2-11].)

du NO et de ses cibles dans les myocytes cardiaques.

Le rôle du NO ne se limite pas au compartiment membranaire (figure 1). Les donneurs de NO potentialisent ou inhibent la mobilisation de calcium en modifiant l'activité du canal-récepteur de la ryanodine [8, 10]. *In vitro*, cette double régulation fait intervenir la nitrosylation de résidus sulfhydryls du canal [10]. Toutefois, la stimulation de la production de l'ADPribose cyclique (voir plus haut) peut aussi participer à la stimulation du canal par le NO [8]. Enfin, le NO contrôlerait le métabolisme des myocytes (pour revues, voir [4, 5, 11]). D'une part, les donneurs de NO inhibent directement la créatine kinase [5]. D'autre part, ils réduisent l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, *in vitro* [11]. En entrant en compétition avec l'oxygène sur la cytochrome oxydase, le NO pourrait moduler la sensibilité apparente des mitochondries pour l'oxygène, d'une manière indépendant du GMPc. Ainsi, le NO, plus encore que le GMPc, exerce une influence sur tous les compartiments cellulaires du myocyte cardiaque *in vitro*.

Effets des donneurs de NO sur la pompe cardiaque

Les effets contractiles des donneurs de NO ont été décrits *in vivo* et *ex vivo*, dans des préparations multicellulaires cardiaques. Le NO exogène pourrait modifier la fréquence (augmentation) [3-5, 12], la force de contraction (augmentation, ou réduction) [3-6], ou la vitesse de relaxation (augmentation) [3-5]. Nous développerons plus particulièrement les résultats obtenus chez l'homme.

Chez des sujets sains, l'injection intracoronaire d'un donneur de NO (nitroprussiate de sodium, NPS) modifie les deux principaux déterminants de la fonction diastolique du ventricule gauche : la relaxation et la compliance [3]. Après 5 minutes d'administration du NPS, la relaxation plus précoce du ventricule gauche entraîne une baisse des pressions maximales engendrées par le ventricule gauche. De plus, le NPS entraîne une augmentation du volume télédiastolique et une baisse

de la pression télédiastolique du ventricule gauche. Cela est en faveur d'une meilleure distensibilité du ventricule gauche. En revanche, les paramètres de la fonction systolique ne sont pas ou peu modifiés (par exemple, le volume téléstolique du ventricule gauche, et la pente de la contraction isovolémique dP/dt_{max}). Puisque le NPS n'avait pas d'effet vasculaire dans l'étude citée, ses effets cardiaques ont été attribués à des modulations directes sur la fonction diastolique du ventricule gauche. Des donneurs de NO ont aussi été administrés chez des patients transplantés cardiaques ou présentant une hypertrophie du ventricule gauche par rétrécissement aortique [13]. Il est noté une amélioration de la fonction diastolique comparable qualitativement à celle observée chez les sujets normaux. Toutefois, cette amélioration est de moindre amplitude dans les cœurs transplantés. A l'inverse, chez les patients atteints d'un rétrécissement aortique, la baisse de la pression télédiastolique du ventricule gauche après administration de donneur de NO est plus importante que chez les sujets normaux.

Ces travaux montrent que le NO exogène modifierait principalement la fonction diastolique, en particulier la relaxation avec peu ou pas d'effet direct sur la fonction systolique. Cette conclusion se limiterait à la fonction basale du cœur, en l'absence de stimulation sympathique ou parasympathique. Les effets des donneurs de NO doivent être interprétés prudemment. En effet, leurs propriétés chimiques ne sont pas toujours celles du NO endogène. De plus, le site et la vitesse de production du NO endogène sont apparus comme des caractéristiques fondamentales pour déterminer l'implication de ce messenger, très labile dans les tissus. De ce fait, l'absence d'effets de donneurs de NO dans différentes préparations cardiaques n'a pas remis en cause les conclusions précédentes [14-17].

Les NOS endothéliales et le rôle paracrine du NO sur le myocyte

Les sources cardiaques constitutives de NO sont nombreuses (figure 1) [3-

5]. La nNOS est exprimée très exclusivement dans certains neurones cardiaques [3-5]. La eNOS est l'isoforme prédominante dans le cœur, où elle est exprimée dans les cellules endothéliales vasculaires et endocardiques [3-5, 18, 19], et dans les myocytes cardiaques [3-5, 19]. Les effets du NO endogène sur le myocyte ont été décrits *in vitro* et *ex vivo*. L'effet paracrine de la NOS a été étudié dans des co-cultures de cellules endothéliales aortiques et de myocytes cardiaques, *in vitro* [4, 5]. Dans ces co-cultures, l'effet inotrope négatif de la bradykinine sur les myocytes est bloqué par un inhibiteur de NOS. Cet effet fait intervenir les cellules endothéliales puisque ce peptide vasorelaxant n'exerçait pas d'effet inotrope sur les myocytes en monoculture dans cette étude.

