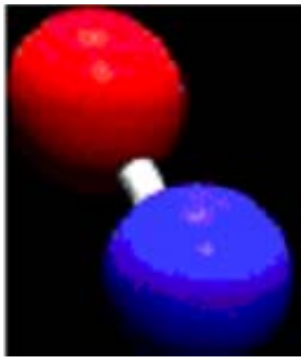
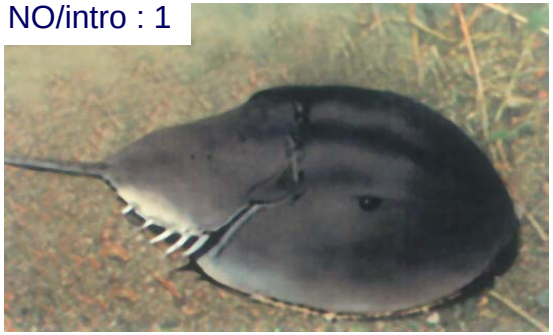


NO - Monoxyde d’azote

1. Introduction.
2. Synthèse, régulation, dégradation.
3. Les effets du NO:
    a) Aspects biochimiques et cellulaires.
    b) Effets cardiovasculaires.
    c) NO et système nerveux.
    d) NO et réponses inflammatoires.
4. Approche des cibles thérapeutiques.

Rôles du NO dans le monde animal

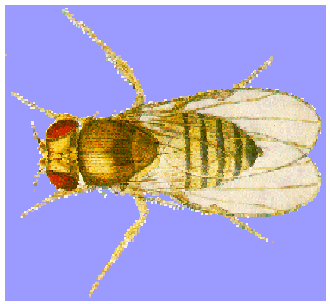


Limulus polyphemus
Haemocytes aggregation
Radomski et al. 1991

Rhodnius prolixux
Blood sucking

Locusta migratoria
Neuronal migration
Haase and Bicker 2003

Photuris
Bioluminescence
Trimmer et al. 2001



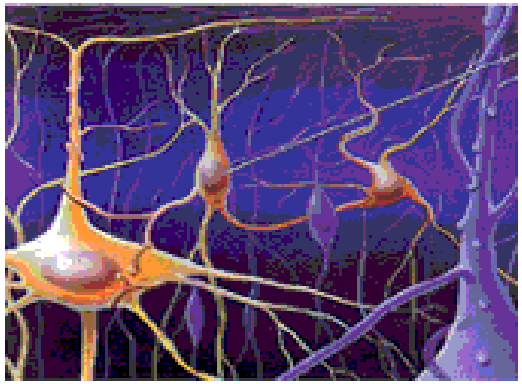
Drosophila melanogaster
Organ size during development
Kuzin et al. 1996, 2000
Synaptogenesis in the developing visual system
Gibbs and Truman 1998
Hypoxia
Wingrove and O'Farrel, 1999
Immune response
Nappi et al. 2000, Silverman 2003
Fluid transport regulation in Malpighian tubule
Dow et al. 1994

Bombyx mori
Immunity
Choi et al. 1995

Manduca sexta
Olfaction
Nighorn et al. 1998

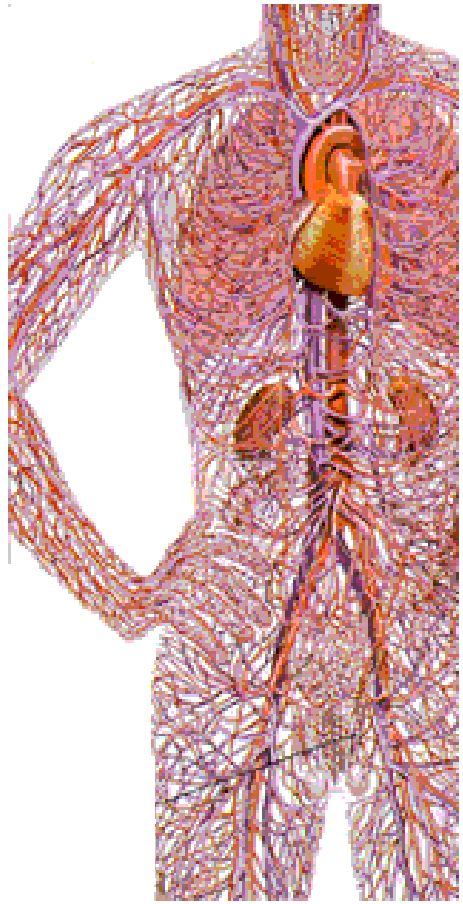
Anopheles stephensi
Defense
Luckhart et al. 1998

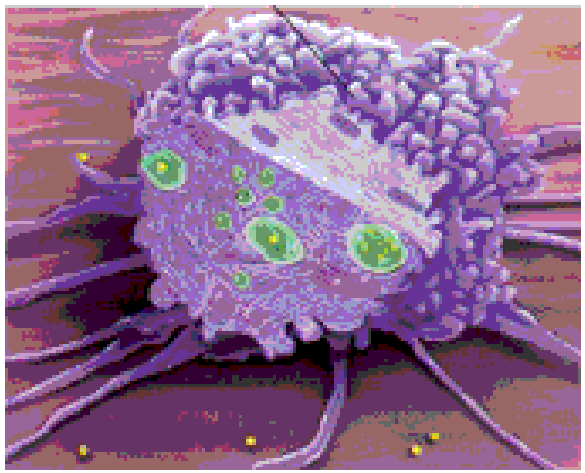
Principales fonctions du NO chez l'homme



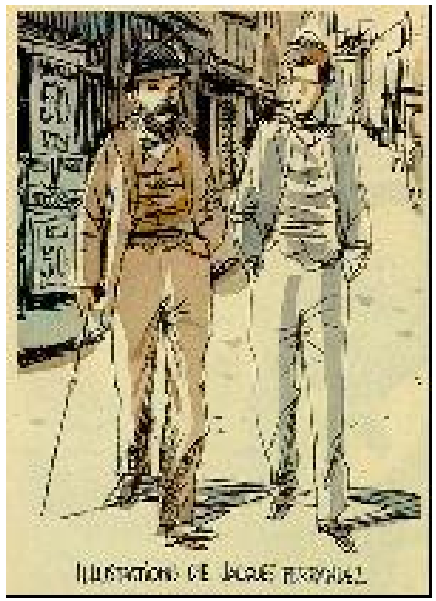
Neurones

Système cardiovasculaire

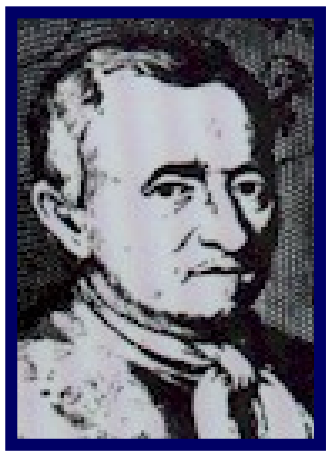




Macrophages



Un peu d'histoire…



Jan-Baptista Van Helmont
1580-1644

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

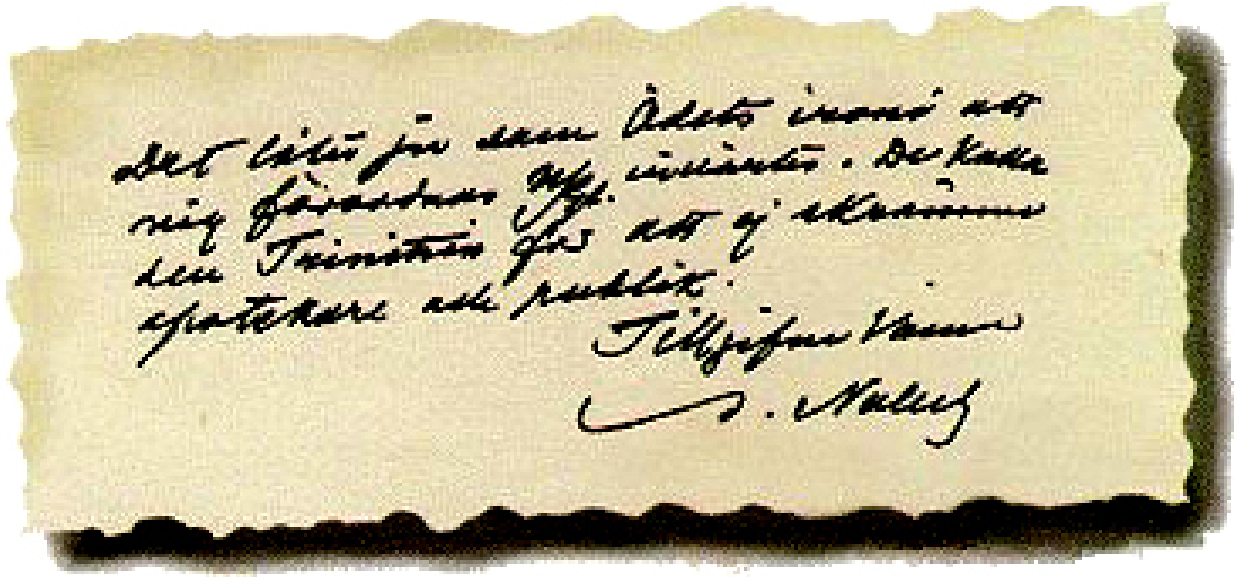
  $Cu + HNO3 \rightarrow Cu^{2+} + \mathbf{NO} + H20$

- 1867 : le nitrite d'amyl permet de diminuer la pression sanguine

- 1914-1918 : remplir les canons de nitroglycérine entrainait des chutes de tension! Premières pilules de nitroglycérine pour le traitement de l'angine de poitrine.

Un peu d'histoire…

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



"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.

