

NO - Monoxyde d'azote

- Introduction.
- Synthèse, régulation, dégradation.
- Les effets du NO:
 - Aspects biochimiques et cellulaires.
 - Effets cardiovasculaires.
 - NO et système nerveux.
 - NO et réponses inflammatoires.
- Approche des cibles thérapeutiques.

NO/intro : 1

Limulus polyphemus
Haemocytes aggregation
Radomski et al. 1991

Rhodnius prolixus
Blood sucking

Locusta migratoria
Neuronal migration
Haase and Bicker 2003

Photuris
Bioluminescence
Trimmer et al. 2001

Drosophila melanogaster
Organ size during development
Kuzin et al. 1996, 2000
Synaptogenesis in the developing visual system
Gibbs and Truman 1998
Hypoxia
Wingrove and O'Farrel, 1999
Immune response
Nappi et al. 2000, Silverman 2003
Fluid transport regulation in Malpighian tubule
Dow et al. 1994

Bombyx mori
Immunity
Choi et al. 1995

Manduca sexta
Olfaction
Nighorn et al. 1998

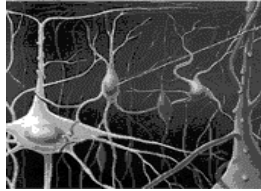
Anopheles stephensi
Defense
Luckhart et al. 1998

Rôles du NO dans le monde animal

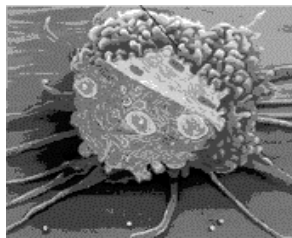
Principales fonctions du NO chez l'homme

Introduction (2)

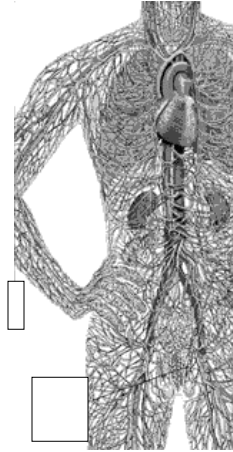
Système cardiovasculaire



Neurones



Macrophages



Un peu d'histoire...

Introduction (3)



Jan-Baptista Van Helmont
1580-1644

- 1620 : Synthétisé pour la première fois par J-B Van Helmont

$$\text{Cu} + \text{HNO}_3 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$$
- 1867 : le nitrite d'amyl permet de diminuer la pression sanguine
- 1914-1918 : remplir les canons de nitroglycérine entraînait des chutes de tension! Premières pilules de nitroglycérine pour le traitement de l'angine de poitrine.

Un peu d'histoire... Introduction (4)

Alfred Nobel suffered from angina pectoris and was prescribed nitroglycerine. In a letter to a friend he wrote:

det liden for dem Adels ironi og
nag forandring af iindretten. De kaldte
den Triniteten for at ej skoen
spatshare alle publik.

"It sounds like the irony of fate that I have been prescribed nitroglycerine internally. They have named it Trinitrin in order not to upset pharmacists and the public.

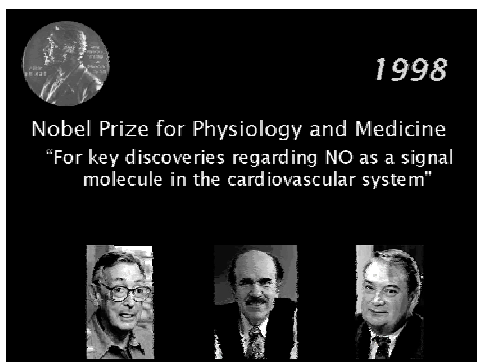
Your affectionate friend,

A. Nobel"

Un peu d'histoire...suite...

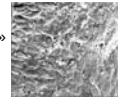
Introduction (5)

- 1992 : Le NO est déclaré « Molécule de l'année » par le magazine scientifique « Science »
- 1998 : Le Prix Nobel est attribué aux Prs Furchgott, Ignarro et Murad



Furchgott's sandwich :

