

## Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle

Nicolas Sennequier  
Sandrine  
Vadon-Le Goff

Le monoxyde d'azote (NO) est un biomédiateur synthétisé par les NO synthases (NOS), une famille de trois isoenzymes. Ces enzymes héminiques catalysent l'oxydation de la L-arginine en N-hydroxyarginine (NOHA), puis de celle-ci en NO. Les NOS constituent, par leur structure à deux domaines, un cas unique chez les mammifères d'oxygénases à hème-thiolate autosuffisantes. Le mécanisme proposé de la transformation de la NOHA en NO par les NOS fait intervenir de manière originale un peroxyde de fer réactif. Les NOS sont réglées de multiples façons, au niveau transcriptionnel, par la concentration en calcium, par certains de leurs co-facteurs ou par leurs substrats et leurs produits. En faible concentration, NO est un neurotransmetteur et un agent vasodilatateur ; les fortes concentrations l'impliquent dans la réponse immunitaire, comme agent cytostatique et cytotoxique, mais aussi dans nombre de maladies. Celles-ci soulignent l'importance de l'inhibition spécifique des NOS, qui devrait être réalisable *in vivo* avec des inhibiteurs compétitifs du substrat tels que les S-alkylisothiourées ou la N<sup>0</sup>-propylarginine.

Qu'un gaz réactif dissous tel que le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle biologique pourrait étonner. Pourtant, il est impliqué dans deux fonctions biologiques essentielles : la transmission d'informations et la réponse immunitaire. Comment ce promeneur ignorant les membranes est-il synthétisé ? Quels sont les facteurs qui contrôlent cette synthèse ? Que peut-il se passer lorsqu'elle se déclenche à mauvais escient ? Comment peut-on prévenir un tel déclenchement ? Douze ans

après l'entrée de NO sur la scène des médiateurs biologiques, le moment semble venu pour une revue de l'avancement des travaux sur ces questions touchant nombre de maladies.

Nous verrons que NO, aux propriétés physico-chimiques insolites pour un médiateur biologique, est synthétisé par une famille d'enzymes tout aussi surprenantes, les NO synthases. Chacune des trois isoformes a été purifiée à partir de nombreux tissus. Actives sous forme homodimérique, elles ressemblent à un produit de la

### ADRESSES

N. Sennequier : *ingénieur-élève, corps des mines*. École nationale supérieure des Mines de Paris, 60, boulevard Saint-Michel, 75272 Paris Cedex 06, France. S. Vadon-Le Goff : *chargée de recherches au Cnrs*. Cnrs Ura 400, 45, rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France.

fusion d'un cytochrome P-450 et de sa réductase ; leur mécanisme semble s'inspirer du premier sans le copier jusqu'au bout. Elles sont réglées de multiples façons – entre autres, par leur propre produit. A partir d'un exemple de maladie due à une surproduction de NO – le choc septique – nous examinerons comment, par l'inhibition des NOS, éviter que NO ne nuise.

### Propriétés physico-chimiques du monoxyde d'azote

Même si NO a été considéré jusqu'en 1986 comme un simple gaz toxique, on ne doit finalement pas s'étonner de ses multiples propriétés biologiques, qui sont déterminées par sa réactivité chimique.

En effet, NO est un composé radicalaire réactif se présentant, dans les conditions normales de température et de pression, sous forme gazeuse [1]. Sa solubilité dans l'eau est comparable à celles du monoxyde de carbone (CO) et de l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>). La charge nulle de NO le rend en outre soluble dans les solvants apolaires, ce qui facilite sa diffusion au travers des membranes cellulaires.

La chimie de NO est dominée par sa nature radicalaire. Il réagit rapidement avec l'ion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup> pour former l'ion peroxyde ONOO<sup>-</sup>, connu pour sa toxicité. Il se couple au radical tyrosinyl de la ribonucléotide réductase. Il peut se lier à des sites de coordination libres dans des complexes métalliques. En particulier, il se fixe au Fe(II) : ainsi, la désoxyhémoglobine présente une affinité prononcée pour NO par rapport à CO et à O<sub>2</sub>, l'atome de fer étant alors oxydé en présence d'oxygène avec formation de méthémoglobine. De même, il se fixe à l'hème de la guanylate cyclase soluble (GCs), qui est l'une des ses principales cibles physiologiques. NO peut aussi se fixer à des complexes Fe-S tels que celui de l'aconitase. Enfin, il peut nitrosyler les sites SH libres de protéines, qui pourraient ainsi servir de « réservoir à NO ».