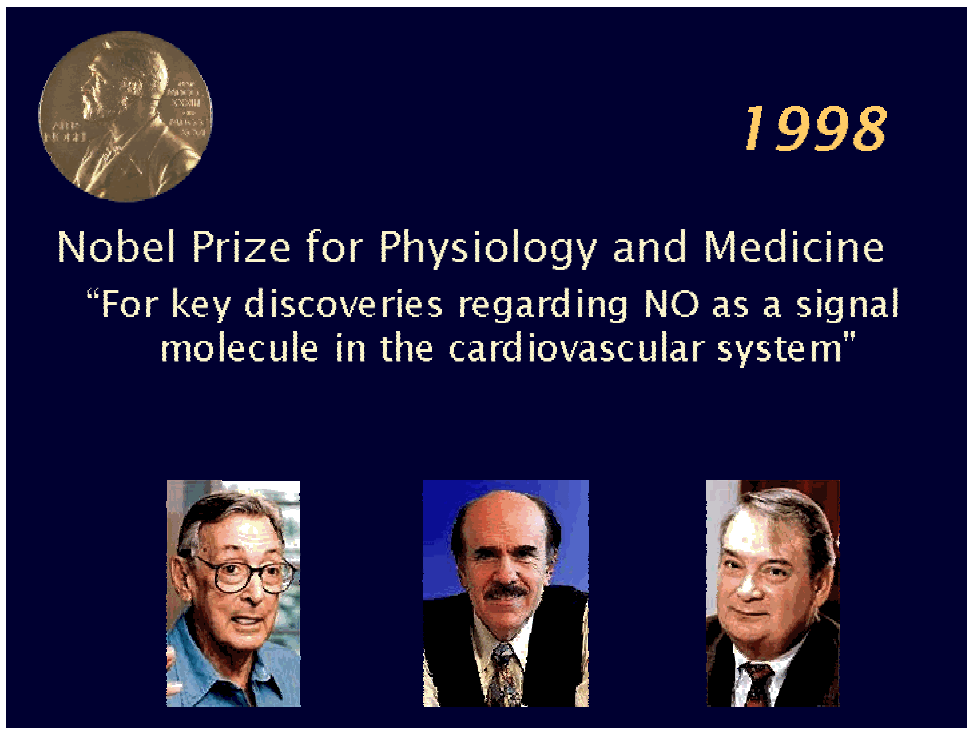
Your affectionate friend,

A. Nobel"

Un peu d'histoire…suite…

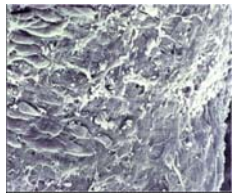
- 1992 : Le NO est déclaré « Molécule de l'année » par le magazine scientifique « Science »

- 1998 : Le Prix Nobel est attribué aux Prs Furchgott, Ignarro et Murad



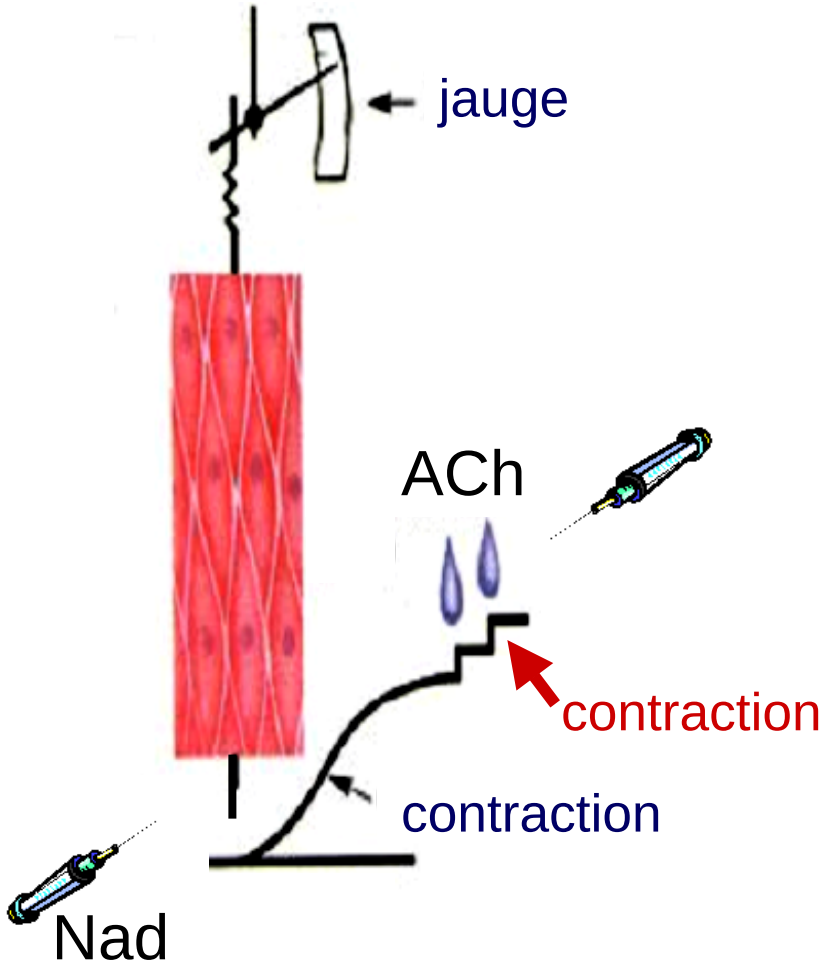
Furchgott's sandwich :

« endothélium »