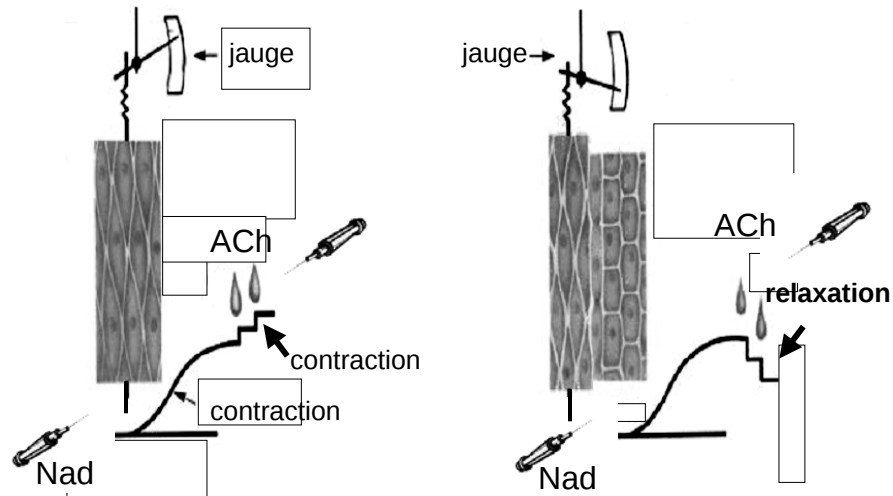
« endothélium »



- découverte d'un facteur relaxant libéré par l'endothélium: l'EDRF

Aorte sans endothélium

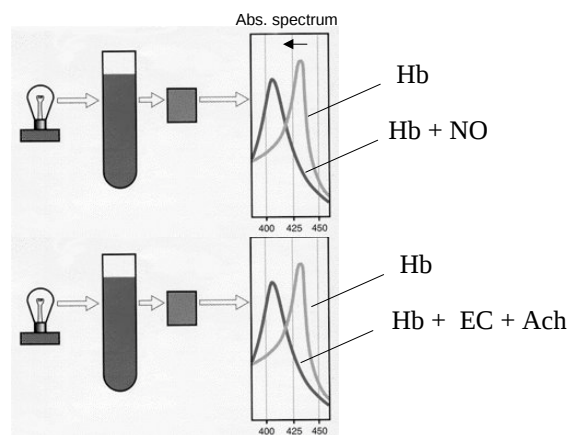
Aorte avec endothélium intact



Ignarro's spectral analysis

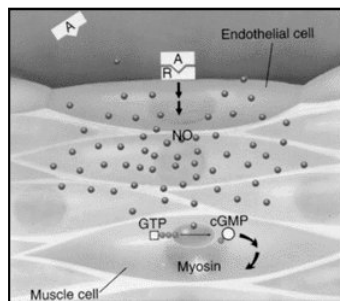
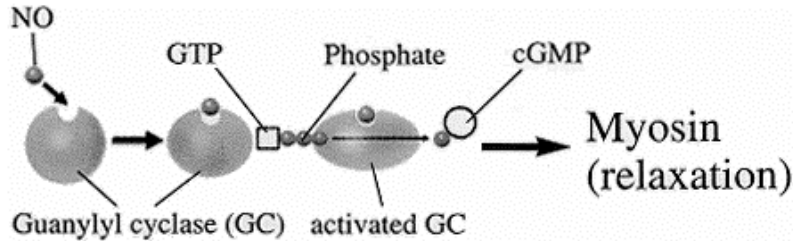
Ignarro's experiment

- découverte de l'identité chimique de l'EDRF : le NO



Murad's enzyme activation

~~Murad's experiment~~

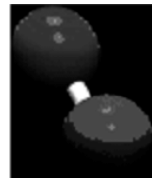


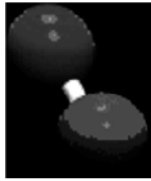
- découverte du mode d'action de l'EDRF/NO:
- l'activation de la guanylate cyclase

NO : Propriétés physico-chimiques

Propriétés physico-chimiques

- Le NO est un gaz (liquide à -152°C , solide à -164°C)
- Le NO est un radical (nombre impair d'électrons : $11e^- >> \text{O}_2 :12$), relativement instable
- Faible solubilité dans l'eau ($1,7 \text{ mmol/l}$ à 25°C)
- Composé lipophile (passage aisé à travers les membranes), hautement diffusible





NO - Monoxyde d'azote

- Introduction.
- Synthèse, régulation, dégradation.
- Les effets du NO:
 - Aspects biochimiques et cellulaires.
 - Effets cardiovasculaires.
 - NO et système nerveux.
 - NO et réponses inflammatoires.
- Approche des cibles thérapeutiques.