Cette observation a été confirmée *ex vivo* sur des muscles papillaires ou des cœurs isolés [3]. Dans ces préparations, la stimulation de l'activité de NOS endothéliale (vasculaire et endocardique), par la bradykinine ou la substance P, accélère la relaxation diastolique, alors que la fonction systolique demeure inchangée. L'utilisation d'électrodes à porphyrines sur cœurs de rats isolés a permis de détecter un authentique flux sortant de NO lors de la diastole [20]. Ce flux sortant est augmenté lors d'élévations de la précharge et est stimulé par des facteurs mécaniques qui augmentent la compression du myocarde, tels que l'augmentation du volume télédiastolique ou de la pression transmurale [21]. Ces études montrent que l'activité de l'eNOS myocardique règle des paramètres fondamentaux de la contractilité cardiaque.

De plus, la bradykinine produit une réduction significative de la consommation en oxygène de segments de myocarde de chien [11]. Cet effet est aboli par l'inhibition de NOS. Ces expériences suggèrent que la synthèse de NO par l'endothélium microvasculaire exerce une influence négative sur la respiration mitochondriale (et potentiellement sur la production d'énergie) des myocytes cardiaques. Une telle influence pourrait se traduire par effet inotrope négatif. Ces expériences ont été répétées avec des cœurs de chiens atteints d'une insuffisance cardiaque expérimentale.

tale, présentant une consommation en oxygène supérieure à celle des cœurs témoins. Dans des segments musculaires de ces cœurs décompensés, la consommation en oxygène n'est plus réglée par la bradykinine. La communication intercellulaire faisant intervenir le NO endogène serait donc perturbée dans ce modèle d'insuffisance cardiaque.

La NOS du myocyte et le rôle autocrine du NO

Les résultats concernant l'implication de la eNOS des myocytes sont en partie contradictoires [3-6]. L'hétérogénéité des modèles expérimentaux

explique en partie l'hétérogénéité des résultats (différences inter-espèces, diversité des origines anatomiques des myocytes). Nous proposons un survol des résultats illustrant les différents domaines cardiaques dans lesquels la eNOS pourrait intervenir.

Dans les myocytes cardiaques, la eNOS apparaît localisée dans les *caveolae*, des invaginations de la membrane plasmique [19]. La eNOS est co-immunoprécipitée avec la cavéoline 3, le marqueur des *caveolae* des myocytes. Cette isoforme de cavéoline n'est pas présente dans les cellules endothéliales, qui expriment la cavéoline 1 [19]. De plus, il existe des arguments fonctionnels en faveur d'un rôle autocrine de la eNOS. Des myocytes ventriculaires isolés et stimulés électriquement sont capables d'engendrer du NO (production évaluée par l'accumulation de nitrite, et le dosage de GMPc). Cette production de NO est associée à une atténuation de la relation positive contraction-fréquence [4, 5]. Ces deux phénomènes sont abolis par un

inhibiteur de NOS. Plus récemment, l'utilisation d'électrodes à porphyrine a permis de doser un authentique flux sortant de NO à proximité de myocytes isolés perméabilisés avec un ionophore calcique, *in vitro* [22]. Le flux de NO sortant des myocytes (dosé par l'électrode à porphyrine) est stimulé par les agonistes β -adrénergiques, *in vitro* [22]. Cette stimulation est bloquée par un inhibiteur de NOS, et aussi par un anticalcique, la nifédipine. Ainsi, la stimulation du courant calcique par les agonistes β -adrénergiques peut activer la NOS (figure 2). Contrairement au NO exogène, ce NO endogène n'aurait pas d'effet en retour sur la stimulation β -adrénergique du courant calcique [6, 23]. Toutefois, l'inhibition de la NOS potentialise la réponse contractile à des concentrations sous-maximales d'isoprénaline, un agoniste β -adrénergique, dans les myocytes isolés [4, 5]. De plus, des inhibiteurs de NOS potentialisent la réponse contractile à l'isoprénaline et à la dobutamine, dans le cœur de chien [4, 5]. La stimulation β -adrénergique de la pro-

* GLOSSAIRE *

AMPc: adénosine monophosphate 3'-5' cyclique.

Dobutamine: agoniste β -adrénergique non sélectif.

GMPc: guanosine monophosphate 3'-5' cyclique.

Isoprénaline: agoniste β -adrénergique non sélectif.

LPS: lipopolysaccharide de la paroi de bactéries à Gram-négatif.

NO: monoxyde d'azote.

Effet inotrope: modification de la force maximale développée par le myocarde.

Effet chronotrope: modification du rythme des contractions cardiaques.

Effet lusitrope: modification de la vitesse de relaxation cardiaque.

Effet dromotrope: modification de la vitesse de conduction de l'excitation cardiaque.

eNOS: isoforme endothéliale de NO-synthase (gène NOS3).

iNOS: isoforme inducible de NO-synthase (gène NOS2).

nNOS: isoforme neuronale de NO-synthase (gène NOS1).

NPS: nitroprussiate de sodium.

OD: oreillette droite.

PDE2: phosphodiesterase de type 2, activée par le GMPc.

PDE3: phosphodiesterase de type 3, inhibée par le GMPc.

PK-GMPc: protéine kinase dépendante du GMPc.