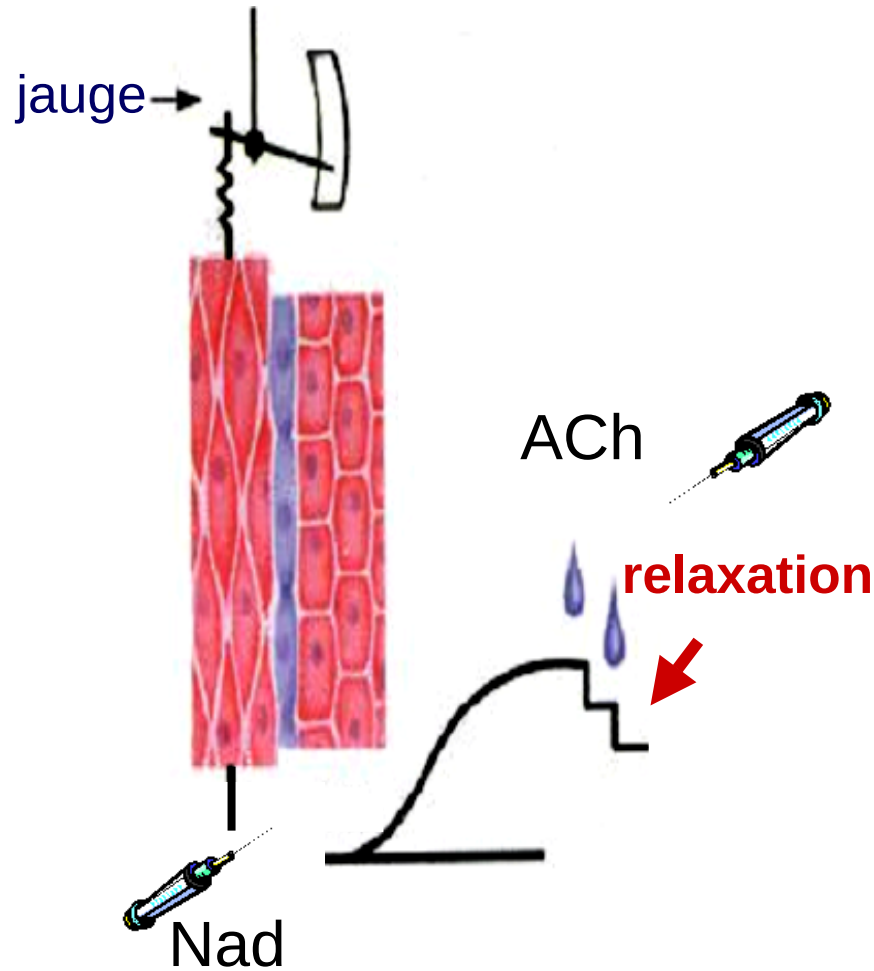


- **découverte d'un facteur relaxant libéré par l'endothélium: l'EDRF**

Aorte sans endothélium

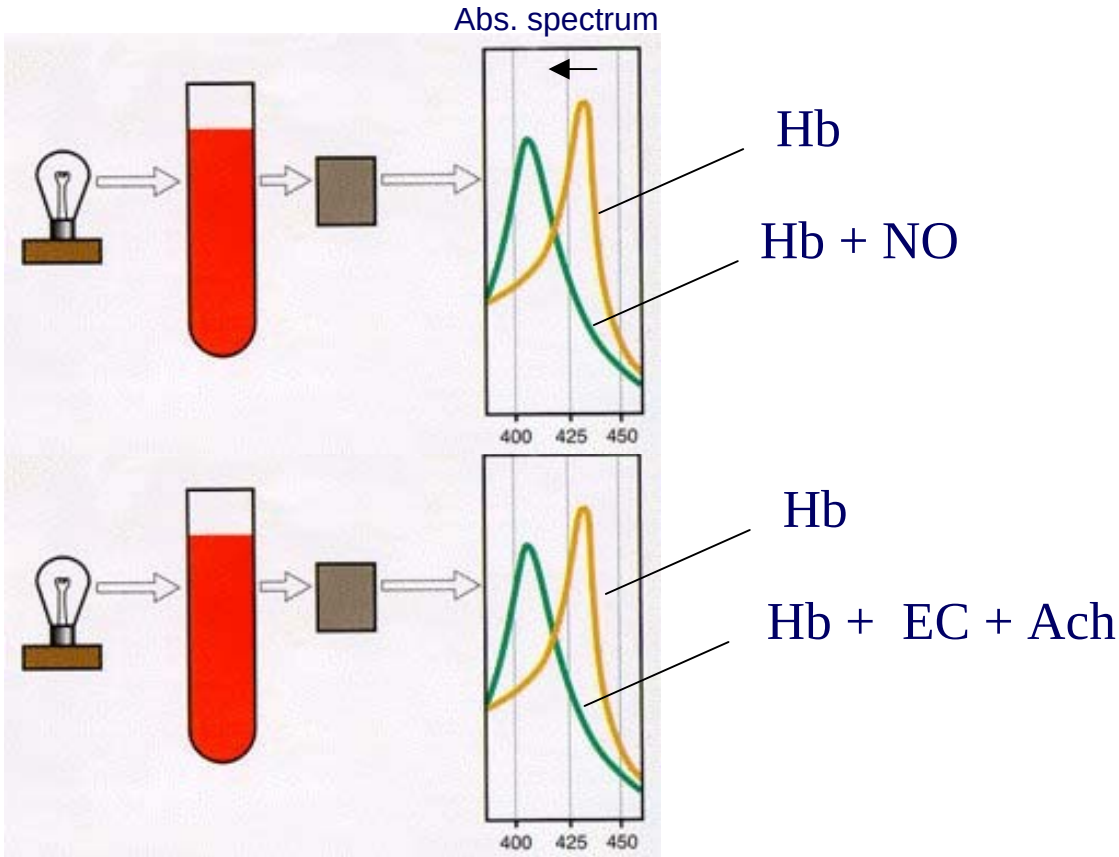


Aorte avec endothélium intact

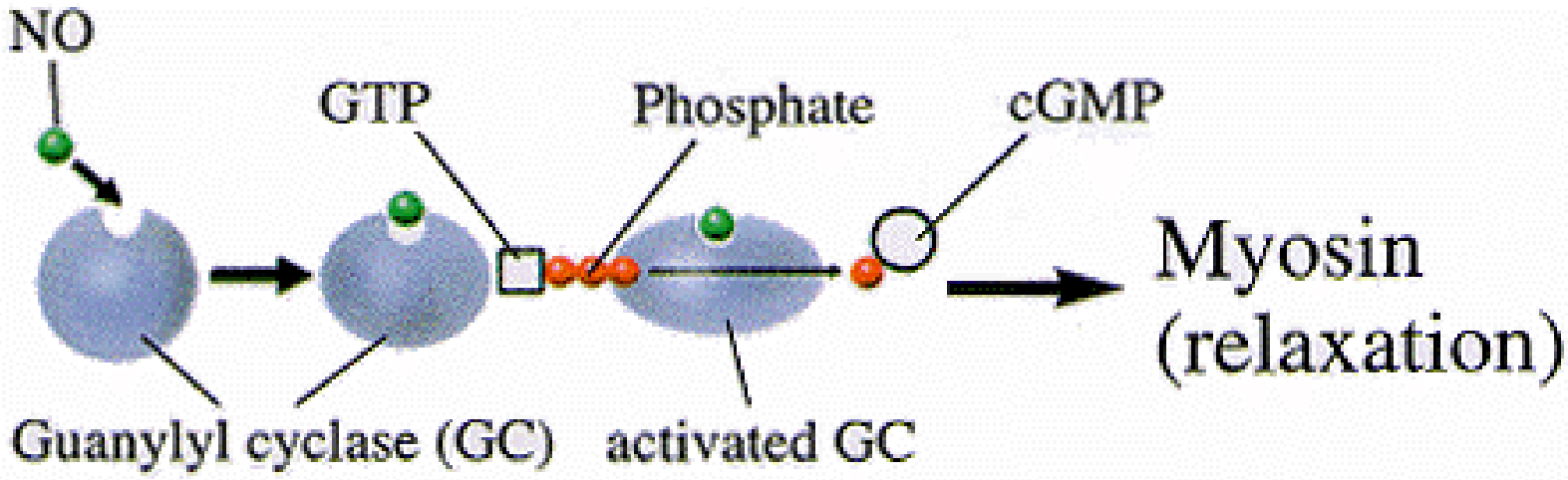


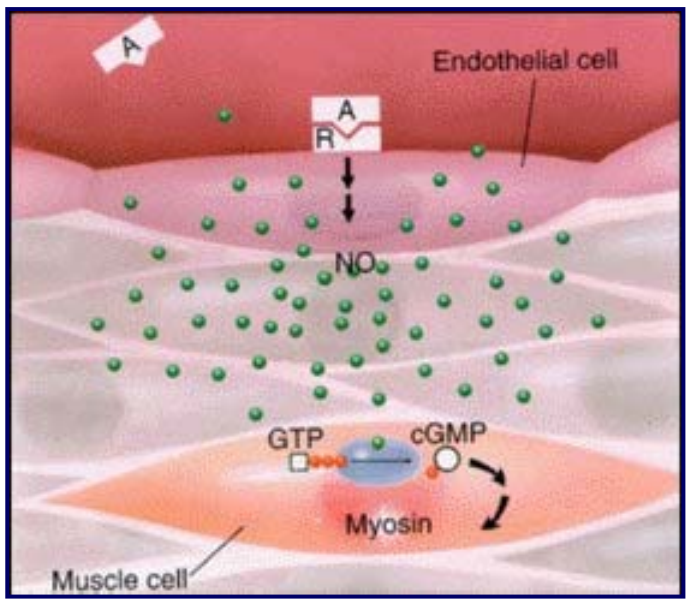
Ignarro's spectral analysis

- **découverte de l'identitié chimique de l'EDRF : le NO**



Murad's enzyme activation



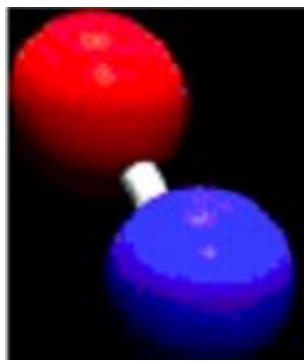


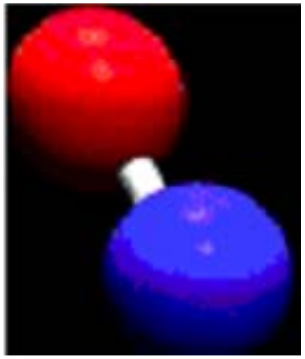
- **découverte du mode d'action de l'EDRF/NO:**

l'activation de la guanylate cyclase

$NO^{\bullet}$: 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 : $11e^-$ >< O_2 :12), relativement instable
- Faible solubilité dans l'eau (1,7 mmol/l à 25°C)
- Composé lipophile (passage aisé à travers les membranes), hautement diffusible





NO - Monoxyde d’azote

1. Introduction.
2. Synthèse, régulation, dégradation.
3. Les effets du NO:
   a) Aspects biochimiques et cellulaires.
   b) Effets cardiovasculaires.
   c) NO et système nerveux.
   d) NO et réponses inflammatoires.
4. Approche des cibles thérapeutiques.

Les NO synthases

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,….**

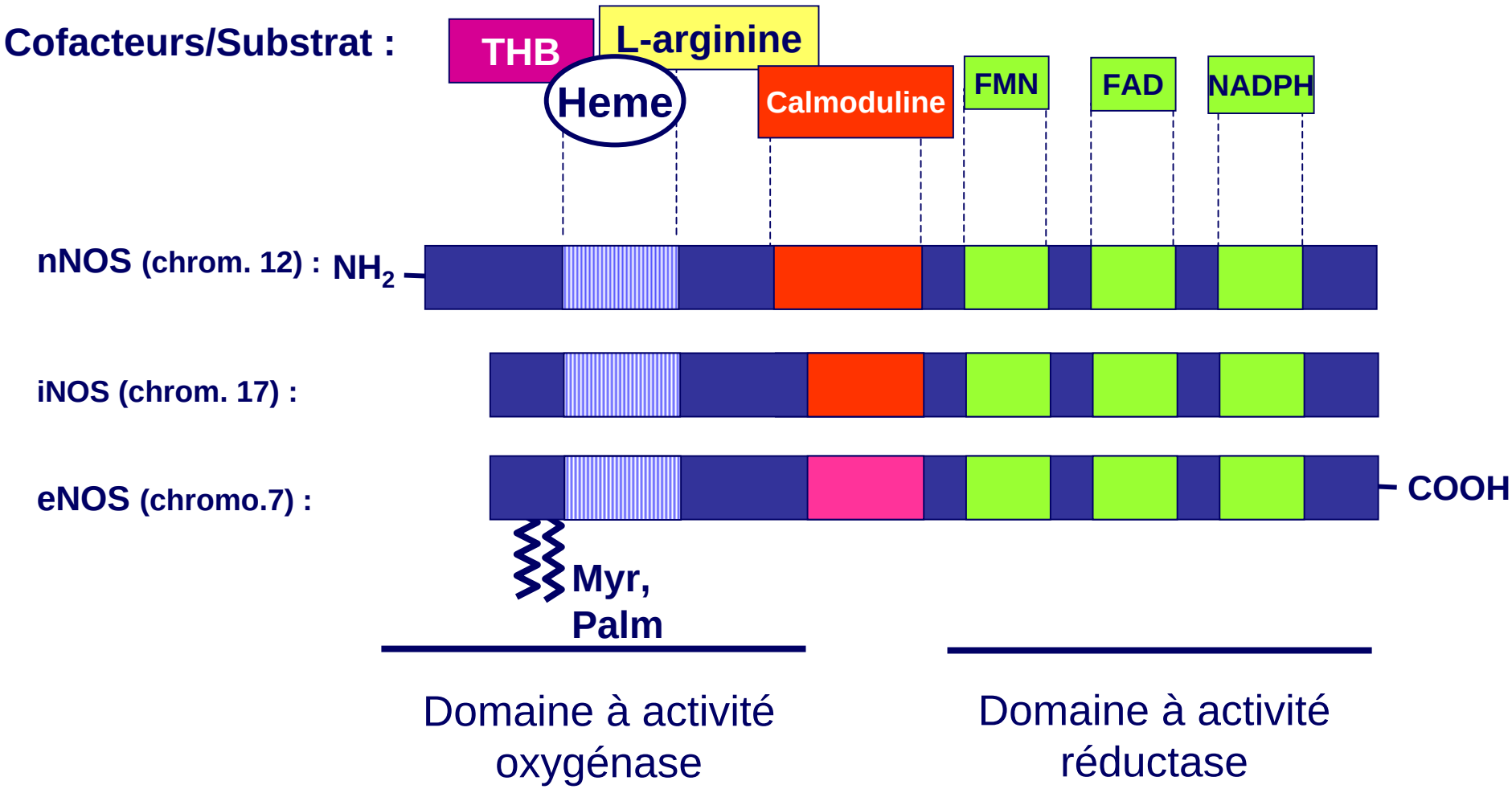
nNOS : **NO synthase neuronale ou NOS1**

- **constitutive, activée par le Ca^{2+}**
- **principalement dans le système nerveux et le muscle squel.**

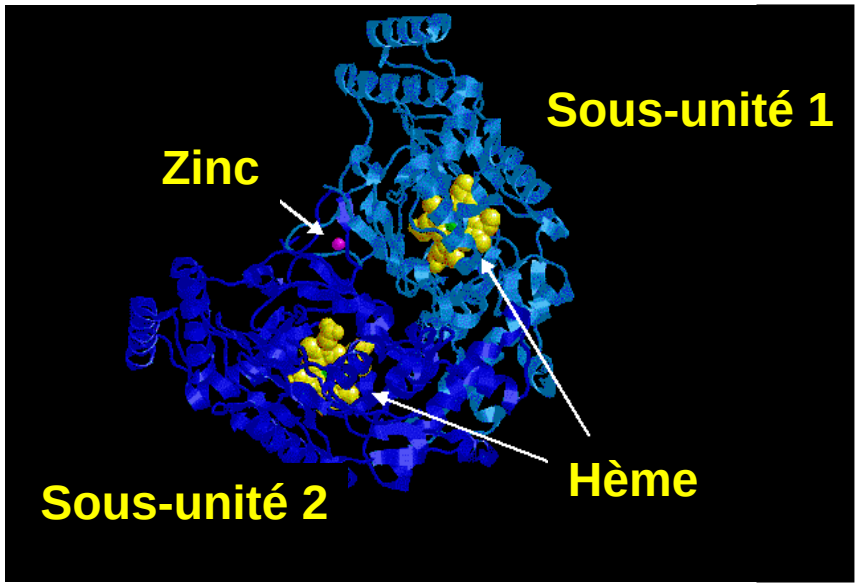
iNOS : **NO synthase inductible ou macrophagique ou NOS2**

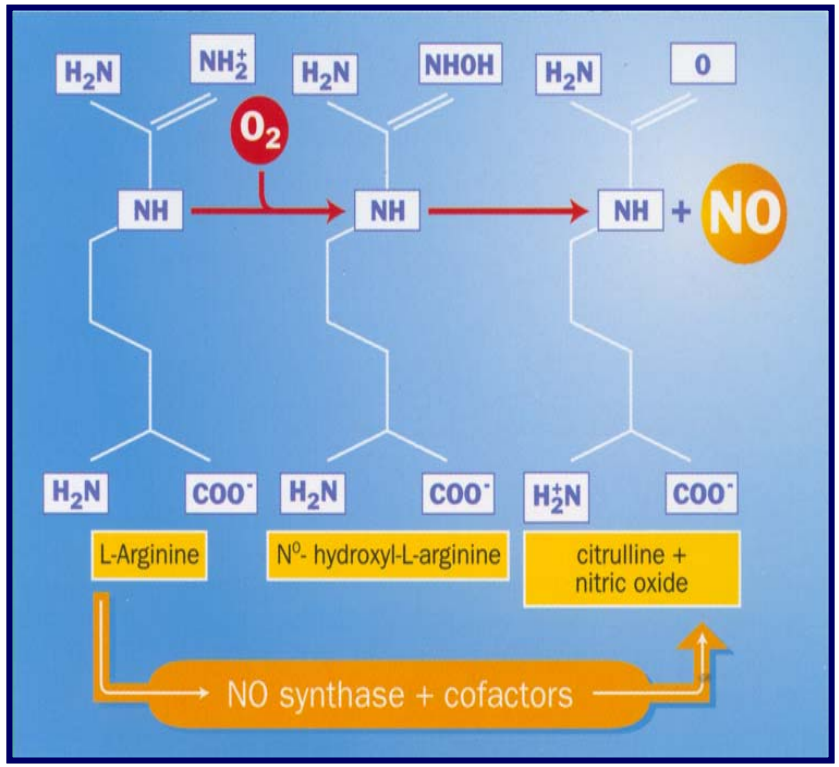
- **inductible par des agents proinflammatoires et des endotoxines (LPS, interferon γ, (IL1β, TNFα, ...))**
- **principalement dans les macrophages et les cellules musculaires lisses,…)**