NO/Synthèse/régulation/dégradation : 1

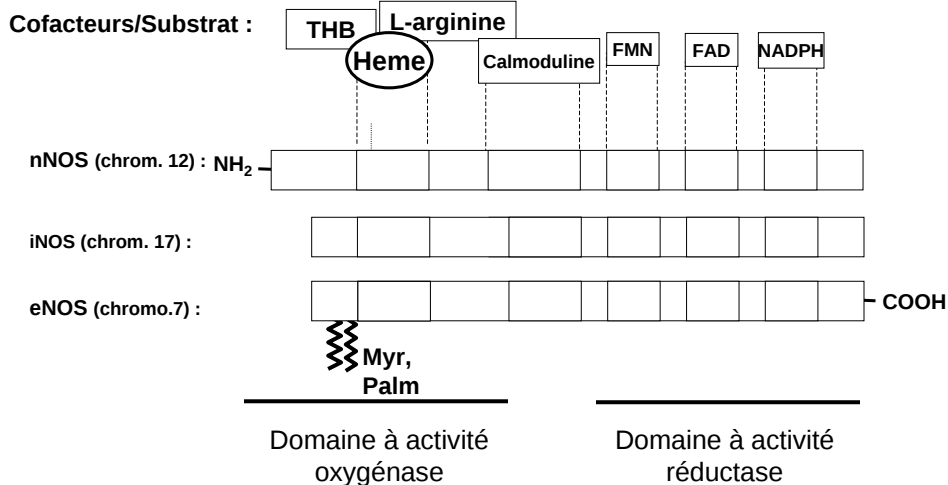
Les NO synthases

~~Les NO-synthases (1)~~

- eNOS :** NO synthase endothéliale ou NOS3
- constitutive,
 - activée par le Ca^{2+} et/ou par phosphorylations
 - principalement dans l'endothélium vasculaire mais aussi dans les myocytes cardiaques, les cellules mésangiales rénales, les plaquettes,....
- nNOS :** NO synthase neuronale ou NOS1
- constitutive, activée par le Ca^{2+}
 - principalement dans le système nerveux et le muscle squelet.
- iNOS :** NO synthase inductible ou macrophagique ou NOS2
- inductible par des agents proinflammatoires et des endotoxines (LPS, interféron γ , (IL1 β , TNF α , ...))
 - principalement dans les macrophages et les cellules musculaires lisses,...)

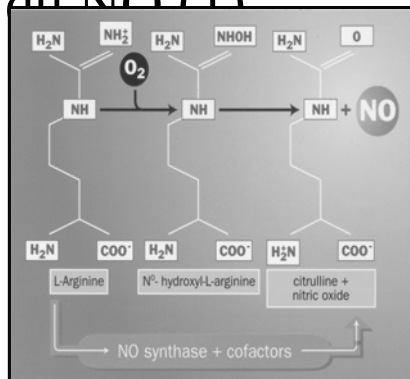
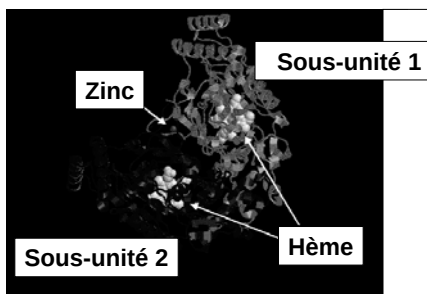
Les NO synthases

Les NO-synthases (2)



La synthèse du NO

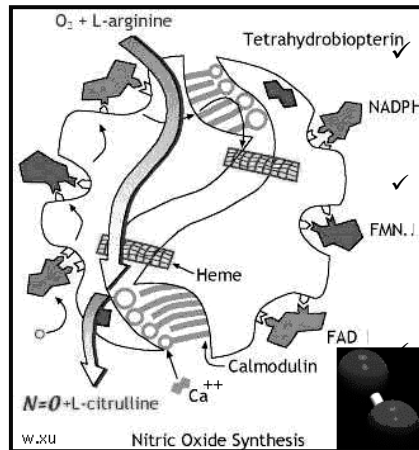
La synthèse du NO (1)



- ✓ Homodimère (PM monomère :130-135 kD)
- ✓ Chaque monomère comporte deux domaines: oxygénase et réductase

La synthèse du NO

La synthèse du NO (2)



Substrat / Produits :

L-arginine , O₂ / L-citrulline, NO

Cofacteurs et groupements

prosthétiques :

NADPH, FAD, FMN, Hème, THB, CaM

Inhibiteur compétitif endogène:

ADMA

Les inhibiteurs de la NO synthase

Les inhibiteurs de NOS

- Analogues méthylés de l'arginine:

- Manque de spécificité pour les différentes isoformes de la NOS
- Faux substrat – compétition avec la L-arginine