VD: ventricule droit.

VG: ventricule gauche.

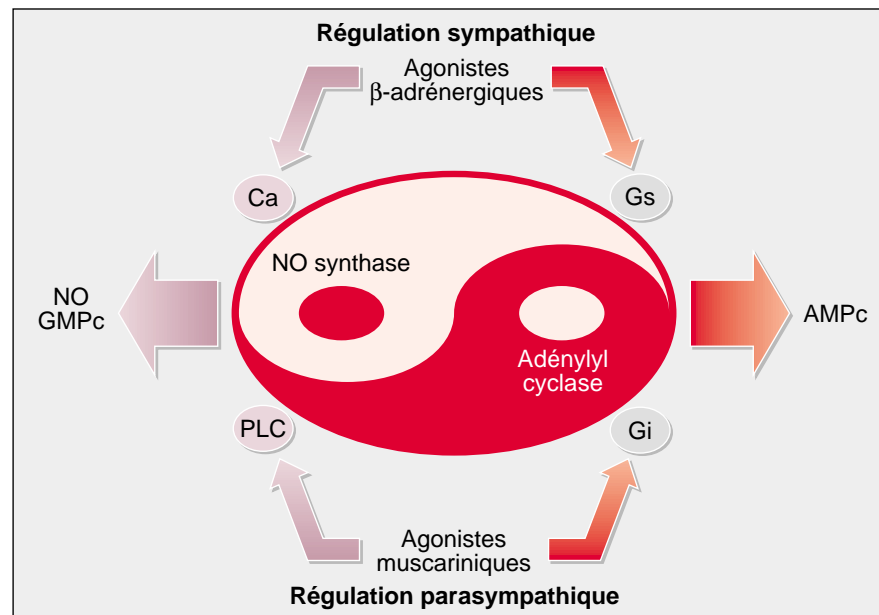


Figure 2. **Hypothèses de travail – mécanismes mis en jeu dans les myocytes cardiaques au cours des régulations sympathique et parasympathique.** Les agonistes β -adrénergiques, en activant une protéine G stimulatrice (Gs), stimulent l'activité de l'adénylyl cyclase qui synthétise l'AMPc. Ils peuvent aussi activer la production de NO par une NO-synthase dans les myocytes, en augmentant l'influx calcique (Ca). Les agonistes muscariniques, en activant une protéine G inhibitrice (Gi), s'opposent à la stimulation β -adrénergique de l'adénylyl cyclase. Ils peuvent aussi stimuler la production de NO par une NO-synthase. (D'après [4, 5, 20, 21].)

duction de NO pourrait agir comme contre-régulateur physiologique pour limiter l'effet inotrope positif des catécholamines dans le cœur.

L'activation des récepteurs muscariniques par le système parasympathique modifie plusieurs voies de seconds messagers dans le cœur [4-6, 11]. L'acétylcholine inhibe la stimulation β -adrénergique de l'adénylyl cyclase, enzyme produisant l'AMPc (figure 2). L'agoniste muscarinique provoque aussi une accumulation de GMPc, qui pourrait faire intervenir la NOS (figure 2). Mais, le flux sortant de NO (mesuré avec l'électrode à porphyrine) de myocytes ventriculaires n'est pas amplifié par l'acétylcholine, en l'absence d'un agoniste β -adrénergique [22]. En revanche, dans les myocytes du tissu nodal, l'inhibition de NOS abolit l'effet anti-adrénergique de l'acétylcholine sur le courant calcique [4-6]. Une activation de la PDE2 par le GMPc participerait à l'effet anti-adrénergique de l'acétylcholine. Dans les myocytes auriculaires de chat, l'inhibition du courant calcique par l'acétylcholine, résistante à l'inhibition de NOS, est suivie d'un rebond (une stimulation) durant le lavage de l'agoniste, qui est abolie par l'inhibition de NOS [24]. Toutefois, dans les myocytes auriculaires humains, les effets de l'acétylcholine sur le courant calcique ne sont pas modifiés par une inhibition de NOS, et sont attribués à l'inhibition de l'adénylyl cyclase [23]. Les résultats sont encore plus hétérogènes dans les myocytes ventriculaires [4-6] (figure 2). L'étude de souris dont le gène de la eNOS a été invalidé n'a pas permis d'unifier les interprétations: à l'inverse de Fischmeister *et al.* [25], Han *et al.* [26] montrent que l'effet anti-adrénergique de l'acétylcholine est absent dans les myocytes ventriculaires de ces animaux. *In vivo*, des expériences d'injection intracoronaire d'inhibiteurs de NOS chez le chien ont étendu le concept que l'effet antagoniste de la stimulation parasympathique sur la réponse inotrope aux catécholamines fait intervenir la production de NO dans le myocarde [4, 5]. De plus, les effets chronotrope et dromotrope négatifs du système parasympathique sont abolis par un inhibiteur de NOS, chez le chien (en présence d'un tonus sympathique,

[27]). Toutefois, l'origine du NO endogène (endothélial ou myocytaire) ne peut pas être déterminée dans ces études.