Les NO synthases



La synthèse du NO

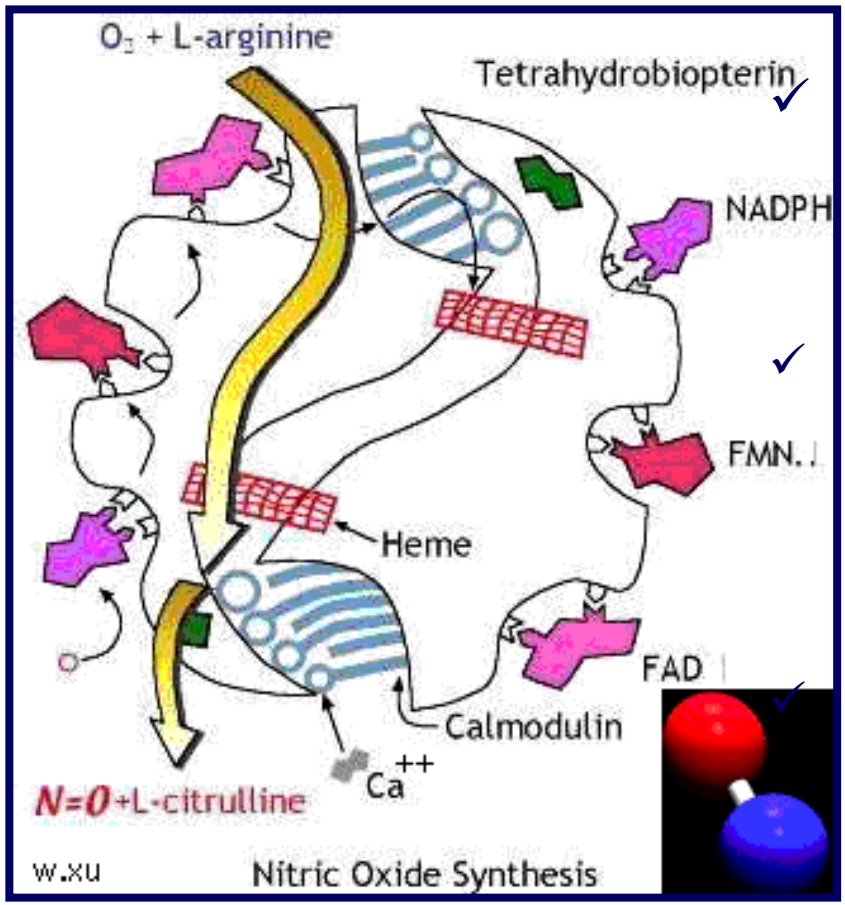




✓ Homodimère **(PM monomère :130-135 kD)**

✓ Chaque monomère comporte deux domaines: oxygénase et réductase

La synthèse du NO



Substrat / Produits :

L-arginine , O_2 / L-citrulline, **NO**

Cofacteurs et groupements prosthétiques :

NADPH, FAD, FMN, Hème, THB, CaM

Inhibiteur compétitif endogène:

ADMA

Les inhibiteurs de la NO synthase

- **Analogues méthylés de l'arginine:**

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

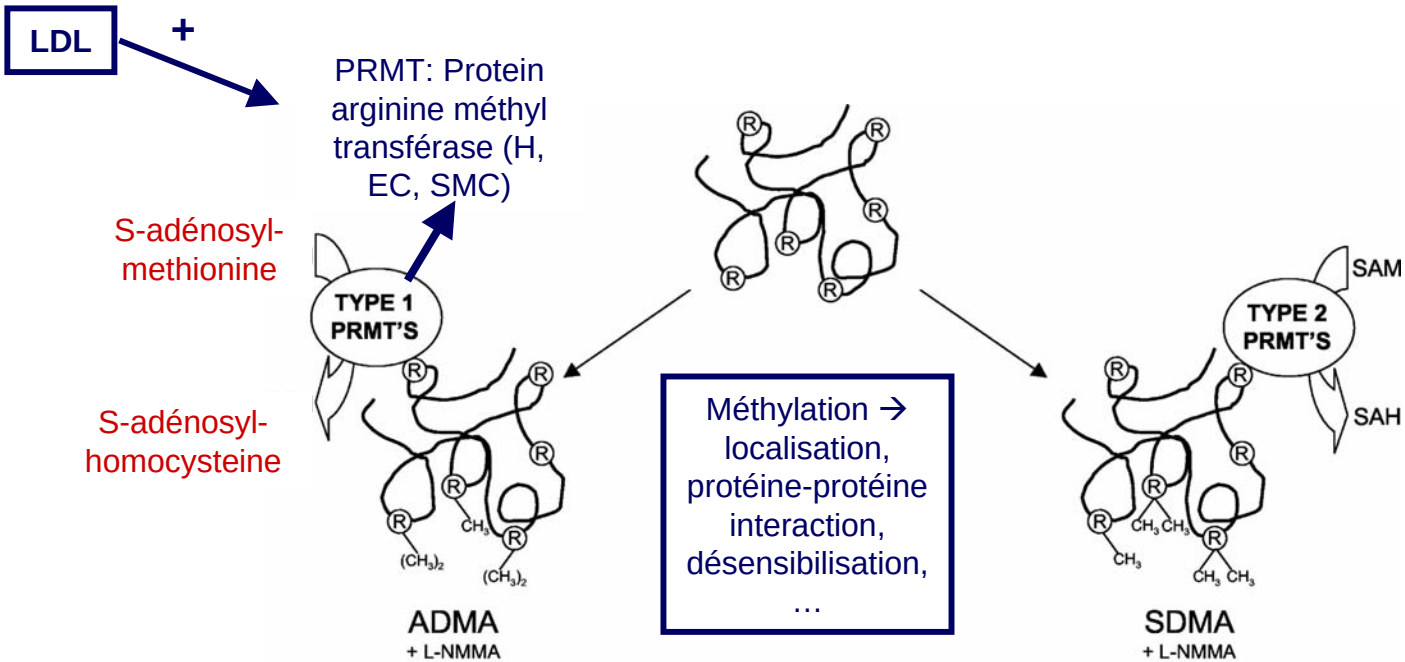
  → **Outils expérimentaux**.

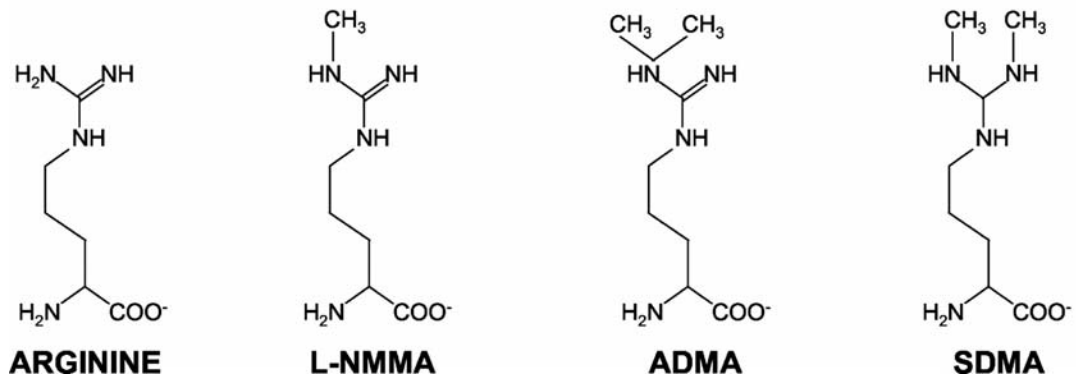
- **ADMA** (**A**symetric **D**i**M**ethyl**A**rginine) :

  - **Inhibiteur endogène**

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

Les inhibiteurs de la NO synthase





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

L'ADMA

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

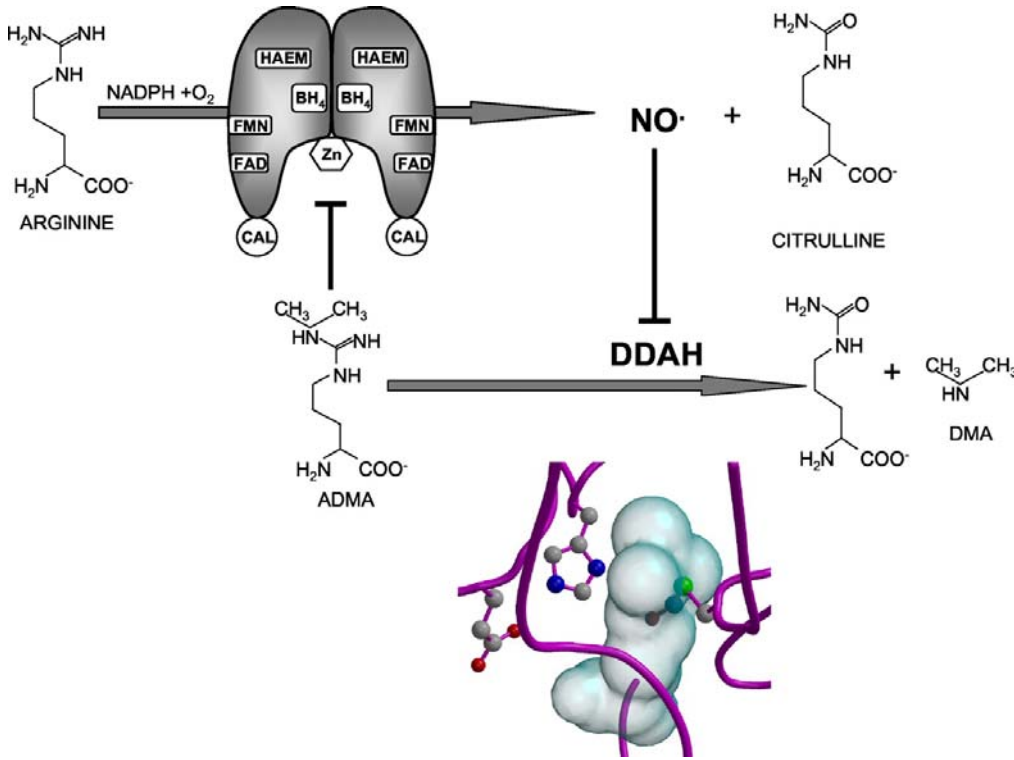
- **Métabolisée par la «dimethylarginine dimethylaminohydrolase»: la DDAH (enzyme régulée par le NO)**

- **ADMA ↑ si hypercholestérolémie, hypertension, athérosclérose, décompensation cardiaque, atteintes rénales chroniques…**

→ Participe à la dysfonction endothéliale associée à ces pathologies.