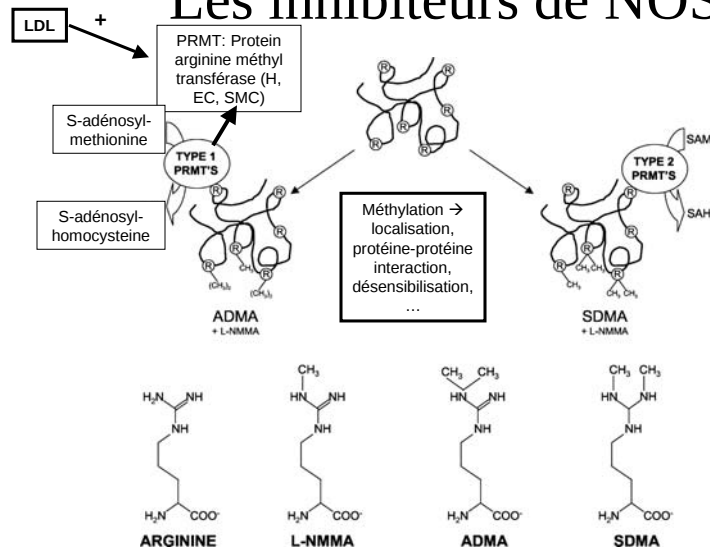
→ Outils expérimentaux.

- ADMA (Asymmetric DiMethylArginine) :

- Inhibiteur endogène
- L'ADMA est issue du métabolisme de protéines contenant des arginines méthylées.

Les inhibiteurs de la NO synthase

Les inhibiteurs de NOS



Vallance and Leiper
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2004;24:1023.)

L'ADMA

L'ADMA (1)

• Cibles : NOS synthase, (transporteur de l'arginine?)

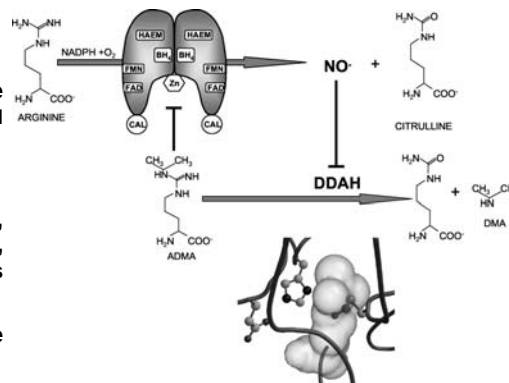
• Métabolisée par la «diméthylarginine diméthylaminohydrolase»: la DDAH (enzyme régulée par le NO)

• ADMA © si hypercholestérolémie, hypertension, athérosclérose, décompensation cardiaque, atteintes rénales chroniques...

→ Participe à la dysfonction endothéliale associée à ces pathologies.

• Le taux d'ADMA constitue un facteur de risque cardiovasculaire indépendant.

→ Nouvelle cible thérapeutique?



Vallance and Leiper
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2004;24:1023.)

L'ADMA ~~L'ADMA~~ (2)

Pour augmenter la production de NO

Pour limiter la production de NO

Supplémentation en Arginine

Inhibiteurs de la DDAH

Supplémentation en antioxydants pour © l'activité de la DDAH

Uprégulation transcriptionnelle de la DDAH

Activateurs de la DDAH

Thérapie génique pour © la DDAH

Therapeutic Strategies to Alter NO Production via Modulation of the DDAH/ADMA/NOS Pathway
Vallance and Leiper
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2004;24:1023.)

La NO synthase endothéliale: régulation ~~Régulation~~ (1)

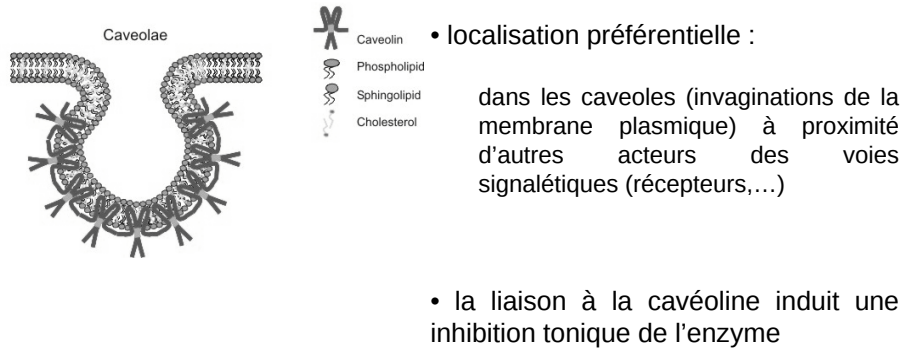
La régulation de eNOS est un processus qui se déroule à différents niveaux :

- une régulation au niveau de l'expression (action sur le promoteur, modulation de la stabilité de l'ARNm, ...).
- une régulation post-traductionnelle qui implique :
 - Translocation
 - Changements de la concentration cytosolique en calcium
 - (De)Phosphorylations : Ser 1177, Thr495, Ser 114
 - Interactions protéines-protéines : cavéoline, Hsp 90, kinases, dynamine, NOSIP, ...
 - phosphatases