Rôle du NO endogène dans le cœur humain

Chez l'homme, la substance P stimule la NOS endothéliale, suggérant un rôle paracrine pour le NO. De fait, l'injection intracoronaire de substance P est suivie des mêmes effets sur la relaxation cardiaque chez l'homme que chez l'animal [3-5]. A l'inverse, l'injection intraveineuse d'un inhibiteur de NOS entraîne une diminution du volume d'éjection ventriculaire indépendante de la modification de la postcharge (augmentation de la pression artérielle) [28].

Les expériences sur l'animal suggèrent que les catécholamines activeaient une voie inotrope négative (stimulation de eNOS), qui limiterait leur effet inotrope positif (augmentation d'AMPc, voir ci-dessus). La protéine eNOS et son ARNm sont détectables dans des myocytes humains [29, 30]. Gauthier *et al.* [30] suggèrent l'implication d'un récepteur β 3-adrénergique dans la stimulation de eNOS et dans l'effet inotrope négatif dans le ventricule cardiaque humain (biopsies ventriculaires). Dans d'autres études, l'inhibition de NOS potentialise l'effet inotrope positif de la dobutamine (ou de l'isoprénaline) chez des patients en état d'insuffisance cardiaque (cardiomyopathie idiopathique dilatée, ou dysfonctionnements du ventricule gauche), mais pas chez les sujets normaux [5, 31]. Ce résultat suggère l'expression d'une isoforme inductible de NOS au cours de l'insuffisance cardiaque (Tableau I). La iNOS est souvent exprimée dans des situations de souffrance cardiaque. La iNOS est identifiée dans des biopsies myocardiques *post-mortem* de patients atteints d'infections graves (péritonites, médiastinites) (Tableau I), ainsi que dans le myocarde de patients souffrant de myocardite avec infiltration locale de cellules inflammatoires et augmentation des concentrations de cytokines circulantes [3-5, 32]. La iNOS est aussi présente dans les biopsies myocardiques de patients présentant une cardiomyopathie dilatée, première

cause de transplantation cardiaque (Tableau I).

Dans l'hypothèse d'une origine virale de cette cardiopathie, la production de NO myocardique pourrait limiter l'invasion virale dans la phase initiale de la maladie.

Après transplantation cardiaque, le rejet entraîne une production locale de cytokines qui induit l'expression de la iNOS dans les cellules inflammatoires, les cellules endothéliales microvasculaires et les myocytes. Chez l'homme, la présence de l'iNOS dans les biopsies myocardiques de patients transplantés [3, 5] est corrélée: (1) à l'altération de la fonction ventriculaire gauche et (2) à l'augmentation de la concentration de GMPc dans ces biopsies (Tableau I). Bien que suggestifs, ces éléments n'établissent pas que l'expression de iNOS soit corrélée au score de rejet. Plus intéressante est la découverte de l'expression de iNOS dans l'infarctus aigu du myocarde (Tableau I). Il est noté une expression de iNOS par les macrophages ayant afflué vers la zone infarctée [3-5]. Une augmentation locale de NO pourrait être bénéfique en induisant une production de protéines de choc thermique (souvent cytoprotectrices [33]), et une diminution de l'œdème autour de l'infarctus [3-5, 34]. A l'inverse, les biopsies myocardiques de patients indemnes de toute maladie cardiaque ne contiennent pas de iNOS (Tableau I) [3-5, 13].

L'expression de iNOS dans le myocarde serait donc un phénomène précoce survenant quelques heures après destruction de cellules myocardiques. Le rôle du NO dans la réparation et/ou la protection vis-à-vis d'une extension du processus destructeur reste à déterminer. Afin d'illustrer la dichotomie des effets de l'induction de la iNOS sur la fonction cardiaque, nous détaillons les résultats concernant le choc septique.

Rôle de la iNOS dans la dépression myocardique du choc septique

Le choc septique se caractérise par un dysfonctionnement cardiovasculaire et des défaillances multiviscérales dans un contexte septique [35].

Tableau I
MALADIES CARDIAQUES HUMAINES ET INDUCTION DE iNOS

Auteur	Patients	n
De Belder <i>et al.</i> , 1993 [3-5, 13]	– cardiomyopathie dilatée	17 (biopsies VD)
	– coronaropathie	7 (biopsies OD)
De Belder <i>et al.</i> , 1995 [3-5, 13]	– cardiomyopathie dilatée	14 (biopsies VD)
	– coronaropathie et maladie valvulaire	9 (biopsies VD)
Thoenes <i>et al.</i> , 1996 [3-5, 13]	– insuffisance cardiaque (NYHA III-IV)	19 (biopsies VG)
	– sepsis (autopsie)	6 (biopsies VG)
Lewis <i>et al.</i> , 1996 [3]		
Haywood <i>et al.</i> , 1996 [4, 5, 13]	– cœurs transplantés	10
	– cœurs de patients décédés de cause non cardiaque	11
	– insuffisants cardiaques	51 (biopsies VD)
Habbib <i>et al.</i> , 1996 [13]	– cardiomyopathie dilatée	21 (biopsies VD, VG)
	– ischémie myocardique	10 (biopsies VD, VG)
	– cœurs transplantés	9 (biopsies VD, VG)
Satoh <i>et al.</i> , 1997 [13]	– cardiomyopathie dilatée	24 (biopsies VD)
	– cardiomyopathie hypertrophiée	20 (biopsies VD)
	– cœurs sains	15 (biopsies VD)
Luss <i>et al.</i> , 1997 [13]	– biopsies myocardiques de tétralogie de Fallot	myocytes isolés, stimulés par des cytokines, <i>in vitro</i>

NOS: NO synthase; VD: ventricule droit; OD: oreillette droite; IR: immunoréactivité; iNOS mRNA: estimation après RT-PCR.