- **Le taux d'ADMA constituent un facteur de risque cardiovasculaire indépendant.**

→ Nouvelle cible thérapeutique?



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

L'ADMA

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

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

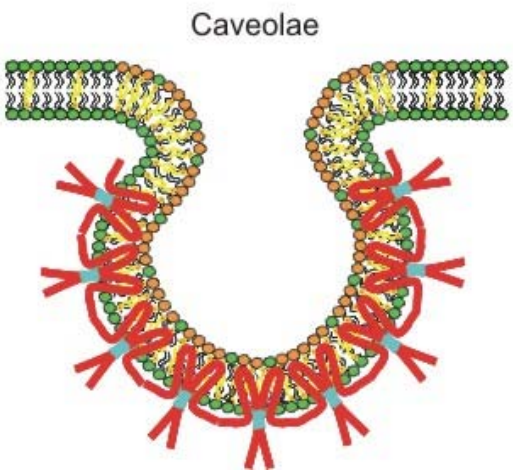
• une régulation au niveau de l'expression (action sur le promoteur, modulation de la stabilité de l'ARNm, …).

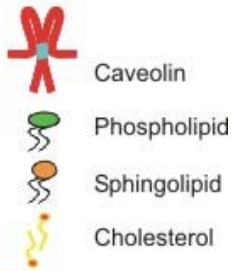
• une régulation post-traductionnelle qui implique :

- 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

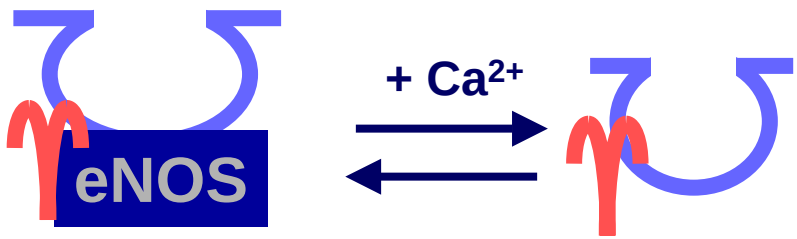


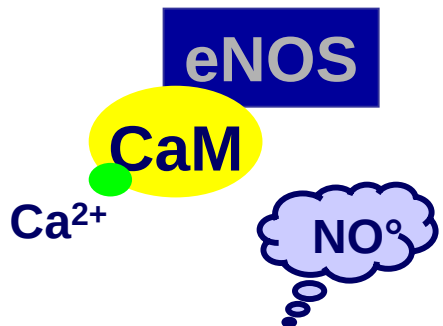


- localisation préférentielle :

  dans les caveoles (invaginations de la membrane plasmique) à proximité d'autres acteurs des voies signalétiques (récepteurs,…)

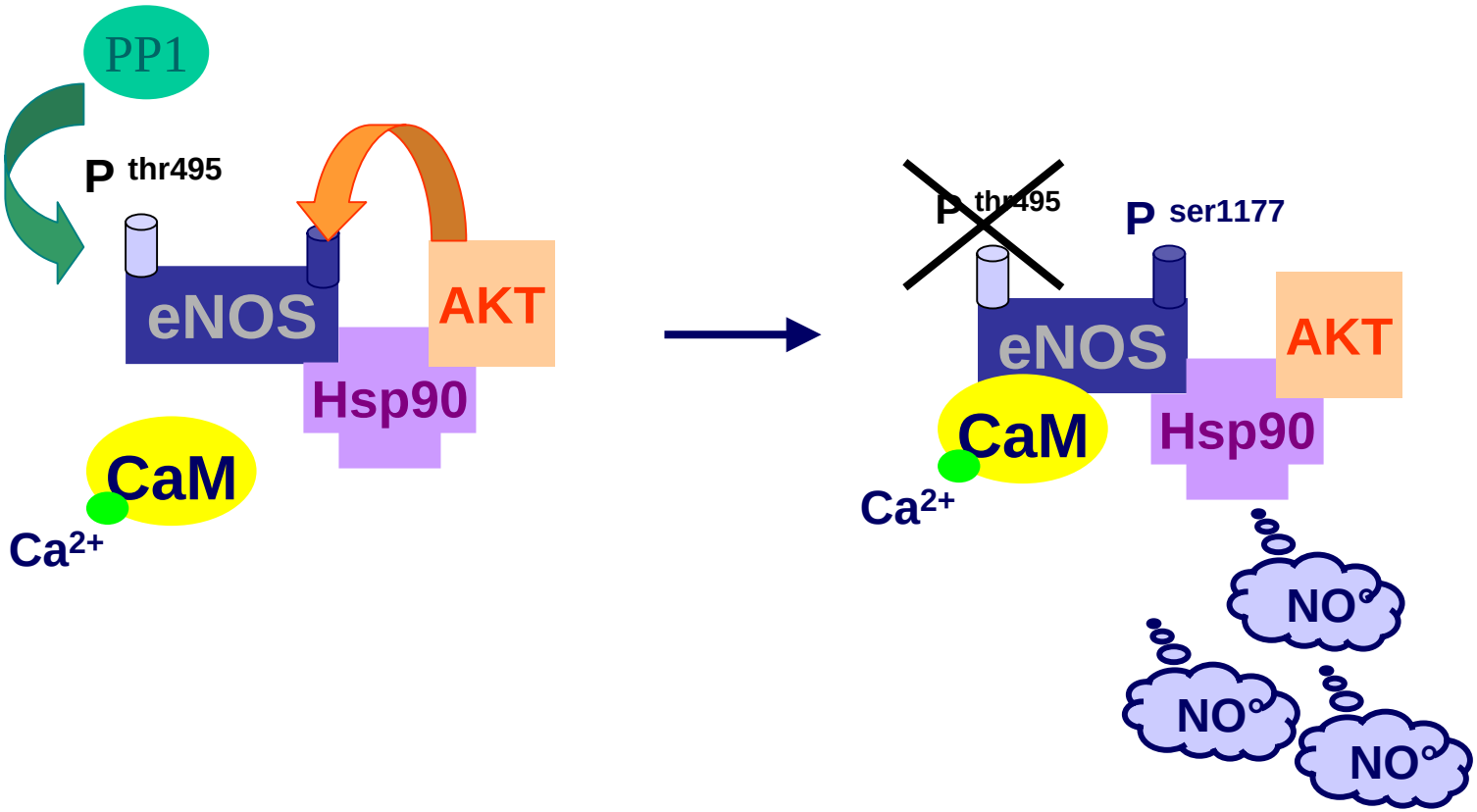
- la liaison à la cavéoline induit une inhibition tonique de l'enzyme



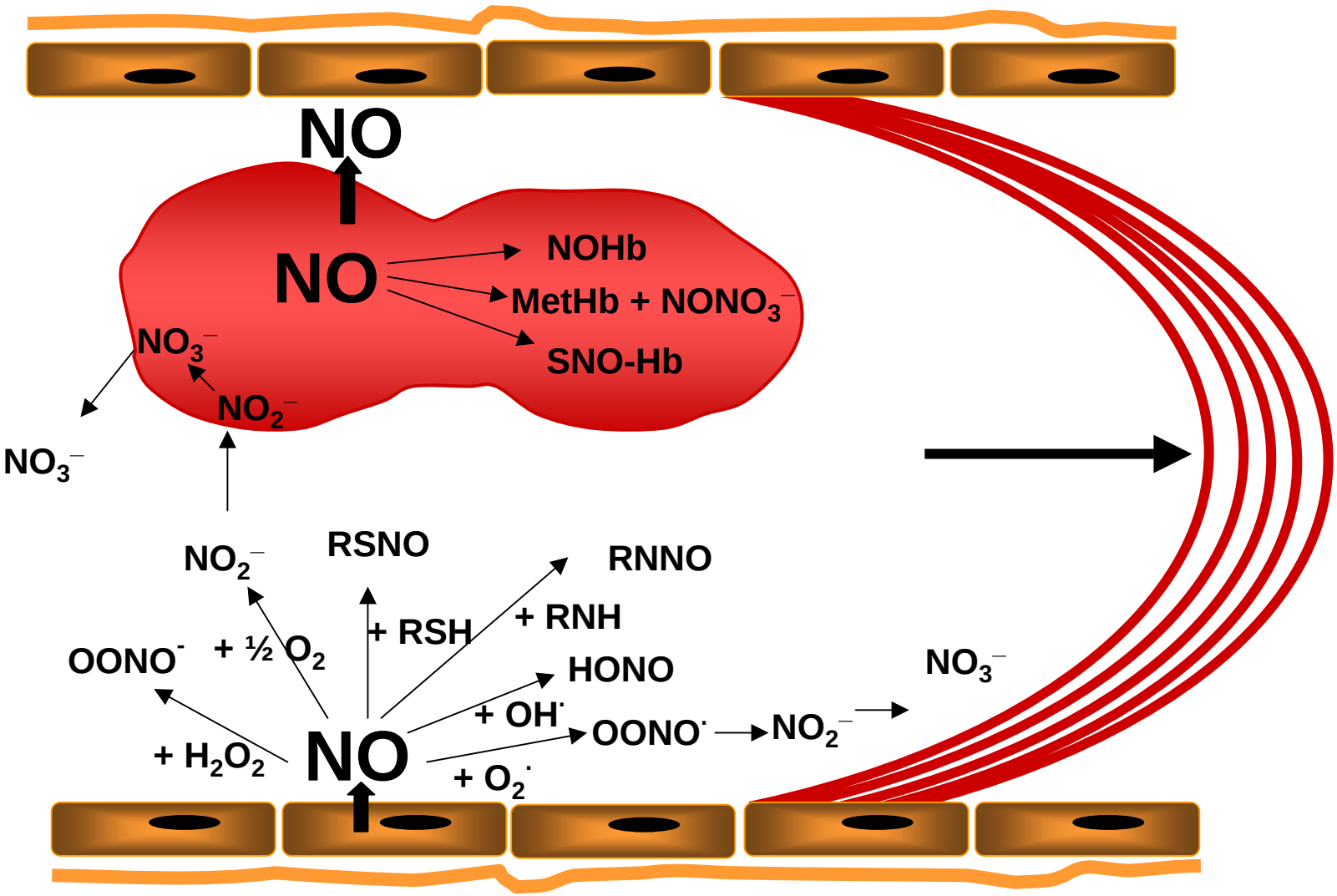


La NO synthase endothéliale: régulation

• 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 qques secondes



Dégradation

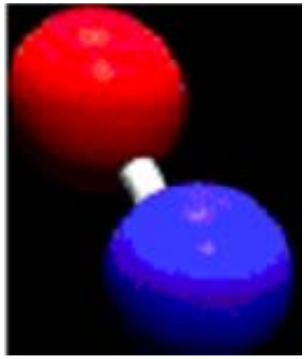
$2\ NO^{\cdot} + O_2 \rightarrow N_2O_4$

$N_2O_4 + H_2O \rightarrow NO_3^- + NO_2^- + 2H+$

$NO_2 + HBO \rightarrow NO_3^- + HB$

$NO^{\cdot} + O_2^{\cdot} \rightarrow ONOO^{\cdot}$

$NO^{\cdot} + HB \rightarrow HbSNO$



NO - Monoxyde d’azote

1. Introduction.
2. Synthèse, régulation, dégradation.
3. Les effets du NO:
   a) Aspects biochimiques et cellulaires.
   b) Effets cardiovasculaires.
   c) NO et système nerveux.
   d) NO et réponses inflammatoires.
4. Approche des cibles thérapeutiques.