Pour en savoir plus : Fleming and Busse: *Am. J. Physiol*, 2003, 284, R1-R12

La NO synthase endothéliale: régulation

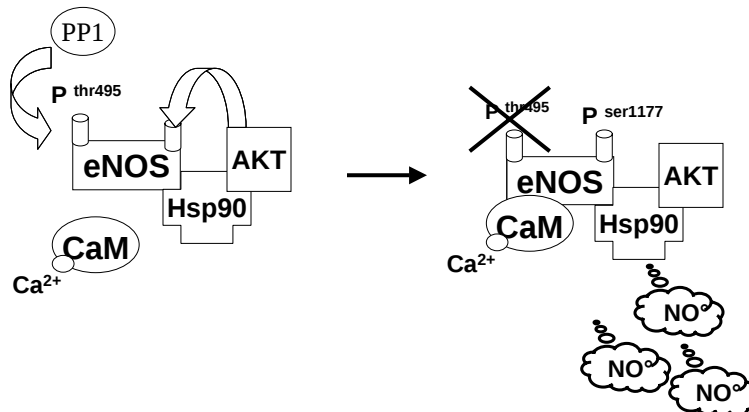
Régulation (2)



La NO synthase endothéliale: régulation

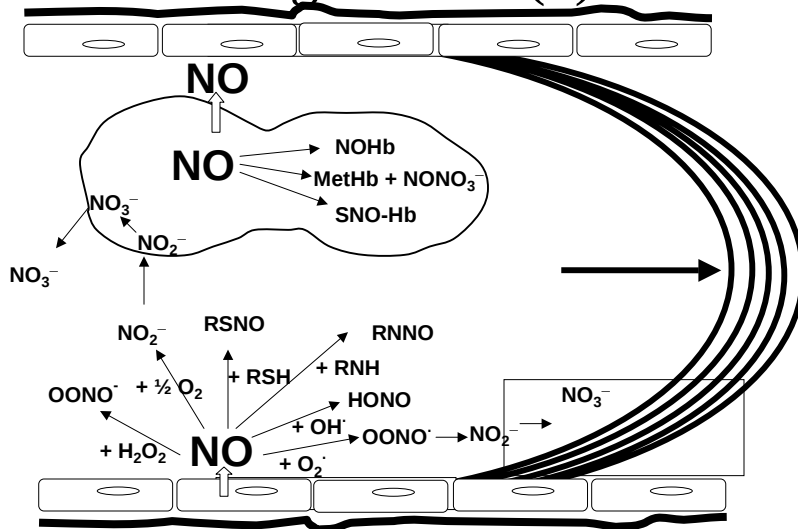
Régulation (3)

- l'activité de eNOS est également dépendante d'une balance de phosphorylation-déphosphorylation (favorisées par l'ancrage à la protéine chaperone Hsp 90).

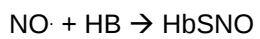
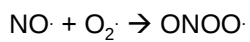
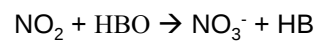
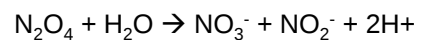
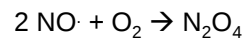


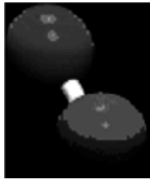
Dégradation du NO dans le sang...en qqes secondes

Dégradation (1)



Dégradation (2)





NO - Monoxyde d'azote

- Introduction.
- Synthèse, régulation, dégradation.
- Les effets du NO:
 - Aspects biochimiques et cellulaires.
 - Effets cardiovasculaires.
 - NO et système nerveux.
 - NO et réponses inflammatoires.
- Approche des cibles thérapeutiques.