Les dysfonctionnements vasculaire et contractile myocardique contribuent à l'évolution du sepsis vers le choc septique et les défaillances d'organe [35, 36]. Les facteurs pro- et anti-inflammatoires, dont les niveaux sont modifiés au cours de cette maladie, règlent l'expression/activité de la iNOS. En effet, les médiateurs pro-inflammatoires (*tumor-necrosis-factor- α* , interleukine-1 β , interleukine-6, interféron- γ), tout comme le lipopolysaccharide (LPS), peuvent provoquer l'induction de iNOS dans les cellules cardiaques (cardiomyocyte, cellules endothéliales microvasculaires et endocardiques, fibroblastes, cellules musculaires lisses), et dans les cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles) [4, 5]. L'induction de iNOS (évaluée par *Northern blot*, *Western blot*, et dosage enzymatique) a été prouvée sur homogénats cellulaires et sur cellules entières *in vitro* [4, 5] et *in vivo* [37]. A l'inverse des facteurs pro-inflammatoires, le *transforming-growth-factor- β 1* (TGF- β 1), les glucocorticoïdes sont des modulateurs négatifs de l'expression de iNOS [4, 38]. Pour exemple, les souris transgéniques déficientes pour le gène *TGF- β 1* présentent un expres-

sion accrue de la iNOS dans divers tissus dont le cœur [38]. L'expression de la iNOS dans le tissu cardiaque est réglée de manière complexe au niveau transcriptionnel mais aussi au niveau post-transcriptionnel *in vitro* [4,5] et *in vivo* [37] (*Tableau II*). La production de NO biologiquement actif dépend du niveau d'expression de iNOS mais aussi de co-facteurs comme la tétrahydrobioptérine (THB4) [4, 39] ainsi que de la disponibilité du substrat (L-arginine) [4, 5]. Par exemple, le TGF- β 1 peut, suivant le type cellulaire et le stimulus pro-inflammatoire, inhiber la transcription du gène *NOS2*, diminuer la stabilité de l'ARNm codant pour la iNOS, accélérer la dégradation de la iNOS, activer l'arginase, ou diminuer la production de TBH4 [38]. Ces régulations complexes de «l'activité» de la iNOS incitent à parler d'une «voie métabolique» de la iNOS (*Tableau II*). Connaître la signification biologique de l'induction de la iNOS est la question la plus importante pour les cliniciens car elle conditionne le sens (activation ou inhibition) de la manipulation pharmacologique de la voie de la iNOS. Le cœur mérite certainement une

mention particulière dans ce débat, puisque la capacité du muscle cardiaque à exprimer la iNOS dépasse celles des autres muscles striés (après stimulation par le LPS chez le rat [40, 41]).

Conséquences fonctionnelles de l'activation de la voie de la iNOS cardiaque

Dans la paroi vasculaire, l'induction de la iNOS joue un rôle fonctionnel dans la vasodilatation associée au choc septique [42]. Dans le cœur, trois catégories de données se dégagent. Le NO produit par la iNOS, soit est sans effet, soit inhibe la contractilité basale, soit atténue la réponse contractile aux agonistes β -adrénergiques [3-5, 13]. Bien que variés, ces résultats permettent de conclure que, dans certaines situations, une production mesurable de NO par la iNOS cardiaque entraîne un dysfonctionnement contractile, dont le mécanisme le plus étudié est l'activation de guanylyl cyclase [4, 5]. L'activité de iNOS peut aussi inhiber la respiration cellulaire et l'utilisation de l'oxygène, un aspect métabolique

Tableau II		
RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS IMPLIQUÉS DANS LA VOIE MÉTABOLIQUE DE LA iNOS		
Gène	Augmentation de l'expression de l'ARNm	Diminution de l'expression de l'ARNm
<i>NOS2</i>	LPS interleukine 1 β TNF- α interféron- γ ester de phorbol (*)	Glucocorticoïdes rétinoïdes TGF- β salicylates
<i>TAC</i> (transporteur d'acides aminés cationiques)	interféron- γ interleukine 1 β insuline privation en L-arginine	Glucocorticoïdes
<i>Arginase II</i>	LPS	
<i>GTP cyclohydrolase I</i>	LPS interleukine 1 TNF- α interféron- γ AMPc réserpine (déplétion en catécholamines) Insuline	Glucocorticoïdes TGF- β interleukine 4 interleukine 10

LPS: lipopolysaccharide; (*) par activation de protéine-kinase C (d'après [4, 5, 54, 55]).

rencontré dans le choc septique [43]. De plus, une synthèse de NO par la iNOS peut provoquer la genèse de peroxynitrite, aux propriétés oxydantes, et participerait de cette manière au *stress oxydatif* observé durant cette maladie. Enfin, le TGF- β 1 atténué à la fois le dysfonctionnement contractile et l'expression de la iNOS induits par l'interleukine-1 dans les myocytes cardiaques de rat, *in vitro* [44]. Ces données sont à l'origine des études d'inhibition de la iNOS *in vivo* dans des modèles de choc septique.