En solution aqueuse aérobie, NO est rapidement oxydé en nitrite. La vitesse de cette oxydation n'étant pas linéaire en fonction de la concentration en NO, celui-ci peut, en faible

concentration, évoluer pendant un certain temps et diffuser largement. En milieu biologique, s'il est difficile d'évaluer son temps de demi-vie, la diffusibilité de NO fait qu'il a de grandes chances de sortir de la cellule qui l'a produit. Des simulations cinétiques et de diffusion ont montré que, si  $t_{1/2} = 4$  s (ordre de grandeur généralement admis), la concentration de NO est non négligeable à plus de huit diamètres cellulaires de sa source de production [2].

La courte demi-vie de NO dans les milieux biologiques a également pour conséquence une quantification souvent difficile. Le *Tableau I* présente les principales méthodes mises en œuvre pour cette quantification [3]. Celle-ci est nécessaire pour mieux comprendre, d'une part, l'action de NO sur le milieu biologique, dans la mesure où cette action va d'abord dépendre de la quantité de NO capable d'atteindre les différentes cibles à sa disposition, et, d'autre part,

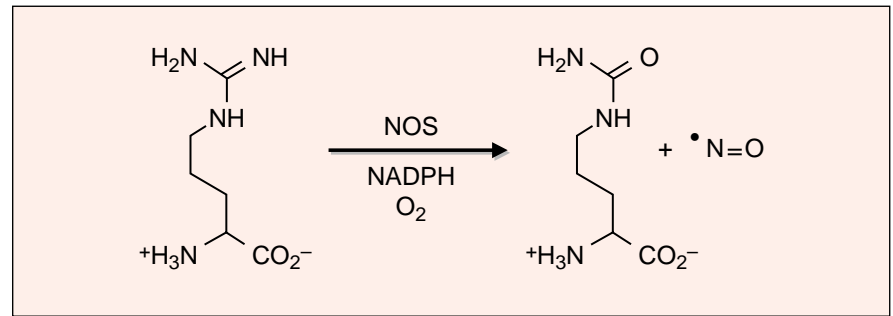


Figure 1. **Réaction catalysée par les NO synthases.** Les NOS oxydent la L-arginine en citrulline et NO en consommant du NADPH et de l'oxygène moléculaire. Cette activité n'est possible qu'en présence des co-facteurs BH<sub>4</sub> (tétrahydrobioptérine), FAD (flavine mononucléotide), FMN (flavine adénine dinucléotide) et hème.

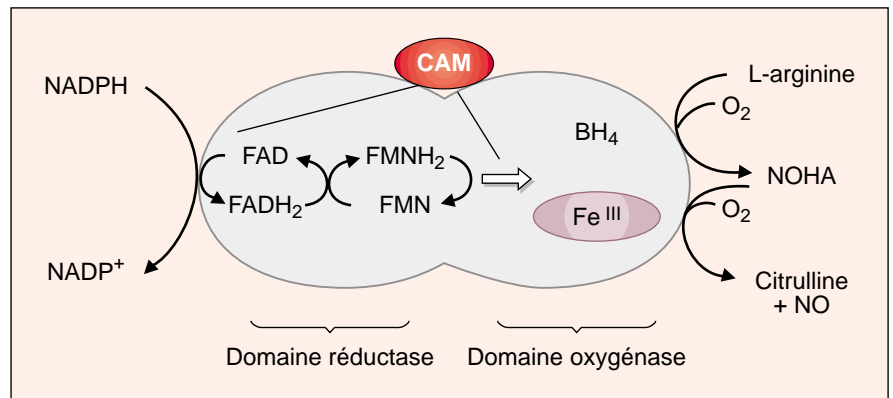


Figure 2. **Fonctionnement général des NOS.** Le NADPH se fixe au domaine réductase des NOS par lequel il est oxydé. Les deux électrons ainsi libérés transitent par le FAD puis le FMN avant d'aboutir dans le domaine oxygénase, qui possède les sites de fixation de BH<sub>4</sub> et de l'hème. Ce flux d'électrons n'est possible que si la calmoduline est couplée à la protéine, ce qui rend l'activité des NOS constitutives dépendante de la concentration en ions calcium (la calmoduline étant couplée fortement à l'isoforme inducible). Ce flux est également modulé par la présence du substrat, la L-arginine, qui l'accroît (NOS-2) ou l'inhibe (NOS-1) lorsqu'elle se fixe au site actif de l'enzyme. Le substrat est hydroxylé par l'hème du domaine oxygénase en NOHA grâce aux électrons provenant du NADPH et à de l'oxygène moléculaire. La NOHA est oxydée à son tour pour donner NO et la citrulline. Cette double oxydation est inhibée par NO, qui est capable de se fixer à l'atome de fer hémique.

