

Le monoxyde d'azote : un médiateur gazeux aux multiples facettes

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre gazeux que les cellules de mammifères sont capables de synthétiser à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal chimiquement équivalent du groupement guanidine de la L-arginine [1]. Sa forte affinité pour l'oxygène moléculaire explique sa brève durée de vie, de l'ordre de quelques secondes en solution. NO, ou un intermédiaire nitrosylaté, a d'abord été identifié comme le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF : *endothelium derived relaxing factor*), médiateur de nombreuses substances vasorelaxantes comme les bradykinines, l'histamine, la sérotonine, l'acétylcholine et l'ATP (figure 1). Comme les « nitrovasodilatateurs » utilisés dans le traitement de l'insuffisance coronarienne et de l'hypertension artérielle grave (trinitrine et nitroprussiate de sodium), NO, synthétisé par la cellule endothéliale, stimule une guanylate cyclase soluble et augmente la concentration en GMP cyclique de la cellule musculaire lisse vasculaire. L'activation consécutive de protéine kinases GMP cyclique-dépendantes modifie l'état de phosphorylation de nombreuses protéines du muscle lisse vasculaire, notamment les chaînes légères de myosine. Cette réponse peut être inhibée par le bleu de méthylène (inhibiteur de la guanylate cyclase soluble) ou par des protéines à groupement prosthétique hémique, dont l'affinité pour NO est très forte. L'injection intraveineuse chez l'homme et chez l'animal de monométhyl-L-arginine, un inhibiteur de la synthèse de NO, induit une élévation immédiate et significative de la pression artérielle, suggérant l'existence d'un tonus basal vasodilatateur physiologique [2]. L'atténuation de l'effet vasorelaxant de l'acétylcholine sur les artères bronchiques de sujets hypertendus a d'ailleurs conduit à envisager un défaut de synthèse de NO dans certaines formes d'hypertension artérielle essentielle [3].

NO est peut-être aussi impliqué dans d'autres situations pathologiques mettant en jeu l'endothélium. Ainsi, l'augmentation brutale de sa libération par la cellule endothéliale en réponse aux lipopolysaccharides d'*Escherichia coli* pourrait contribuer aux perturbations hémodynamiques précoces du choc septique [4]. Un autre effet de cette libération de NO par la cellule endothéliale est de favoriser l'adhérence leucocytaire, étape essentielle de la réaction inflammatoire (*m/s* n° 7, vol. 7, p. 753). Par ailleurs, la suppression de l'effet vasorelaxant de l'acétylcholine sur la circulation pulmonaire chez le rat placé dans un environnement hypoxique et la levée de cette suppression lorsque l'animal est replacé en atmosphère normoxique suggèrent que l'hypertension artérielle pulmonaire induite par l'hypoxie alvéolaire chez la plupart des mammifères pourrait être en par-

tie la conséquence d'une inhibition de la synthèse de NO [5]. Enfin, la sécrétion endothéliale de NO semble aussi perturbée chez l'animal rendu diabétique ainsi que dans les artères coronaires de patients souffrant d'athérosclérose.

Un second lieu de synthèse important de NO est le macrophage et le polynucléaire [6, 7]. La sécrétion de NO par le macrophage est stimulée de façon synergique par les lipopolysaccharides bactériens et l'interféron γ . NO pourrait agir directement comme agent cytotoxique ou, indirectement, en élevant la concentration intracellulaire en GMP cyclique. En effet, les nucléotides cycliques sont impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions du macrophage (mobilité, phagocytose, réponse aux lymphokines), et la concentration intracellulaire en GMP cyclique du macrophage est fortement augmentée lors-

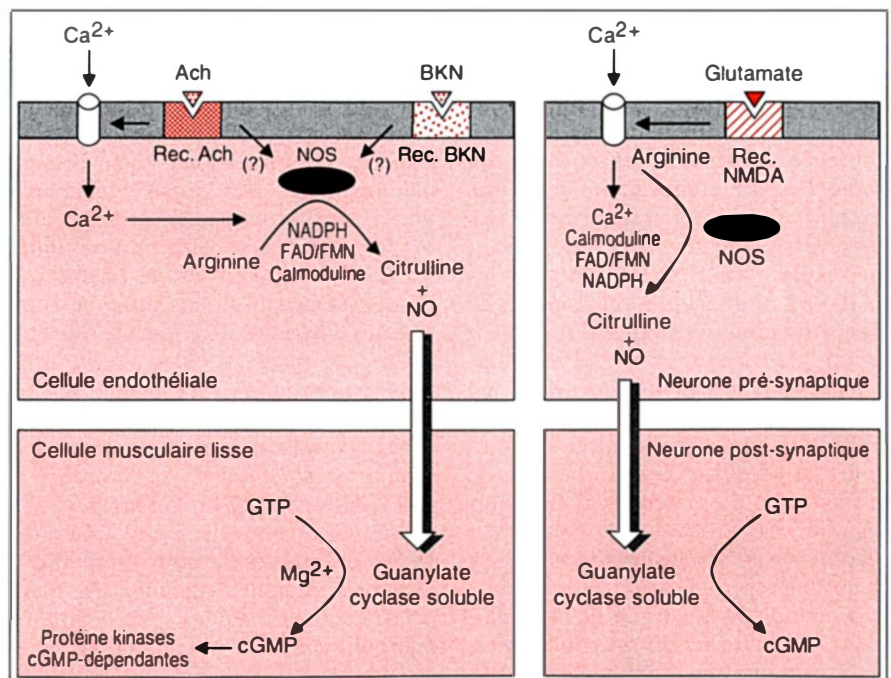


Figure 1. Représentation des interactions impliquant NO entre : à gauche, la cellule endothéliale et la cellule musculaire lisse. A droite, deux neurones pré- et post-synaptiques. Ach : acétylcholine, BKN : bradykinine, NMDA : N méthyl D-aspartate ; NOS : NO synthétase.

que celui-ci est mis en présence de substrats précurseurs de NO.