Des études chez l'animal *in vivo* [45] ou chez des patients en choc septique [46] ont montré que l'administration d'inhibiteurs de NOS s'accompagnait d'une diminution du débit cardiaque, probablement consécutive à la vasoconstriction coronaire, et chez l'animal, d'une aggravation de la mortalité [47]. Le manque de sélectivité des inhibiteurs utilisés a été contourné par l'étude de souris transgéniques déficientes pour le gène *NOS2* (*NOS2*^{-/-}). En effet, l'hypotension artérielle et le

taux de mortalité, observées après administration de LPS, sont nettement réduits chez ces souris *NOS2*^{-/-} par comparaison avec les témoins [42]. Néanmoins, dans un contexte septique différent (administrations d'un extrait de *Propionobacterium acnes* suivie de LPS), la mortalité et les lésions histologiques sont identiques chez les souris sauvages et les souris *NOS2*^{-/-} [42]. En fait, l'activation de la iNOS semble jouer des rôles différents suivant la nature de l'agent infectieux (viral, bactérien ou parasitaire) [42]. Alors que l'activité de iNOS aggrave les lésions inflammatoires dans les pneumopathies dues au virus grippal, elle semble améliorer la survie dans la tuberculose, la leishmaniose et la toxoplasmose, chez les rongeurs.

Ces observations introduisent les effets potentiellement bénéfiques de l'induction de iNOS pour le cœur, dans des conditions pathologiques [48]: (1) une production soutenue et intense de NO exercerait des effets cyostatiques et cytotoxiques, qui concourraient à l'élimination des

agents infectieux [42, 48]; (2), la iNOS pourrait limiter l'action des neutrophiles. Le temps de transit des neutrophiles dans les coronaires est prolongé après injection de LPS [49], avec pour conséquences l'apparition de lésions microvasculaires endothéliales et une augmentation de la perméabilité vasculaire [42]. *In vitro*, le NO inhibe l'adhérence des neutrophiles [50], et inactive la NADPH oxydase, l'enzyme responsable de la « rafale » oxydative de ces cellules [51]. *In vivo*, le temps de transit des neutrophiles (dans le foie et les poumons) est significativement augmenté dans les souris *NOS2*^{-/-} après injection de LPS, par comparaison avec des animaux témoins [52]. Ainsi, la iNOS induite dans l'endothélium microvasculaire, et/ou dans les neutrophiles eux-mêmes, exercerait un contrôle négatif sur le recrutement des neutrophiles dans un foyer inflammatoire [3-5, 13, 52]. A l'échelle de l'organe, l'activation de la voie de la iNOS semble donc jouer des rôles variés, en fonction de la nature de l'infection, du type de

réponse inflammatoire, et du contexte neurohormonal. Il en serait de même à l'échelle cellulaire où le potentiel oxydo-réducteur pourrait orienter les effets du NO produit par la iNOS [11, 53]. Une cellule dotée de niveaux adéquats de thiols libres, et de glutathion réduit, serait en mesure d'éliminer le peroxy-nitrite issu de la combinaison du NO avec l'anion superoxyde. A l'inverse, une détoxification trop lente du peroxy-nitrite autoriserait ses effets oxydants, en particulier sur la superoxyde dismutase, ce qui provoquerait une amplification du stress oxydatif, et entraînerait, en particulier, un blocage irréversible de la respiration mitochondriale.

Conclusions et perspectives

Les vaisseaux restent une cible de choix pour le NO. Mais, du stade de l'hypothèse, l'implication du NO dans la fonction cardiaque est devenu un fait expérimental, *in vivo* et *in vitro*. Le cœur, mûr et différencié, dispose d'une variété de sources de NO endogène, et de plusieurs cibles pour le NO impliquées dans l'activité contractile. Certes, l'importance relative de chacune de ces sources et de ces cibles demanderont à être décrites de manière plus détaillée. Il serait bon de trouver un consensus à propos du rôle de la eNOS du myocyte car l'activité de cette protéine pourrait intervenir dans différents aspects de la physiologie cardiaque. Les divergences actuelles s'expliquent, au moins pour une part, par des différences entre les préparations utilisées et, pour une autre part, par des différences de protocoles expérimentaux. Rappelons que la découverte du NO est récente, et que sa chimie en solution n'est pas toujours très détaillée. L'issue n'est pas minime, puisque la production de NO endogène est modifiée dans plusieurs maladies cardiovasculaires. Le défi pour les chercheurs et les cliniciens sera de comprendre le rôle bénéfique ou délétère de l'induction de la iNOS cardiaque en fonction de l'agent infectieux, de l'évolution de l'infection et du type cellulaire du tissu cardiaque qui exprime la iNOS ■

Remerciements

Nous remercions N. Abi Gerges, et les Docteurs J. Winicki, J.M. Chesnais, R. Fischmeister, et V. Veksler.