Tableau I

## QUANTIFICATION DU MONOXYDE D'AZOTE

Principe et méthodes	Avantages et inconvénients
<b>Systèmes physiques de mise en évidence directe de NO</b>	
Chimioluminescence RPE (via des piègeurs de spin)	Méthodes assez sensibles mais délicates à mettre en œuvre
Électrochimie : électrode spécifique pour le NO	Utilisable dans des systèmes biologiques complexes. Savoir-faire peu accessible
<b>Systèmes biochimiques de mise en évidence de NO</b>	
Mesure de la vitesse initiale de synthèse de NO par suivi spectrophotométrique de l'oxydation de l'oxyhémoglobine	Test simple mais qui ne peut pas être réalisé en présence d'oxydants ou de réductases.
Production de GMPc par la GCs, relaxation de cellules musculaires lisses en présence de NO	Conditions proches de celles d'organismes
<b>Quantification d'ions nitrite et nitrate</b>	
Test de Griess Électrophorèse capillaire, chromatographie par échange d'ions	Tests simples, mais indirects (quantifiant les produits d'oxydation aérobie de NO)
<b>Quantification de la citrulline, coproduit de NO</b>	
Chromatographie liquide à haute pression ou électrophorèse capillaire, après couplage à un chromophore	Bonne sensibilité, mais la préparation des échantillons nécessite des manipulations qui peuvent être lourdes ou peu reproductibles

Les systèmes physiques de quantification directe de NO sont difficiles à mettre en œuvre ou nécessitent des appareillages complexes. La chimioluminescence ou l'électrochimie sont cependant utilisées pour mesurer le NO exhalé. La quantification directe de NO reste possible de façon simple grâce à la réaction de NO avec l'oxyhémoglobine. Malheureusement, ce système est soumis à d'importantes restrictions, qui ne le rendent utilisable que dans des cas circonscrits, par exemple avec une préparation de NOS purifiée. Les autres systèmes biochimiques sont moins simples à mettre en œuvre, mais ils présentent l'avantage de reproduire une partie des effets biologiques de NO. Le plus souvent, la forte réactivité de NO représente un obstacle à sa mise en évidence directe. Divers systèmes tirent donc parti de cette forte réactivité. Ainsi, la quantification des ions nitrite, produits relativement stables de l'oxydation de NO en présence d'O<sub>2</sub>, a lieu par le très simple test colorimétrique de Griess. La citrulline, coproduit dans la biosynthèse de NO, peut également être quantifiée. RPE : résonance paramagnétique électronique; GMPc : guanosine monophosphate cyclique; GCs : guanylate cyclase soluble.

comment NO est synthétisé en milieu biologique. Nous allons maintenant nous intéresser à cette biosynthèse.

## Biosynthèse du monoxyde d'azote

NO est synthétisé biologiquement par des enzymes appelées NO synthases (NOS, EC 1.14.13.39) (pour revue, voir [4]), qui consomment du β-nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et de l'O<sub>2</sub> pour oxyder la L-arginine en citrulline et NO (figure 1). Les NOS utilisent pour fonctionner un ensemble de co-facteurs : la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>, molécule impliquée dans les

hydroylations aromatiques réalisées par exemple par la tyrosine hydroxylase), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et un hème (protoporphyrine IX de fer).

Il existe trois isoformes de NOS (Tableau II). Chacune a été purifiée à partir de nombreux tissus (Tableau III) et leurs ADNc clonés chez l'homme [6]. Les différences majeures entre ces isoformes sont leur mode d'expression (les NOS-1 et 3 sont constitutives, la NOS-2 inducible) et la régulation des NOS-1 et 3, mais pas de la NOS-2, par la concentration en ions calcium (ce que nous détaillerons un peu plus loin). En

revanche, elles possèdent la même structure générale.

## Structure des enzymes NO synthases

La partie carboxy-terminale des NOS présente une forte homologie avec la cytochrome P-450 réductase, enzyme qui catalyse le transfert d'électrons du NADPH à des protéines héminiques telles que les cytochromes P-450, famille d'oxygénases à hème-thiolate. Ce domaine des NOS est couramment appelé « domaine réductase » (figure 2). Il est à l'origine de l'activité NADPH-diaphorase. Cette activité est utilisée par de nombreux groupes pour localiser les NOS dans les tissus ; elle consiste à suivre la réduction du bleu de nitrotétrazolium par le NADPH, catalysée par le domaine réductase de la NOS, réduction qui engendre un composé fortement coloré.

Les NOS possèdent de plus un certain nombre de points communs avec les cytochromes P-450. En particulier, l'atome de fer héminique des NOS est majoritairement sous forme ferrique à haut spin, pentacoordonné, et son ligand axial proximal est une cystéine [8]. Si le domaine amino-terminal n'offre globalement pas d'homologie de séquence avec les cytochromes P-450, un segment de neuf acides aminés, contenant la cystéine responsable de la coordination de l'hème, présente une forte similitude chez les NOS et les P-450 [9]. Le domaine amino-terminal des NOS étant impliqué dans la formation des produits, il est souvent appelé « domaine oxygénase » (figure 2).