Effets du NO : aspects biochimiques

- **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)**

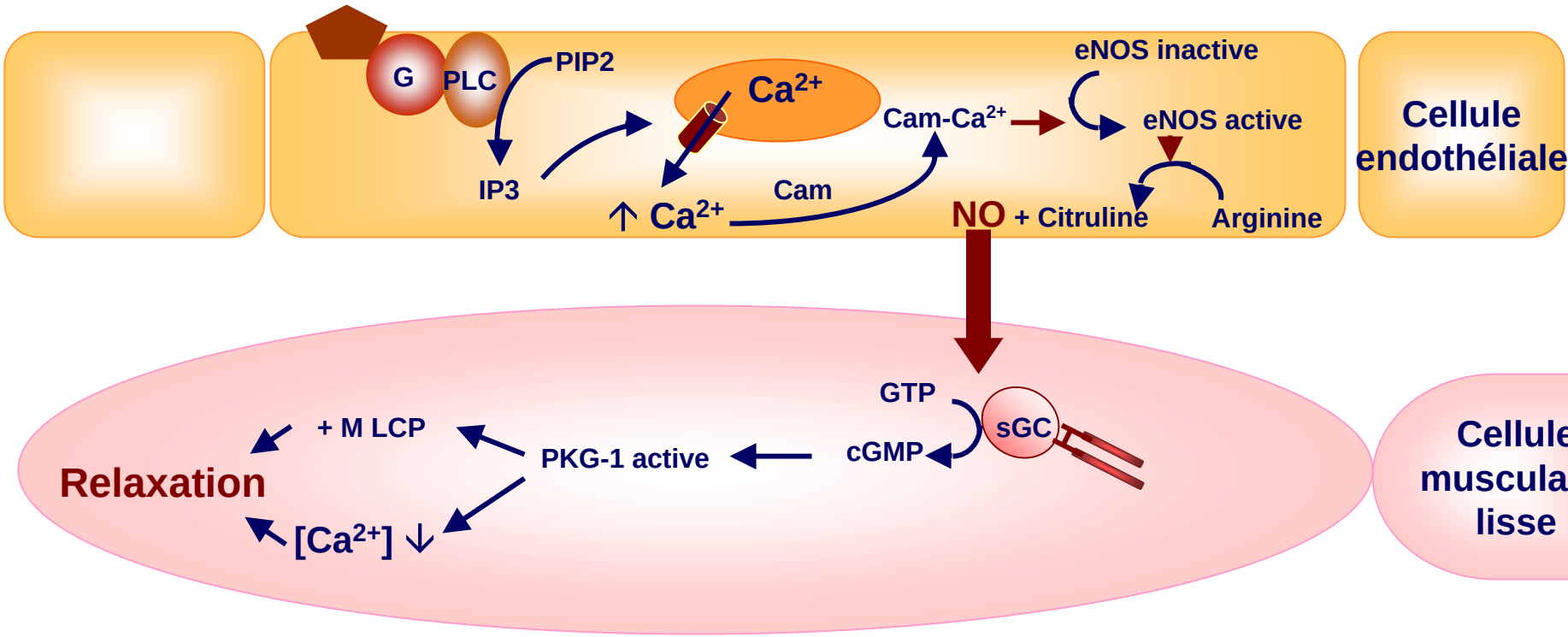
  effet autocrine ou paracrine

- **en se combinant à l'hème d'autres enzymes**
  - ⇨ **inhibition de la cytochrome oxydase (contrôle de la respiration cellulaire)**

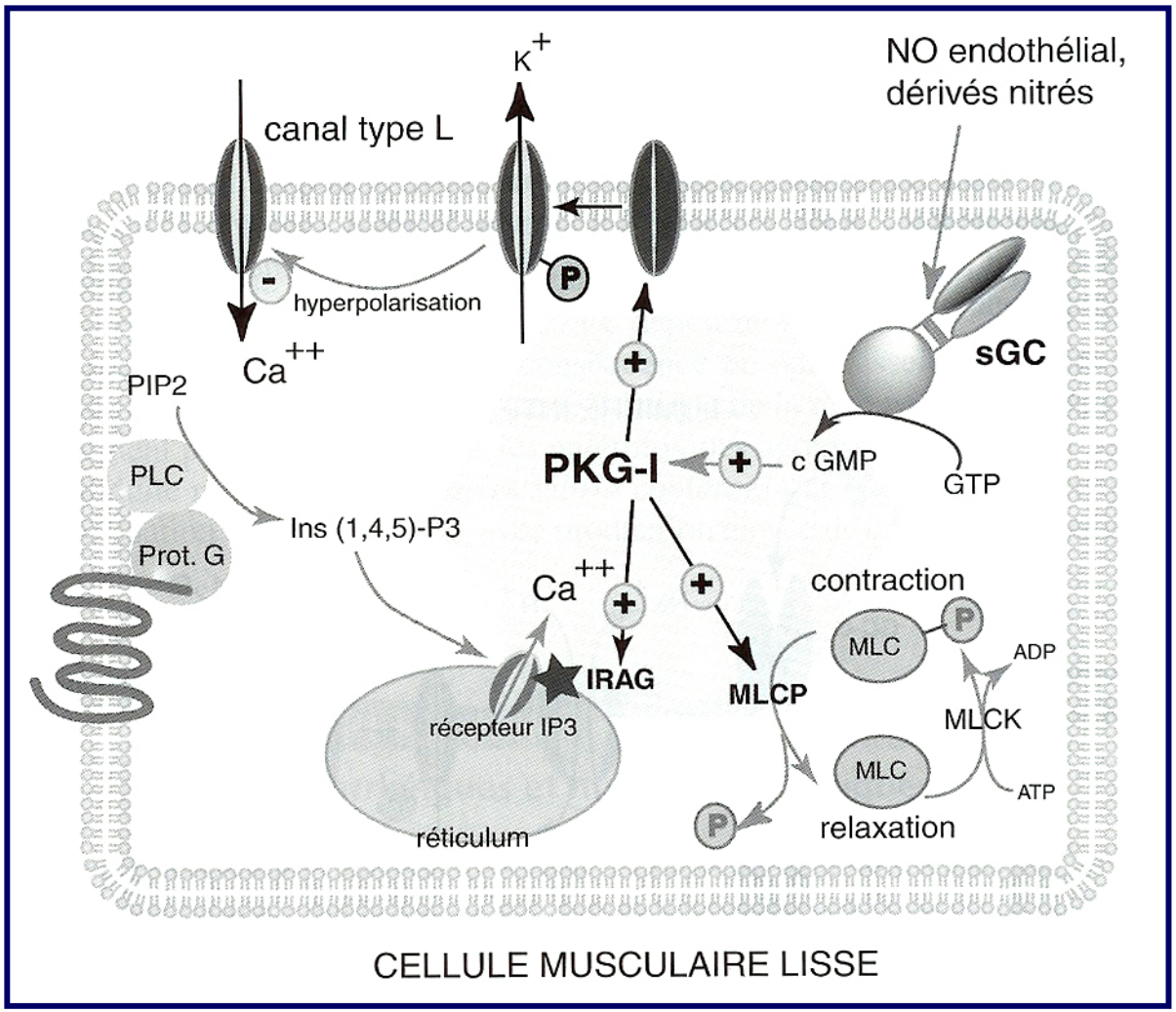
- **en nitrosylant protéines, lipides.**

- **en se combinant avec l'anion superoxyde**
  - ⇨ **formation de peroxynitrites (souvent cytotoxiques)**

Effets du NO


G
PLC
PIP2
IP3
Ca2+
↑ Ca2+
Cam
Cam-Ca2+
eNOS inactive
eNOS active
NO + Citruline
Arginine
Cellule endothéliale
GTP
sGC
cGMP
PKG-1 active
+ M LCP
Relaxation
[Ca2+] ↓
Cellule musculaire lisse

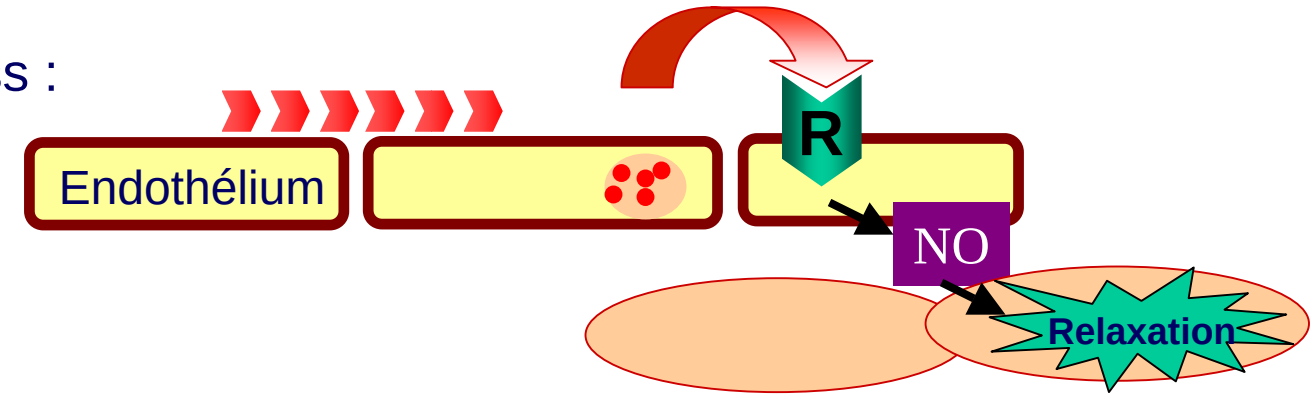
Cibles de la PKG - rappel



Landry et Gies, 5.12

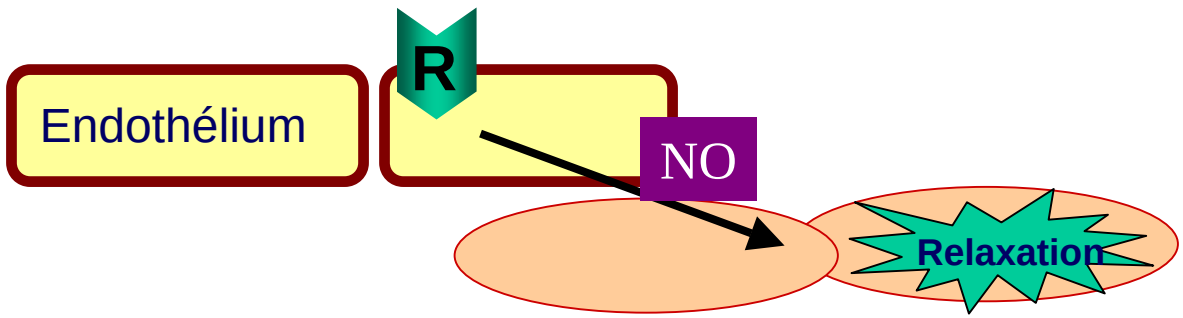
Stimuli physiologiques de eNOS

- Shear stress :