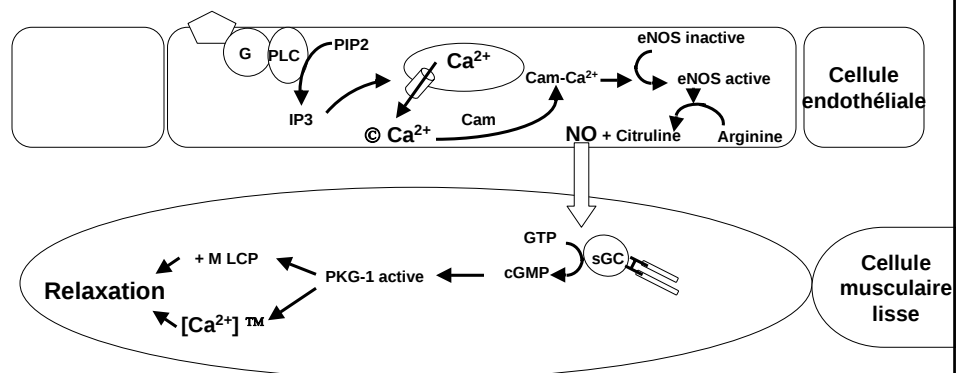
NO/Les effets : 1

Effets du NO : aspects biochimiques

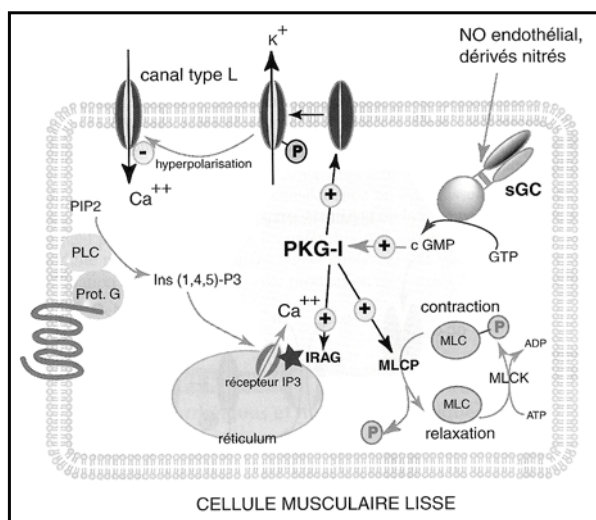
Effets du NO (1)

- en se combinant à l'hème de la guanylate cyclase
 - ◆ activation de l'enzyme ◆ augmentation du cGMP
 - ◆ activation de PKG-I (vasodilatation, diminution de l'adhésion plaquettaire et leucocytaire, neurotransmission)
- effet autocrine ou paracrine
- en se combinant à l'hème d'autres enzymes
 - ◆ inhibition de la cytochrome oxydase (contrôle de la respiration cellulaire)
- en nitrosylant protéines, lipides.
- en se combinant avec l'anion superoxyde
 - ◆ formation de peroxynitrites (souvent cytotoxiques)

Effets du NO (2)



Cibles de la PKG - rappel

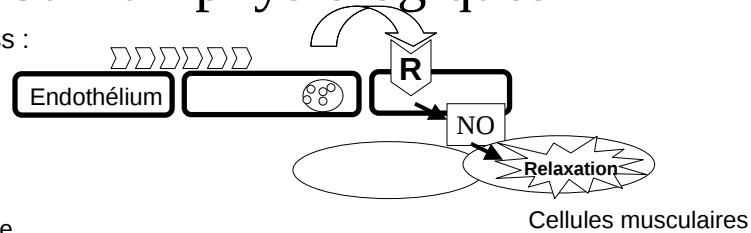


Landry et Gies, 5.12

Stimuli physiologiques de eNOS

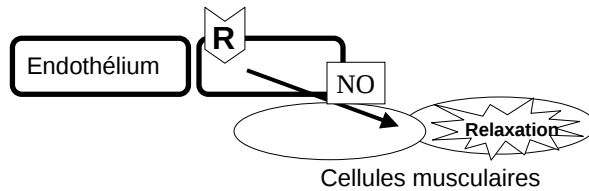
Stimuli physiologiques

- Shear stress :



- Agonistes :

Sérotonine
Histamine
Angiotensine II
Acétylcholine
Vasopressine
ATP
Bradykinine
.....

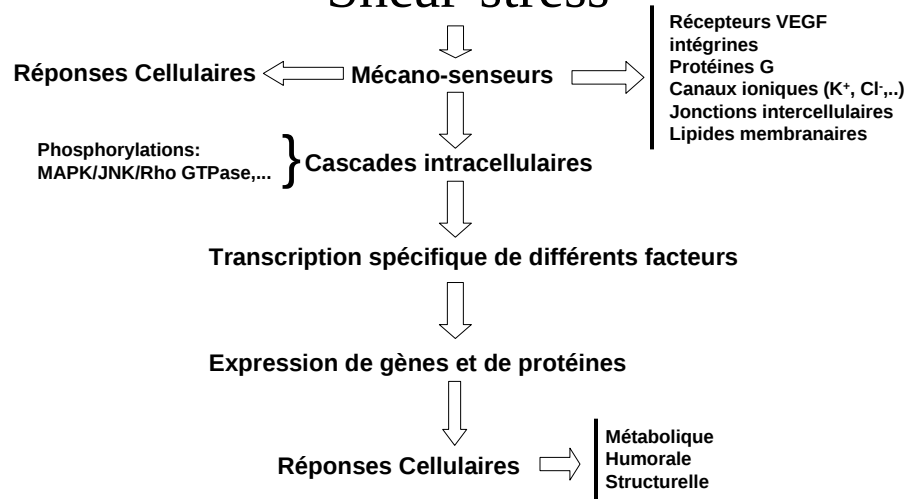


- VEGF

- Insuline

Δ Shear Stress

Shear-stress



Pour en savoir plus...