Les NOS sont les premiers exemples d'oxygénases à hème-thiolate auto-suffisantes chez les mammifères, c'est-à-dire fonctionnant en l'absence d'autres enzymes telles que des réductases : elles ressemblent ainsi au cytochrome P-450<sub>BM-3</sub> bactérien.

Une autre originalité des NOS par rapport aux P-450 réside dans leur structure quaternaire. En effet, les NOS sont actives seulement sous forme homodimérique : le domaine oxygénase du monomère est inactif ; en revanche, le domaine réductase du monomère garde sa capacité de transférer des électrons. Le domaine oxygénase est responsable de la structure dimérique de la NOS-2, le

Tableau II			
CARACTÉRISTIQUES DES TROIS TYPES DE NO SYNTHASE HUMAINE			
	NOS-1	NOS-2	NOS-3
Type	constitutive	inductible	constitutive
Localisation	cytosol	cytosol	cytosol, membranes, mitochondries
Modifications post-transcriptionnelles	phosphorylation par l'acide aminé 372	phosphorylation	myristoylation (G2) palmytoylation (C15 et C26) phosphorylation
Nombre d'acides aminés	1 434	1 153	1 294
Masse moléculaire	160 kDa	130 kDa	133 kDa
Nombre de paires de bases du gène	> 15.10 <sup>4</sup>	3,7.10 <sup>4</sup>	2,1.10 <sup>4</sup>
Localisation du gène humain	chromosome 12, région 12q24-qter	chromosome 17, région 17 cen-q11.2	chromosome 7 région 7q35-36
Nombre d'exons	29	26	26
Activation	Augmentation de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Expression stimulée par cytokines et/ou endotoxines	Augmentation de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
Co-facteurs identifiés	NADPH, FAD, FMN, BH <sub>4</sub> , hème		

Trois isoformes de NO synthases ont été clonées et exprimées; leur classification découle de leur ordre historique de purification. La NOS-1 a initialement été appelée NOS<sub>n</sub> (isoforme « neuronale »); la NOS-2, NOS<sub>i</sub> (« inductible »); et la NOS-3, NOS<sub>e</sub> (« endothéliale »). Les NOS humaines présentent entre elles une homologie de séquence d'environ 55%. Les sites de fixation du NADPH, du FMN et de l'hème de la NOS-2 sont bien conservés par rapport à ceux de la NOS-1 et de la NOS-3, alors que ceux du FAD et de la calmoduline le sont moins. Les NOS-1 et 2 sont essentiellement des enzymes solubles, même si la NOS-1 présente dans les muscles squelettiques est fortement associée au sarcolemme [5]. La NOS-3 est principalement présente dans les cellules endothéliales vasculaires sous forme cytosolique et surtout membranaire: on la trouve de façon prédominante dans l'appareil de Golgi et les vésicules cytoplasmiques. La NOS-3 est acylée irréversiblement par l'acide myristique (en Gly 2) et réversiblement par l'acide palmitique (en Cys 15 et Cys 26) [6]. Si ces acylations ne sont pas indispensables à l'activité de l'enzyme, la myristoylation est nécessaire à la palmitoylation qui semble elle-même nécessaire à l'association membranaire de l'enzyme, au niveau de domaines appelés caveolae [7]. La fixation de la calmoduline semble, en outre, jouer un rôle dans cette association à la membrane. Enfin, la phosphorylation de la NOS-2 semble possible, mais le site exact n'est pas connu. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup>.

domaine réductase déstabilisant le dimère [10]. En revanche, dans les NOS-1 et 3 se produisent également des interactions réductase-réductase et réductase-oxygénase [11]. La présence de calmoduline induit la dimérisation du domaine oxygénase de la NOS-3 [12], qui conserve son pouvoir catalytique lorsqu'on le met en présence de son domaine réductase.

Les conditions d'assemblage des sous-unités diffèrent selon le type de NOS. Pour la NOS-2, hème et BH<sub>4</sub> (ou un analogue [13]) sont nécessaires à la formation du dimère, la présence de L-arginine (ou d'un analogue [14]) facilitant cette dimérisation. En revanche, pour les NOS-1 et 3, seul l'hème est indispensable à la dimérisation [15-16], BH<sub>4</sub> servant à

stabiliser le dimère ainsi formé. Dans la mesure où le site de fixation de BH<sub>4</sub>, au voisinage de l'hème, est proche de celui du substrat, et que la fixation de BH<sub>4</sub> modifie l'environnement stérique et électronique de l'hème [17], la dimérisation des NOS et la fixation de BH<sub>4</sub> semblent deux événements cruciaux dans la formation de la structure native du site actif.