Cellules musculaires

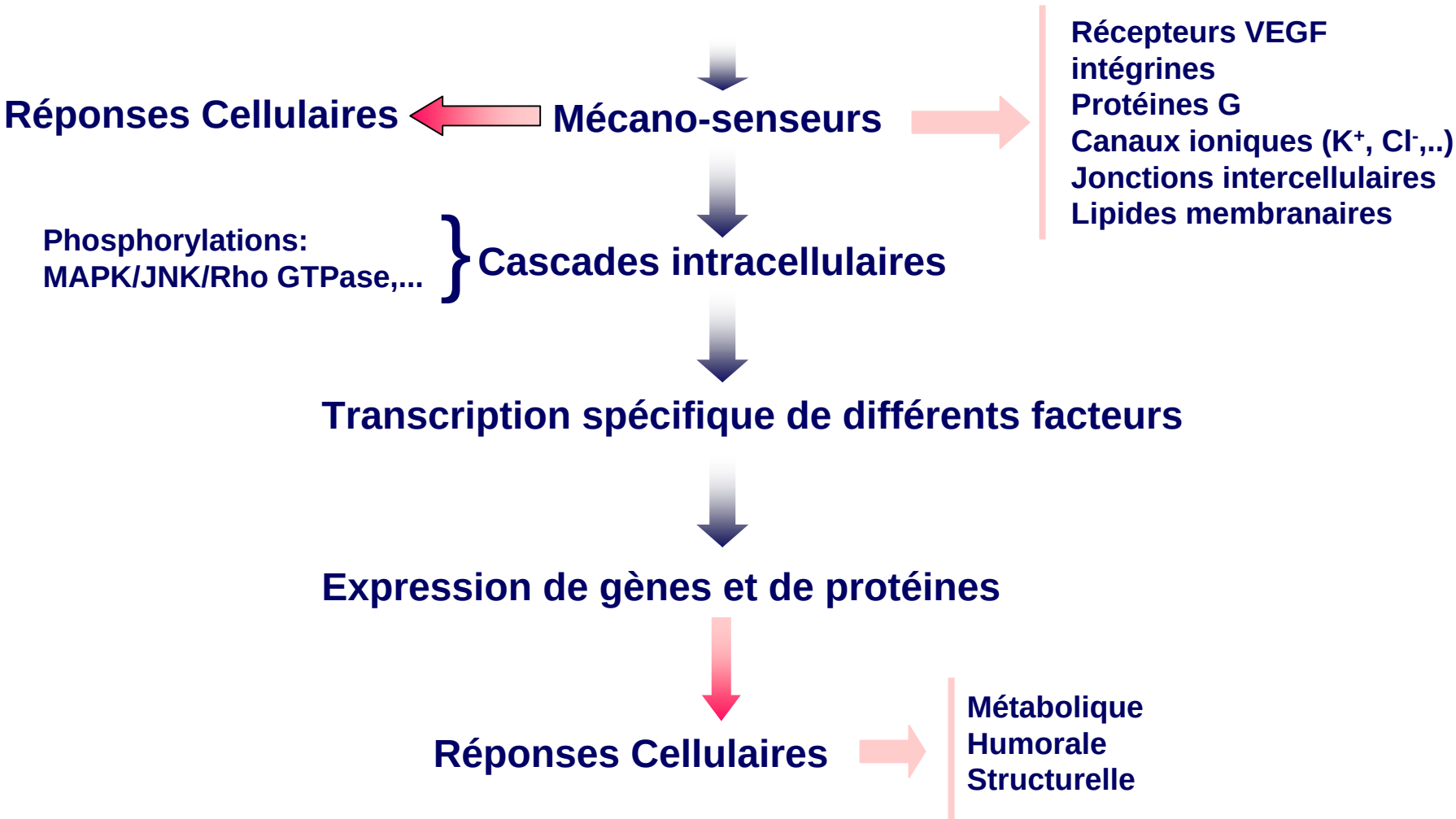
- Agonistes :
  - Sérotonine
  - Histamine
  - Angiotensine II
  - Acétylcholine
  - Vasopressine
  - ATP
  - Bradykinine
  - …..



Cellules musculaires

- VEGF
- Insuline

△Shear Stress



Pour en savoir plus…

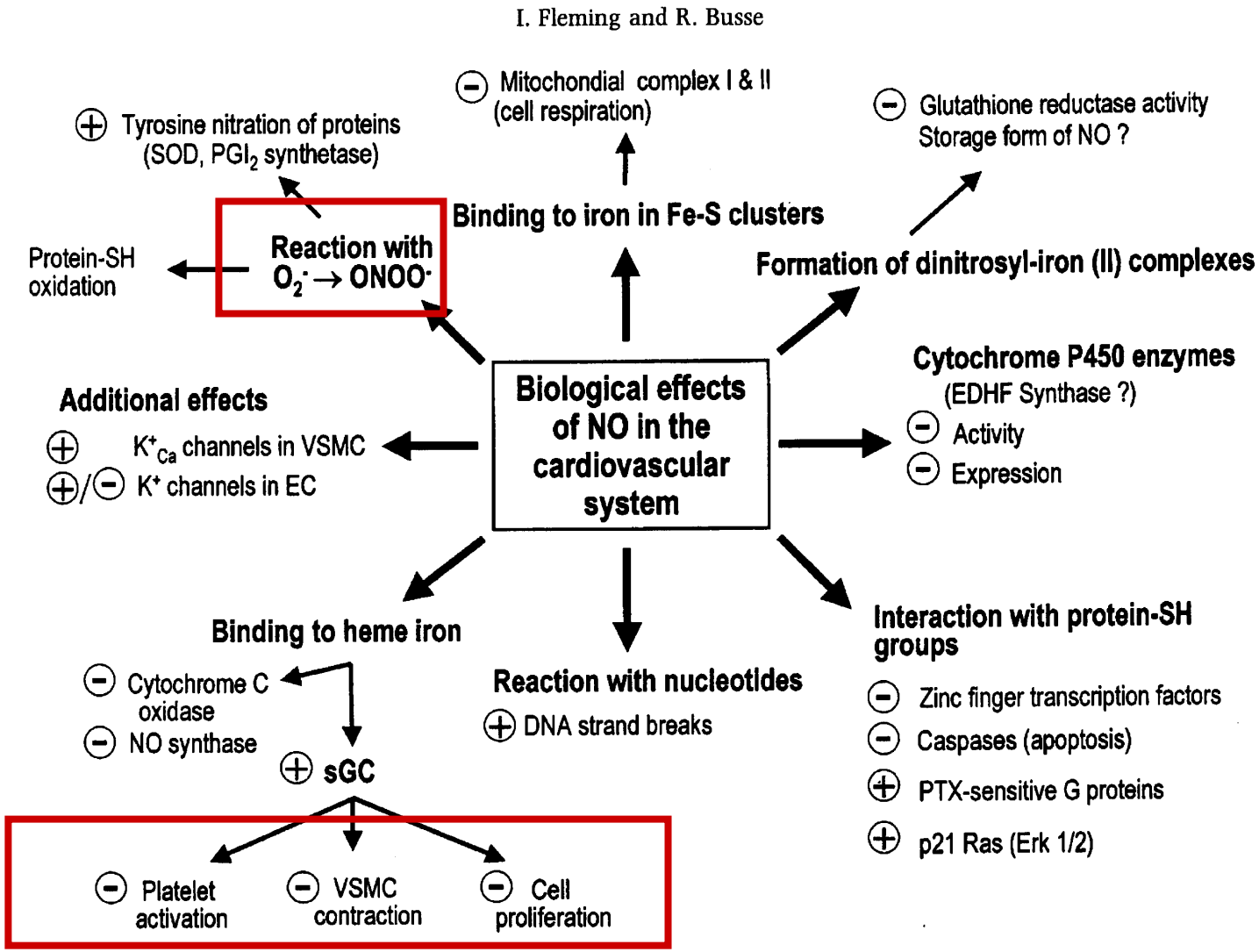
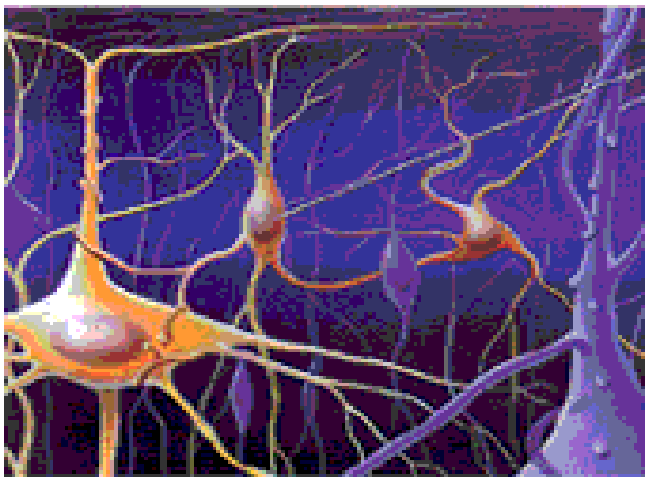
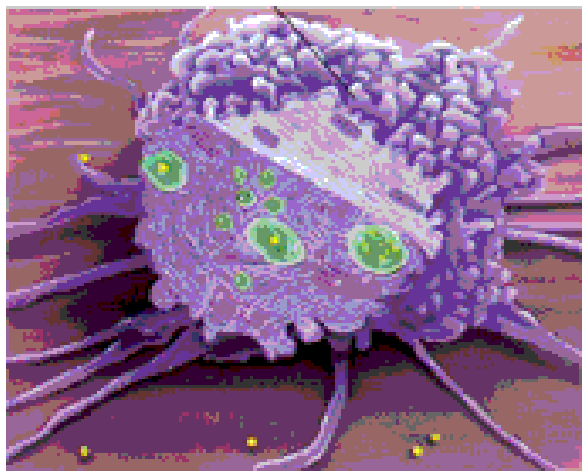


Figure 3 Scheme indicating the multitude of effects of nitric oxide (NO) on the vascular system.