RÉFÉRENCES

1. Furchgott RF. The discovery of endothelium-dependent relaxation. *Circulation* 1993; 87 (suppl V) : V3-8.
2. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 399-402.
3. Shah AM. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 847-67.
4. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996; 76: 363-80.
5. Balligand JL, Cannon PJ. Nitric oxide synthase and cardiac muscle. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1846-58.
6. Méry PF, Abi Gerges N, Vandecasteele G, Jureviscius J, Fischmeister R. Muscarinic regulation of the L-type calcium current in isolated cardiac myocytes. *Life Sci* 1997; 60: 113-20.
7. Takasago T, Imagawa T, Furukawa K, Ogurusu T, Shigekawa M. Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation. *J Biochem* 1991; 109: 163-70.
8. Iino S, Cui Y, Galione A, Terrar DA. Actions of cADP-ribose and its antagonists on contraction in guinea pig isolated ventricular myocytes. Influence of temperature. *Circ Res* 1997; 81: 879-84.
9. Kumar R, Namiki T., Joyner RW. Effects of cGMP on L-type calcium current of adult and newborn rabbit ventricular cells. *Cardiovasc Res* 1997; 33: 573-82.
10. Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 1998; 279: 234-7.
11. Wolin MS, Hintze TH, Shen W, Mohazab-H KM, Xie YW. Involvement of reactive oxygen and nitrogen species in signaling mechanisms that control tissue respiration in muscle. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 934-9.
12. Musialek P, Lei M, Brown HF, Paterson DJ, Casadei B. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, If. *Circ Res* 1997; 81: 60-8.
13. Paulus, W. Nitric oxide and cardiac contraction: clinical studies. In: Shah A, ed. *Endothelial modulation of cardiac function*. Vill Harwood: Academic Publishers, 1997: 35-51.
14. MacDonell KL, Diamond J. Cyclic GMP-dependent protein kinase activation in the

absence of negative inotropic effects in the rat ventricle. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1425-35.

15. Nawrath H, Bäummer D, Rupp J, Oelert H. The ineffectiveness of the NO-cyclic GMP signaling pathway in the atrial myocardium. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 3061-7.
16. Crystal GJ, Gurevicius J. Nitric oxide does not modulate myocardial contractility acutely in *in situ* canine hearts. *Am J Physiol* 1996; 270: H1568-76.
17. Wyeth RP, Temma K, Seifen E, Kennedy RH. Negative inotropic actions of nitric oxide require high doses in rat cardiac muscle. *Pflug Arch* 1996; 432: 678-84.
18. Andries LJ, Brutsaert DL, Sys SU. Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. *Circ Res* 1998; 82: 195-203.
19. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J Clin Invest* 1997; 100: 2146-52.
20. Pinsky DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res* 1997; 81: 372-9.
21. Prendergast BD, Sagach VF, Shah AM. Basal release of nitric oxide augments the Franck-Starling response in the isolated heart. *Circulation* 1997; 96: 1320-9.
22. Kanai AJ, Mesaros S, Finkel MS, Oddis CV, Birder LA, Malinski T. β -adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1997; 273: C1371-7.
23. Vandecasteele G, Eschenhagen T, Fischmeister R. Role of the NO-cGMP pathway in the muscarinic regulation of the L-type Ca^{2+} current in human atrial myocytes. *J Physiol Lond* 1998; 506: 653-63.
24. Wang YG, Rechenmacher CE, Lipsius SL. Nitric oxide signaling mediates stimulation of L-type Ca^{2+} current elicited by withdrawal of acetylcholine in cat atrial myocytes. *J Gen Physiol* 1998; 111: 113-25.
25. Fischmeister R, Vandecasteele G, Abi Gerges N, Verde I, Eschenhagen T, Méry PF. Muscarinic regulation of the heart: NO news is bad news. *J Physiol Lond* 1998; 511P: 2S.
26. Han X, Kubota I, Feron O, Opel DJ, Arstall MA, Zhao YY, Huang P, Fischman MC, Michel T, Kelly RA. Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte ICA-L is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6510-5.
27. Elvan A, Rubart M, Zipes DP. NO modulates autonomic effects on sinus discharge rate and AV nodal conduction in open-chest dogs. *Am J Physiol* 1997; 272: H263-71.
28. Stamler J, Loh E, Roddy M, Currie K, Creager M. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89: 2035-40.