Cela a été confirmé par deux structures cristallines partielles de NOS obtenues récemment [18]. Il s'agit des structures du domaine oxygénase de la NOS-2, cristallisé sous forme monomérique [18] ou dimérique [19]. Plusieurs éléments sont remarquables: la protéine possède une structure originale, en forme de « gant de *base-ball* », avec l'hème fixé « au creux de la paume ». Contrairement aux P-450, elle est essentiellement composée de feuillets β. Les régions hydrophobes mobiles et exposées des monomères sont repliées dans le dimère pour former le canal d'accès du substrat et lier deux molécules de BH<sub>4</sub> au cœur de la vaste interface des monomères (2 800 Å de surface enfouie, soit plus de 85 acides aminés par sous-unité). Le canal d'accès du substrat, en forme d'entonnoir, est profond d'environ 30 Å pour atteindre la poche distale de l'hème, et formé principalement des résidus d'un seul monomère. La position de la ptérine indique une influence indirecte (structurale et électronique) sur la fixation et la transformation du substrat. L'hème est tordu pour faciliter les interactions favorables (*π-stacking*) avec la fonction guanidine de la L-arginine. La fonction amino-acide de la L-arginine interagit à la fois avec un réseau de résidus hydrophiles, directement liés à des éléments impliqués dans la formation du dimère, et avec un groupement propionate de l'hème lui-même lié à la BH<sub>4</sub>. Cela explique probablement la coopérativité de la dimérisation avec la fixation de BH<sub>4</sub> et du substrat.

La structure à deux domaines et deux sous-unités des NOS leur permet de catalyser l'oxydation de la L-arginine en NO.

## Mécanisme des NOS

La formation de NO et de citrulline catalysée par les NOS implique, pour



Tableau III  
LOCALISATION DES ISOFORMES DE NOS

Isoforme	Organe/tissu	Cellules
NOS-1	cerveau	neurones
	système nerveux périphérique	neurones
	rétine	cellules photoréceptrices
	muscle squelettique	
	poumon	cellules épithéliales
	pancréas	îlots de Langerhans
	rein	macula densa
	endomètre	épithélium colonnaire
NOS-2 induite	estomac antérieur	muqueuse gastrique
		macrophages
		lymphocytes,
		neutrophiles,
	os	ostéoblastes
	foie	cellules de Kupffer,
NOS-2 exprimée spontanément	vaisseaux sanguins	hépatocytes
		cellules musculaires lisses
	cerveau	cellules macrogliales et microgliales
	sang	plaquettes
NOS-2 exprimée spontanément	poumon	cellules épithéliales
	sang	plaquettes
	vaisseau sanguin cérébral au cours du développement du cerveau	
NOS-3	vaisseau sanguin	endothélium
	cerveau	
	hippocampe, cervelet, bulbe olfactif	cellules pyramidales
	sang	plaquettes
	cœur	myocytes
	poumon (pendant 15 jours après la naissance)	cellules épithéliales alvéolaires
	rein	cellules épithéliales tubulaires

Les isoformes de la NOS sont exprimées dans de nombreux tissus (ce tableau regroupe des résultats obtenus sur plusieurs espèces de mammifères). La NOS-2 en particulier a été exprimée par des types de cellules variés en réponse à des cytokines ou des endotoxines ; cette isoforme est également présente constitutivement dans certaines cellules : elle y serait donc constitutive. Chez le rat, la NOS-3 a été détectée dans des mitochondries du cerveau, du foie, du cœur, des muscles squelettiques et des reins.

tion de l'oxygène par transfert d'H<sup>+</sup> (ce dont la NOHA est incapable), ce qui provoquerait la différence de mécanisme entre les deux étapes [19].

Parce qu'elle correspond à une oxydation à trois électrons de la NOHA, la seconde étape paraît moins classique que la première. Ainsi, le réducteur, le NADPH, apporte un électron [21] et non deux. L'hème intervient et, inversement, des P-450 sont capables d'oxyder la NOHA en citrulline et NO [22]. En se fondant sur le mécanisme de la P-450 aromase et sur la faculté de O<sub>2</sub><sup>-</sup> d'oxyder des hydroxyguanidines [23], on peut décrire un mécanisme pour l'oxydation de la NOHA catalysée par les NOS (*figure 3*) [24]. Les mécanismes postulés actuellement pour les deux étapes ne font pas intervenir BH<sub>4</sub>, dont l'implication dans l'acte catalytique ne peut cependant pas être totalement écartée. En effet, l'état redox de ce co-facteur semble essentiel à l'activité de l'enzyme [13].