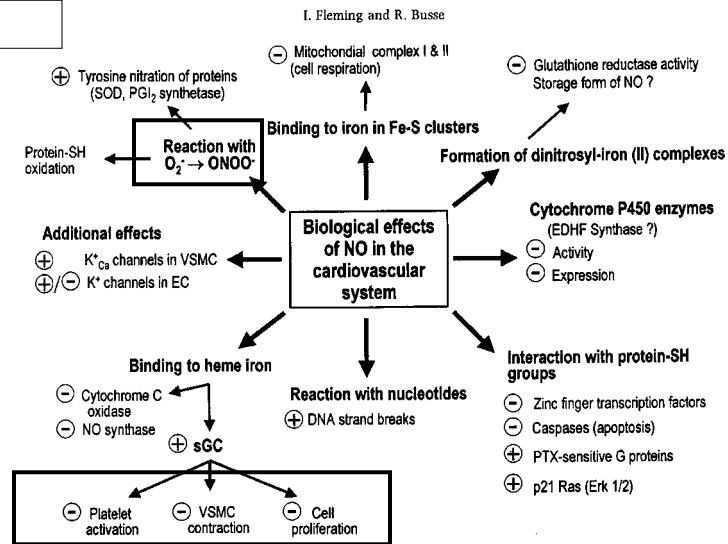
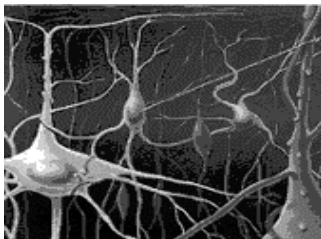


Figure 3 Scheme indicating the multitude of effects of nitric oxide (NO) on the vascular system.

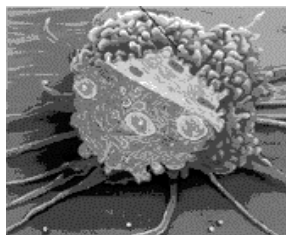
Principales fonctions du NO

Fonctions du NO

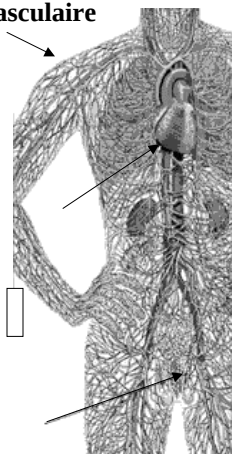
Système cardiovasculaire



Neurones

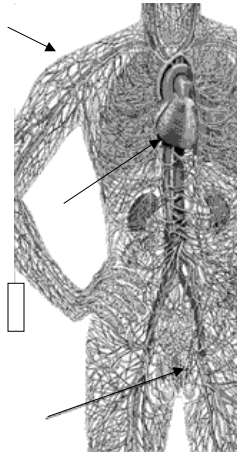


Macrophages

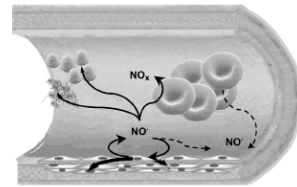


Effets cardiovasculaires du NO

Effets cardiovasculaires



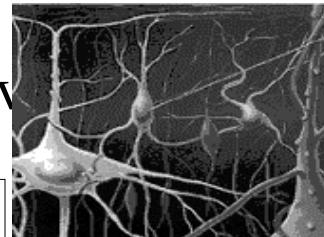
- Vasodilatation
- Inhibition de l'adhésion plaquettaire
- Inhibition de l'adhésion leucocytaire
- Effet inotrope négatif
- TM prolifération cellulaire
- © Angiogenèse



- Contrôle de la pression sanguine
- Prévention de l'athérogenèse
- Prévention de la thrombogenèse

NO et système nerveux

NO et système nerveux



- NO produit par nNOS
- NO : neurotransmetteur de type NANC
- Ne répond pas aux caractéristiques des NT classiques : (c-a-d machinerie de synthèse et stockage, libération par exocytose, action via récepteurs membranaires spécifiques, existence de mécanismes d'inactivation).
- Localisation : SN central et périphérique
 nNOS est présente dans ~2% des neurones, nNOS est localisée dans les corps cellulaires, dendrites, axones
 la libération du NO n'est pas restreinte aux zones conventionnelles de libération des NT.