Principales fonctions du NO

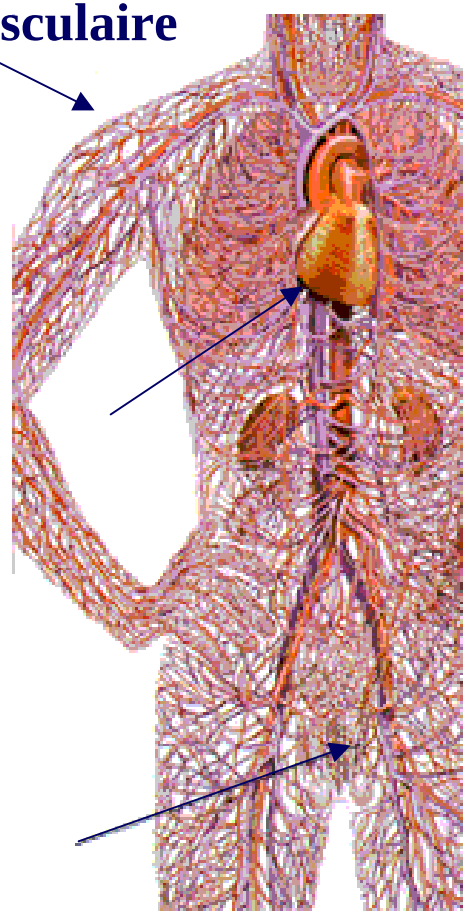


Neurones

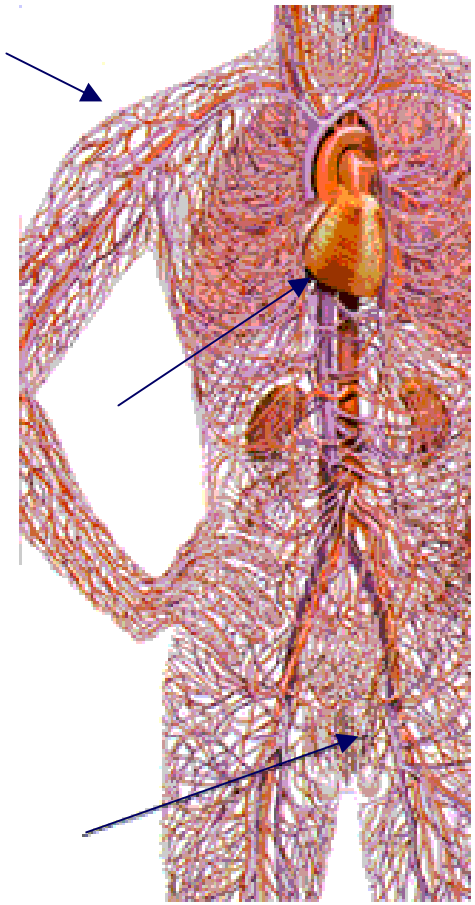


Macrophages

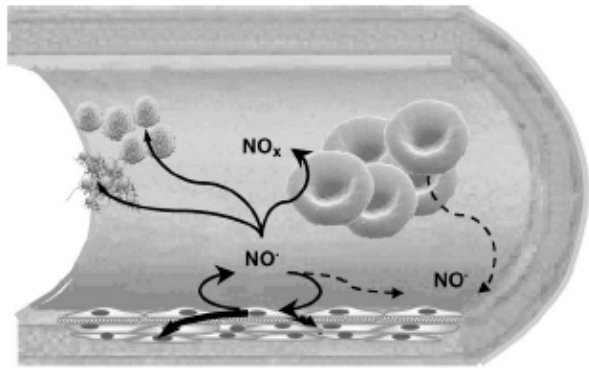
Système cardiovasculaire



Effets cardiovasculaires du NO

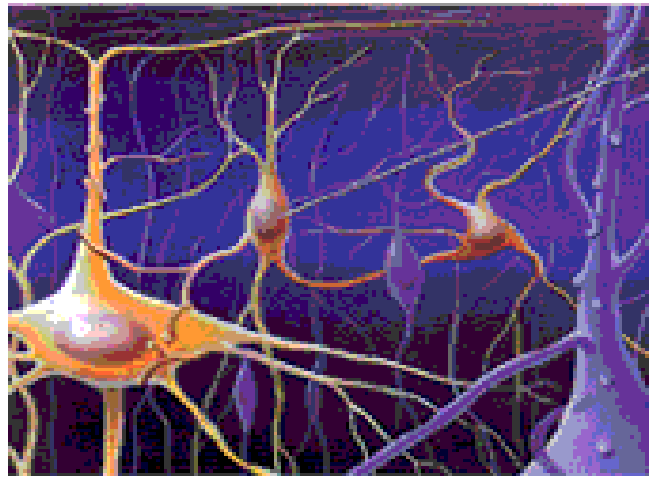


- Vasodilatation
- Inhibition de l'adhésion plaquettaire
- Inhibition de l'adhésion leucocytaire
- Effet inotrope négatif
- ↓ prolifération cellulaire
- ↑ Angiogenèse



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

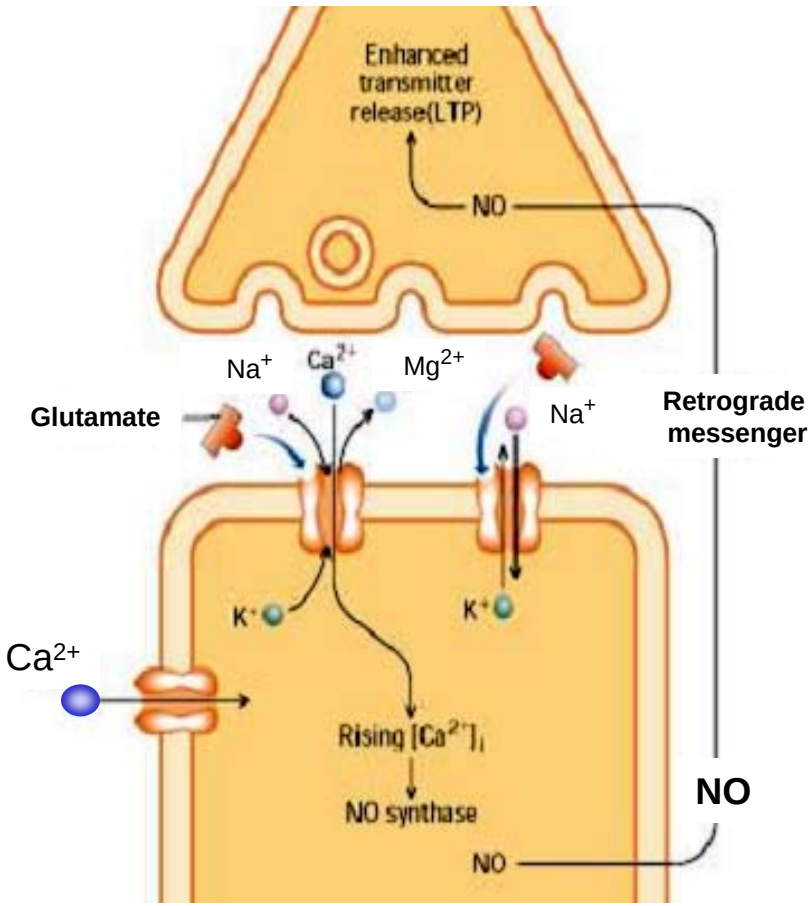
NO et système nerveux



- 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

- 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).

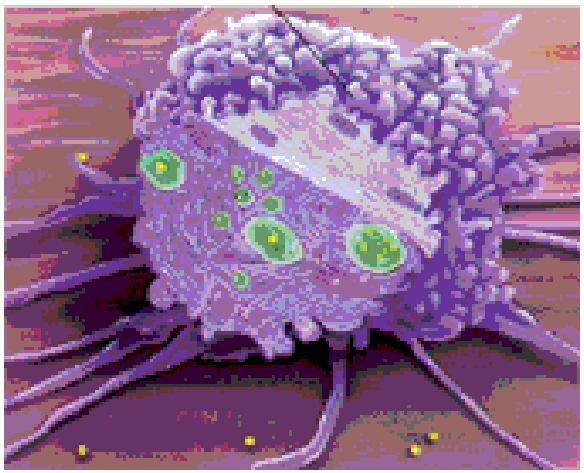


- **Effets centraux** : neurotransmission, Potentialisation à long terme – messager rétrograde - Plasticité (mémoire, appétit, nociception).
- **Effets périphériques** : neurotransmission (vidange gastrique, érection).

NO et mécanismes de défenses

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

- les cellules participant à la réaction inflammmatoire
- l'épithélium bronchique (si asthme)
- la muqueuse du colon (si colite ulcérative)
- 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 produit par iNOS

eNOS

✓ NO ↘

✓ Vasodilatation bénéfique

✓ Anti-inflammatoire par :

- ❖Diminution agrégation plaquettaire
- ❖Diminution adhésion leucocytaire

iNOS

✓ NO ↗↗↗↗↗

✓ Vasodilatation excessive
→ Choc

✓ Action pro-inflammatoire

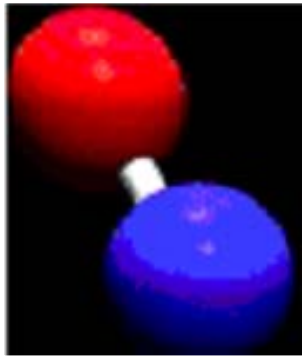
NO et pathophysiologie

⇩ NO

- « dysfonction endothéliale »
  hypercholestérolémie
  diabète
  …
- sténose hypertrophique du pylore du nouveau-né

⇧ NO

- maladies neurodégénératives
- choc septique

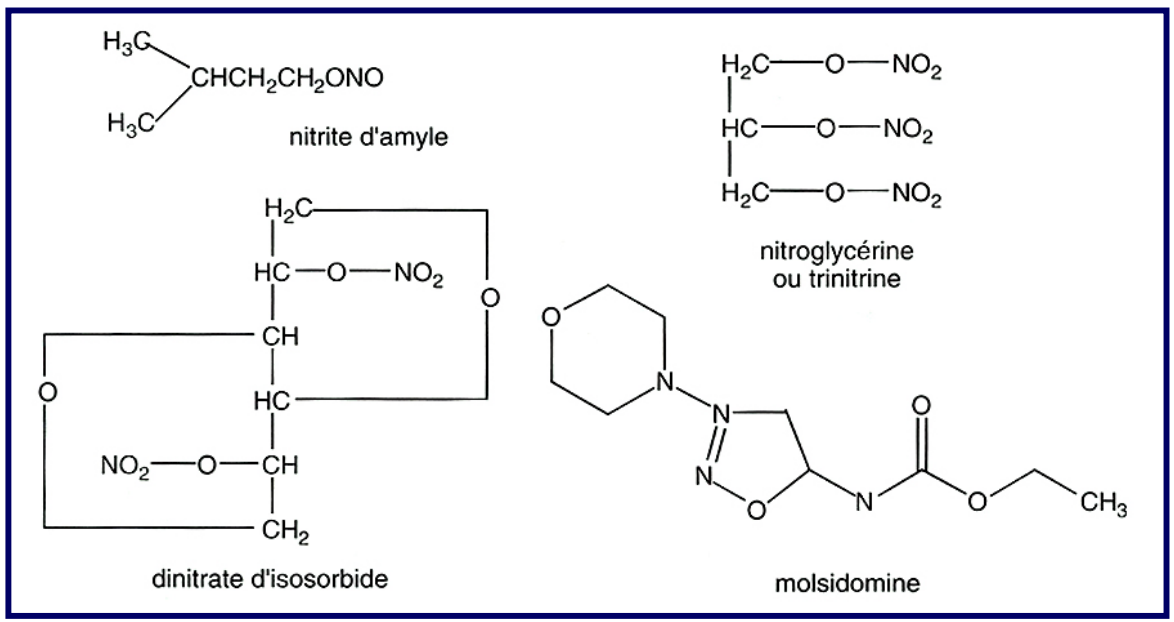


NO - Monoxyde d’azote

1. Introduction.
2. Synthèse, régulation, dégradation.
3. Les effets du NO:
   a) Aspects biochimiques et cellulaires.
   b) Effets cardiovasculaires.
   c) NO et système nerveux.
   d) NO et réponses inflammatoires.
4. Approche des cibles thérapeutiques.

Approches des cibles 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

- **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-slectifs décevants : ↑ mortalité cardiovasculaire!!!)**

- **ADMA/DDAH (nouvelle cible?):**

  ➡ **prévention de la dysfonction endothéliale associée à l'athérosclérose, l'hypertension, …**