## Régulation des NOS

La formation effective de NO selon le mécanisme que nous venons de décrire n'est possible que si les NOS sont actives. Or la biosynthèse de NO est réglée à plusieurs niveaux : transcriptionnel, mais aussi par la concentration du milieu en ions calcium, par l'assemblage du dimère des NOS, ou encore par leurs substrat et produit (arginine, NO).

Nous avons vu plus haut que les NOS-1 et NOS-3 sont constitutives et la NOS-2 inducible. La NOS-2 est en effet exprimée dans la plupart des cellules nucléées de mammifère examinées, sous l'action d'endotoxines (lipopolysaccharides) ou de cytokines (TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukines, interféron  $\gamma$ ) via l'activation de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B. Sont concernées en particulier les cellules du système immunitaire telles que les macrophages [25], y compris humains. La difficulté à mettre en évidence l'expression de la NOS-2, qui a été constatée avec les macrophages humains, semble en effet levée lorsque les macrophages proviennent de patients atteints de diverses maladies infectieuses ou inflammatoires. La NOS-2 ne serait cependant pas

l'atome d'azote concerné dans la L-arginine, un changement de degré d'oxydation de -III à +II, soit une oxydation à 5 électrons. Une telle catalyse est inhabituelle pour une oxygénase. La découverte d'un intermédiaire, la N<sup>o</sup>-hydroxy-L-arginine (NOHA), a simplifié ce problème : la L-arginine serait monohydroxylée en NOHA avec formation d'une fonction hydroxyguanidine selon un

mécanisme analogue à celui des P-450 (mécanisme aujourd'hui bien décrit [20]), dans lesquels il existe des précédents de N-hydroxylation de guanidines. La NOHA resterait dans le site actif de l'enzyme pour subir une oxydation sur le même atome d'azote, fournissant NO. La structure cristalline suggère que, juste avant sa transformation, la L-arginine interviendrait dans l'activa-

uniquement inductible, car elle est exprimée continuellement dans l'épithélium respiratoire humain, les plaquettes sanguines ainsi que, de manière transitoire, dans les vaisseaux sanguins cérébraux au cours du développement du cerveau du rat. Inversement, il existe une certaine régulation de l'expression de la NOS-3 par des facteurs tels que les contraintes de cisaillement ou l'exposition aux œstrogènes.

La distinction entre isoformes constitutives et inductible s'étend à la régulation par le couplage à la calmoduline (CaM). Les NOS-1 et 3 ne sont en effet actives qu'après couplage à la calmoduline, qui intervient comme un interrupteur permettant le flux d'électrons au sein de l'enzyme [26]. L'activité de ces deux isoformes est donc réglée par la concentration du milieu en ions calcium qui règle le couplage de la CaM [25]. L'activité de la NOS-2 est, en revanche, indépendante des ions calcium, car cette isoforme est fortement couplée à la calmoduline. De ce fait, la NOS-2 produit de manière continue du NO. La non-régulation de la NOS-2 par les ions calcium rend d'autant plus importante une expression adéquate de cette isoforme.

La fixation de la calmoduline interviendrait aussi dans l'assemblage des monomères de la NOS-3 [12]. La dimérisation pourrait donc constituer un autre moyen de régulation des NOS. Un inhibiteur endogène de NOS-1 a ainsi été récemment mis en évidence, le PIN (protéine inhibitrice de la NOS-1), une des protéines les plus conservées dans la nature [27]. Elle agit vraisemblablement en déstabilisant le dimère.

La phosphorylation pourrait représenter un mécanisme de régulation supplémentaire pour l'ensemble des NOS, mais le rôle de cette modification post-transcriptionnelle n'est pas encore bien compris [7].

Le substrat lui-même joue un rôle dans la régulation de l'activité des NOS. De fait, comme certains cytochromes P-450, les NOS produisent, en l'absence de substrat, des ions superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, par transfert d'électrons du NADPH à  $O_2$  via l'hème (transfert appelé « découplage »). La saturation en L-arginine provoque une diminution de la vitesse d'oxydation du

NADPH d'un facteur 2 à 3 pour la NOS-1, contre une augmentation d'un facteur 4 à 6 pour la NOS-2. Pour la NOS-1, cette diminution résulte probablement de la régulation par la concentration en calcium, ce qui suggère que, le substrat ne manquant pas dans des conditions normales de fonctionnement, le découplage se produit rarement. Pour la NOS-2, la diminution de la consommation de NADPH lorsque le substrat vient à manquer pourrait être un mécanisme limitant la production d'espèces oxydantes si l'activité de cette isoforme devait être réglée par la concentration en L-arginine.