NO et système nerveux

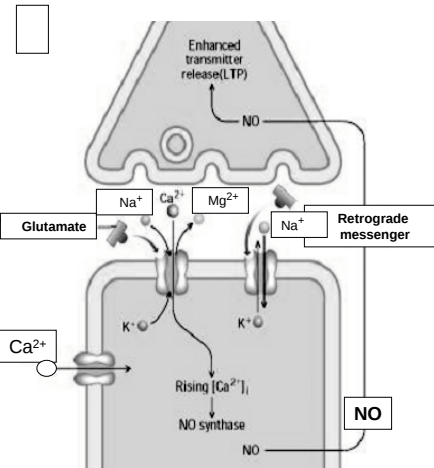
NO et système nerveux (2)

➤ 2 voies de signalisation :

- ❖ Activation de la guanylate cyclase (neurotransmission ou action « physiologique »).
- ❖ Formation de peroxynitrites (neurotoxicité: hyperstimulation des récepteurs NMDA par le glutamate -cf. ischémie cérébrale, maladie de Huntington, démence sénile).

➤ **Effets centraux** : neurotransmission, Potentialisation à long terme – messenger rétrograde - Plasticité (mémoire, appétit, nociception).

➤ **Effets périphériques** : neurotransmission (vidange gastrique, érection).

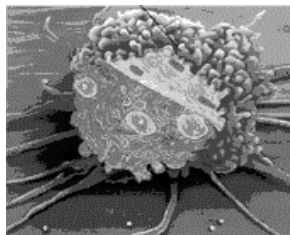


NO et mécanismes de défenses

NO et système immunitaire (1)

L'expression de **iNOS** est induite notamment dans:

- les cellules participant à la réaction inflammatoire
- l'épithélium bronchique (si asthme)
- la muqueuse du colon (si colite ulcéraire)
- les synoviocytes (si maladie inflammatoire articulaire)



Production de NO ☼☼☼

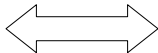
Effets pro-inflammatoires:

- vasodilatation / ☼ perméabilité vasculaire
- production de prostaglandines
- effets cytotoxiques/ cytostatiques contre bactéries, champignons, virus,....

Effets délétères si production en excès: choc septique, effets cytotoxiques sur les cellules de l'hôte.

Dualité NO produit par eNOS

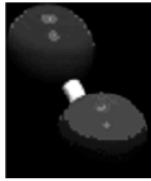
~~NO et système nerveux~~ NO produit par iNOS

<u>eNOS</u>		<u>iNOS</u>
✓ NO ❄		✓ NO ☼☼☼☼☼
✓ Vasodilatation bénéfique		✓ Vasodilatation excessive ‡ Choc
✓ Anti-inflammatoire par :		✓ Action pro-inflammatoire
❖ Diminution agrégation plaquettaire		
❖ Diminution adhésion leucocytaire		

NO et pathophysiologie

~~NO et physiopathologie~~

☒ NO	◆ NO
➤ « dysfonction endothéliale » hypercholestérolémie diabète ... ➤ sténose hypertrophique du pylore du nouveau-né	➤ maladies neurodégénératives ➤ choc septique



NO - Monoxyde d'azote

- Introduction.
- Synthèse, régulation, dégradation.
- Les effets du NO:
 - Aspects biochimiques et cellulaires.
 - Effets cardiovasculaires.
 - NO et système nerveux.
 - NO et réponses inflammatoires.
- Approche des cibles thérapeutiques.

NO/cibles : 1

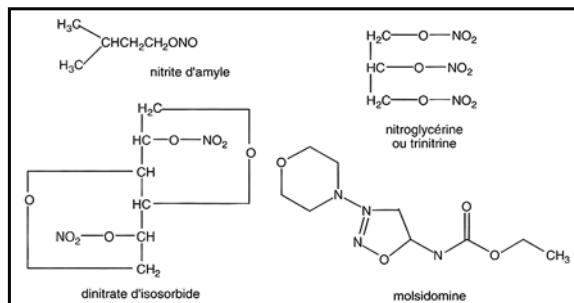
Approches des cibles thérapeutiques

~~Approches thérapeutiques~~



- **NO : forme gazeuse**
 - ☐ Syndrome de détresse respiratoire, hypertension pulmonaire chez le prématuré

- **Donneurs de NO : dérivés nitrés**
 - ☐ Maladie coronarienne (anti-angoreux)
 - ☐ crise hypertensive aiguë



Approches des cibles thérapeutiques

~~Approches thérapeutiques~~



- Potentialisateurs du NO : inhibiteurs sélectifs de PDE5 (PDE5 → hydrolyse du cGMP) © cGMP

☐ Impuissance

- Inhibiteurs de la NO synthase : recherche d'inhibiteurs sélectifs des différentes isoformes

☐ Contrôle du choc septique (premiers essais cliniques utilisant des inhibiteurs non-sélectifs décevants : © mortalité cardiovasculaire!!!)

- ADMA/DDAH (nouvelle cible?):

☐ prévention de la dysfonction endothéliale associée à l'athérosclérose, l'hypertension, ...