Récemment, NO a aussi été caractérisé dans le tissu nerveux, comme médiateur de l'action d'un acide aminé excitateur important, l'acide glutamique [8] (figure 1). La liaison de ce dernier à son récepteur neuronal de type NMDA stimule la synthèse de NO. NO n'est pas un neurotransmetteur classique. En effet, outre sa nature gazeuse, il n'est pas stocké dans des vésicules présynaptiques et il ne reconnaît pas de récepteurs membranaires post-synaptiques. Comme pour le muscle lisse et le macrophage, il augmente la concentration intracellulaire en GMP cyclique de la cellule post-synaptique. Un excès de production de NO, toxique pour le neurone à forte concentration, pourrait être l'un des facteurs responsables de la mort neuronale dans les accidents vasculaires cérébraux et dans des affections neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Huntington [9, 10].

L'enzyme responsable de la synthèse de NO (NOS) existe sous au moins deux isoformes différentes. La première, dont l'ADN complémentaire n'est pas encore cloné, est active sous forme dimérique et inductible par les lipopolysaccharides ou l'interféron γ . Immunologiquement distincte de la seconde, elle exige comme cofacteurs le NADPH, le FAD et le FMN [11]. L'isoforme constitutivement exprimée est présente dans le tissu nerveux et l'endothélium. Elle requiert, pour son activation, les mêmes cofacteurs plus le calcium et la calmoduline. En immunohistochimie, cette isoforme n'est détectable que dans les cellules endothéliales et certaines populations cellulaires du système nerveux, notamment le cortex, le *corpus striatum*, le cervelet, les extrémités de fibres nerveuses présentes dans l'hypophyse postérieure et issues des noyaux supra-optique et paraventriculaire de l'hypothalamus, certains neurones des plexus myo-entériques et les cellules ganglionnaires de la médullosurrénale. L'ADN complémentaire codant pour cette isoforme a récemment été élégamment cloné [12], après criblage d'une banque de cerveau de rat par un produit de PCR obtenu en utilisant des oli-

gonucléotides dégénérés synthétisés à partir d'une séquence polypeptidique triptique. L'un des clones isolés possède une phase de lecture ouverte de 4 287 bases, correspondant à une protéine de 1 429 acides aminés (160 kDa). L'ADN complémentaire reconnaît en *Northern blot*, parmi les ARN extraits de cervelet, un transcrite de 10,5 kb. Exprimé après transfection dans des cellules rénales humaines, il est traduit en une protéine reconnue par l'anticorps utilisé pour la purification. Ces cellules transfectées sont capables de produire du NO à partir d'arginine. Leur concentration en GMP cyclique augmente après synthèse endogène de NO. Cette activité enzymatique est perdue en l'absence de NADPH, de calcium, ou en présence d'un antagoniste de la calmoduline. Enfin, en hybridation *in situ*, le transcrite est détecté dans les parties du système nerveux où est présente la protéine en immunohistochimie.

L'analyse de la séquence polypeptidique confirme l'existence de sites de fixation pour le NADPH, le FAD, le FMN, la calmoduline et celle d'un site consensus de phosphorylation par une protéine kinase AMP cyclique-dépendante, connue pour contrôler aussi l'activité de l'enzyme. L'un des points inattendus de cette analyse est la démonstration d'une forte homologie de séquence entre la partie COOH terminale de NOS et deux enzymes utilisant comme cofacteurs le NADPH et les noyaux iso-alloxazine transporteurs d'électrons du FAD et du FMN : la cytochrome P450 réductase de rat (58 % d'analogie) et la sulphite réductase d'*Escherichia coli* (49 %). Un autre résultat important est la confirmation récente [13, 14] de l'identité des enzymes NOS et NADPH diaphorase. L'activité NADPH diaphorase caractérise certaines populations neuronales normales, des populations de neurones résistants à l'hypoxie ou à un excès d'acide glutamique, et certaines populations de neurones qui survivent sélectivement dans les maladies d'Alzheimer et de Huntington. La démonstration de cette identité constitue une preuve supplémentaire en faveur du rôle important mais encore indéterminé de NO dans la physio-

pathologie des accidents vasculaires cérébraux et de certaines affections neurodégénératives. L'une des hypothèses actuelles est que ces populations de neurones résistants auraient sélectivement développé des mécanismes biochimiques protecteurs vis-à-vis de la toxicité de NO.

T.-L. M.

1. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990 ; 30 : 535-60.
2. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989 ; ii : 997-9.
3. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990 ; 323 : 22-7.
4. Salvemini D, Korbut R, Anggard E, Vane J. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by *Escherichia coli* lipopolysaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 2593-7.
5. Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P, Chabrier PE. Loss of endothelium-dependent activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1991 ; 87 : 155-62.
6. Marletta MA. Nitric oxide : biosynthesis and biological significance. *Trends Biol Sci* 1989 ; 14 : 488-92.
7. Yui Y, Hattori R, Kosuga K, et al. Calmodulin independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 3369-71.
8. Garthwaite JG. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991 ; 14 : 60-7.
9. Taylor T. A lot of « excitement » about neurodegeneration. *Science* 1991 ; 252 : 1380-1.
10. Hoffman M. A new role for gases : neurotransmission. *Science* 1991 ; 252 : 1788.
11. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase : an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 7773-7.
12. 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.
13. Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 2811-4.
14. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 7797-801.