En effet, l'apport en substrat pourrait régler l'activité des NOS. L'arginine disponible, et donc la production de NO, pourrait être modulée par l'arginase [28], enzyme qui transforme l'arginine en urée et ornithine, et est présente (entre autres) dans les cellules endothéliales et les macrophages. De plus, la NOHA s'est avérée récemment être l'un des meilleurs inhibiteurs d'arginase [29]. Il pourrait donc exister une régulation croisée des deux systèmes enzymatiques métabolisant l'arginine, NOS et arginase.

NO lui-même inhibe les NOS : il peut en effet se fixer à l'atome de fer des NOS, avant même de quitter le site actif. Le complexe inactif résultant se forme transitoirement pendant la production de NO ; il représente 80 % de l'enzyme totale dans le cas de la NOS-1. Il est instable en pré-

sence d' $O_2$ , dont la concentration module l'activité de la NOS-1. Les NOS pourraient donc jouer le rôle de sondes à  $O_2$  [30].

La biosynthèse de NO est ainsi réglée de multiples façons.

## Rôles biologiques de NO

L'éventail des propriétés biologiques de NO, et des maladies associées, continue à s'étendre. Nous allons donc présenter ces propriétés de façon synthétique, en nous concentrant sur leur originalité et en nous appuyant sur des exemples. Nous ne détaillerons pas les maladies dans lesquelles NO semble impliqué. Le *Tableau IV* en présente quelques exemples (pour revue, voir [31-33] et références citées pour plus de détails). Du fait de sa réactivité, NO atteint potentiellement toutes les cibles à sa portée. L'impact de la biosynthèse de NO dépend donc, d'une part, de la quantité produite et, d'autre part, des cibles situées à proximité du lieu de cette synthèse.

Par exemple, lorsque la cible est une enzyme, NO peut provoquer, soit une activation, soit une inhibition. La guanylate cyclase (GCs), enzyme hémérique pour laquelle il présente une forte affinité, est ainsi activée réversiblement par NO, ce qui fait de lui, en fonction des cellules émettrice et cible, un neurotransmetteur ou un vasodilatateur (le mécanisme d'action de NO dans ces deux rôles est détaillé dans la *figure 4A*).

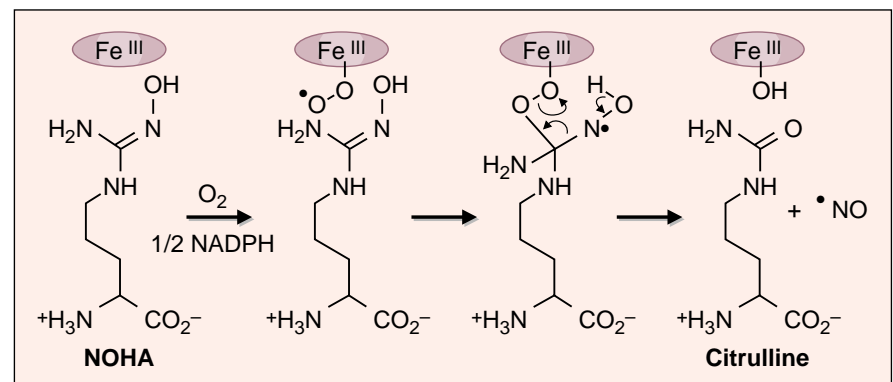


Figure 3. **Mécanisme d'oxydation de la NOHA en NO par les NOS.** Selon l'un des mécanismes proposés à ce jour pour l'oxydation de la NOHA en NO par les NOS [24], l'atome de fer hémérique est réduit par un électron provenant du NADPH avant de fixer une molécule d'oxygène. Le peroxyde de fer formé, qui possède le degré d'oxydation compatible avec la formation de NO, réagit avec la NOHA pour former un intermédiaire qui se décompose en NO, citrulline, et atome de fer hémérique au degré d'oxydation initial.

Tableau IV

QUELQUES EXEMPLES DE MALADIES DANS LESQUELLES UN DÉRÈGLEMENT DE LA PRODUCTION DE NO EST VRAISEMBLABLEMENT IMPLIQUÉ

Isoforme probablement impliquée	Production de NO	Maladies liées à NO
NOS-1	+	ischémie cérébrale
	-	impuissance sexuelle masculine
NOS-1 ou/et NOS-2	+	maladies neurodégénératives (Parkinson, Huntington, sclérose latérale amyotrophique...)
NOS-2	+	choc septique
	+	arthrite rhumatoïdale
	+	diabète
	+	certaines cancers
NOS-3	-	hypertension
	-	athérosclérose
	-	angine de poitrine
	+	migraines

La première colonne indique l'isoforme de NOS vraisemblablement impliquée, la seconde le type de dérèglement de la production de NO (+: production excessive de NO. -: sous-production ou défaut de NO) et la troisième les maladies qui peuvent en découler. Les inhibiteurs sélectifs des NOS devraient fournir de nouveaux outils thérapeutiques pour ces maladies. Ces inhibiteurs ne seront néanmoins d'aucune aide pour les maladies caractérisées par une sous-production de NO, dans lesquelles peuvent être utilisés les donneurs de NO, tels que la nitroglycérine pour le traitement de l'angine de poitrine.