RÉFÉRENCES

29. Wei CM, Jiang SW, Lust JA, Daly RC, McGregor CGA. Genetic expression of endothelial nitric oxide synthase in human atrial myocardium. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 346-50.
30. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Kandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H. The negative inotropic effect of β 3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 1999 (sous presse).
31. Hare JM, Givertz MM, Creager MA, Colucci WS. Increased sensitivity to nitric oxide synthase inhibition in patients with heart failure: potentiation of β -adrenergic inotropic responsiveness. *Circulation* 1998; 97: 161-6.
32. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994; 72: 561-6.
33. Benjamin I, McMillan D. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998; 83: 117-32.
34. Williams M, Taft C, Rammath S, Zhao Z, Vinten-Johansen J. Endogenous nitric oxide protects against ischemia-reperfusion injury in the rabbit. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 79-86.
35. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 457-69.
36. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227-42.
37. Groeneveld PH, Kwappenberg KM, Langermans JA, Nibbering PH, Curtis L. Relation between pro- and anti-inflammatory cytokines and the production of nitric oxide (NO) in severe sepsis. *Cytokine* 1997; 9: 138-42.
38. Vodovotz Y. Control of nitric oxide production by transforming growth factor- β 1. *Nitr Ox Biol Chem* 1997; 1: 3617.
39. Simmons WW, Ungureanu-Longrois D, Smith GK, Smith TW, Balligand RA. Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport. *J Biol Chem* 1996; 271: 23928-37.
40. Boczkowski J, Lanone S, Ungureanu-Longrois D, Danialou G, Fournier T, Aubier M. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase by *E. Coli* endotoxemia in rats. Role on diaphragmatic contractile function. *J Clin Invest* 1996; 98: 1550-9.
41. Sambe A, Ungureanu-Longrois D, Danialou G, Lanone S, Benessiano J, Aubier M, Boczkowski J. Role of nitric oxide on diaphragmatic contractile failure during *E. coli* endotoxemia in rats. *Comp Biochem Physiol* 1998; 119A: 167-75.
42. Nathan C. Inducible nitric oxide: What difference does it make. *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-23.
43. Geng YJ, Hansson GK, Holme E. Interferon-gamma and tumore necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1992; 71: 1268-76.
44. Roberts A, Vodovotz Y, Roche N, Sporn M, Nathan C. Role of nitric oxide in antagonistic effects of TGF- β and interleukin-1 β on the beating rate of cultured cardiac myocytes. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1921-30.
45. Avontuur JA, Bruining HA, Ince C. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ Res* 1995; 76: 418-25.
46. Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338: 1557-8.
47. Cobb JP, Danner RL. Nitric oxide and septic shock. *JAMA* 1996; 275: 1192-6.
48. Krönke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection-How, why, when, and where? *Nitr Ox Biol Chem* 1997; 1: 107-20.
49. Goddard CM, Allard MF, Hogg JC, Herbertson MJ, Walley KR. Prolonged leukocytes transit time in coronary microcirculation of endotoxemic pigs. *Am J Physiol* 1995; 269: H1389-97.
50. Kubes P, Kurose I, Granger DN. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in posts ischemic venules. *Am J Physiol* 1994; 267: H931-7.
51. Fujii H, Ichimori K, Hoshiaki K, Nakazawa H. Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembly process. *J Biol Chem* 1997; 272: 32773-8.
52. Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, Reinhardt PH, MacMicking JD, Nathan C, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J* 1997; 11: 955-64.
53. Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol Cell Physiol* 1996; 271: C1424-37.
54. Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H, Mayer B. Biosynthesis of nitric oxide: dependence on pteridine metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1996; 127: 97-135.
55. Hyatt SL, Aulak KS, Malandro M, Kilberg MS, Hatzoglou M. Adaptive regulation of the cationic amino acid transporter-1 (Cat-1) in FaO cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 19951-7.

Summary

Is NO becoming a word from the heart?

Nitric oxide (NO) is involved in the endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle. This messenger may also play a role in the regulation of cardiac contractility. Indeed, various targets for NO have been described in cardiac myocytes. Stimulation of the heterodimeric guanylyl cyclase by NO leads to the cGMP-dependent modulation of phosphodiesterases, cGMP-dependent protein kinase, and ionic channels. In addition, NO could regulate intracellular calcium homeostasis and mitochondrial respiration in a cyclic GMP-independent manner. In light of this variety of effects in the cardiac myocytes, it is not surprising that NO is often, but not always, found to modulate cardiac contractility. The endogenous production of NO, by constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS) seems to participate in various aspects of cardiac homeostasis. For instance, myocardial NO-synthases can control the efficiency of the sympathetic and parasympathetic systems in the heart. The relevance of the different sources of NO in the heart is the object of ongoing research. Yet, NO may be viewed as a paracrine factor (when produced by the endothelium) and/or as an autocrine factor (when produced by the myocyte). The expression of an inducible isoform of NOS (iNOS) in various cardiac cell types, was shown to occur in both experimental and human cardiac pathologies. However, while the effects of iNOS induction have been described in detail *in vitro*, the pathophysiological consequences of iNOS induction *in vivo* are not fully understood. Thus, it is still unclear whether iNOS activity in the heart should be considered as beneficial or deleterious.

TIRÉS À PART

P.F. Méry.