Un des rôles les plus intéressants de NO provient de sa capacité de traverser les membranes et de sa large diffusion potentielle à faible concentration : il synchroniserait, par activation de la GCs, des processus biologiques dans une zone de l'organisme. Ainsi, au sein du système nerveux central, NO émis par certaines fibres post-synaptiques à la suite de leur excitation, diffuserait dans la fibre présynaptique d'où, par augmentation de l'intensité des influx nerveux ultérieurs, son intervention dans les processus de mémorisation par potentialisation à long terme (par exemple, dans la mémorisation par la brebis de l'odeur de l'agneau nouveau-né [34]). Il pourrait simultanément atteindre les vaisseaux sanguins avoisinants et ainsi provoquer un accroissement du débit sanguin dans cette zone active du cerveau. Une plasticité similaire à celle observée dans les neurones pourrait exister dans les ostéoblastes, qui produisent en effet du NO en réponse à une contrainte mécanique. Ce NO interviendrait dans la distribution de la charge et dans la

coordination de la synthèse et de la résorption de matériau osseux [35]. Une forte quantité de NO, en revanche, entraîne l'inhibition d'enzymes essentielles au fonctionnement cellulaire, comme la ribonucléotide réductase et certaines enzymes du transport électronique mitochondrial (*via* la destruction des *clusters* Fe-S des mitochondries), éventuellement après réaction de NO avec l'ion superoxyde pour former l'ion peroxyde nitrite. D'où l'implication de NO, après sa synthèse par des macrophages activés, dans la défense immunitaire comme instrument de destruction de cellules bactériennes et tumorales (*figure 4B*). Enfin, lorsque NO est synthétisé en trop forte quantité ou dans un endroit inapproprié, diverses maladies peuvent survenir (*Tableau IV*).

### L'exemple du choc septique

Un cas extrême de forte production de NO est le choc septique. L'issue de ce choc est souvent fatale : le taux

de mortalité est estimé à 40-50 %. Chez l'homme, le choc septique est caractérisé par l'invasion microbienne du système circulatoire, une hypotension accompagnée d'hyporéactivité aux agents vasopresseurs [25], des fuites vasculaires et le dysfonctionnement de multiples organes. Il a été montré que ce choc s'accompagne, chez les patients, d'une augmentation de la concentration sanguine d'oxydes d'azote, de TNF- $\alpha$  et d'interleukine-8 [36], de l'activation de nombreux types cellulaires et de facteurs de la coagulation. De plus, le choc septique provoqué par l'injection de lipopolysaccharides est moins sévère sous anesthésie chez des souris incapables d'exprimer la NOS-2 (NOS-2<sup>-/-</sup>) que chez des souris témoins [37]. L'expression incontrôlée de NOS-2 par les tissus vasculaires, en réponse à l'infection, est donc probablement en partie responsable des symptômes observés [35] : le NO produit surstimule les mécanismes régulateurs de la pression sanguine normalement réglés par la NOS-3 [36].

Même s'il existe de nombreux facteurs autres que NO responsables du choc septique (ainsi, l'absence d'anesthésie supprime la résistance au choc septique des souris NOS-2<sup>-/-</sup> [37]), l'inhibition de la production de NO semblerait une réponse adéquate à l'hypotension engendrée par le choc septique, à la condition qu'elle n'empêche pas la guérison de l'infection. Cependant, si elle provoque bien une diminution de la concentration sanguine de nitrites, l'administration d'inhibiteurs de NOS tend à aggraver la mortalité induite par le choc septique. En effet, il est probable que ces inhibiteurs suppriment les fonctions régulatrices de la NOS-3 sur la microcirculation et empêchent NO de protéger les hépatocytes de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  [38]. L'inhibition spécifique de la NOS-2 a donc été tentée, avec succès. Une dose adéquate d'inhibiteur (la S-méthylisothiocitrulline, dans ce cas) réduit l'hypotension sans interférer avec le fonctionnement de la NOS-3 [39]. Si elle ne semble pas réduire les dommages infligés au foie, un des organes les plus atteints lors du choc septique, cette inhibition de la NOS-2 semble atteindre son but premier :

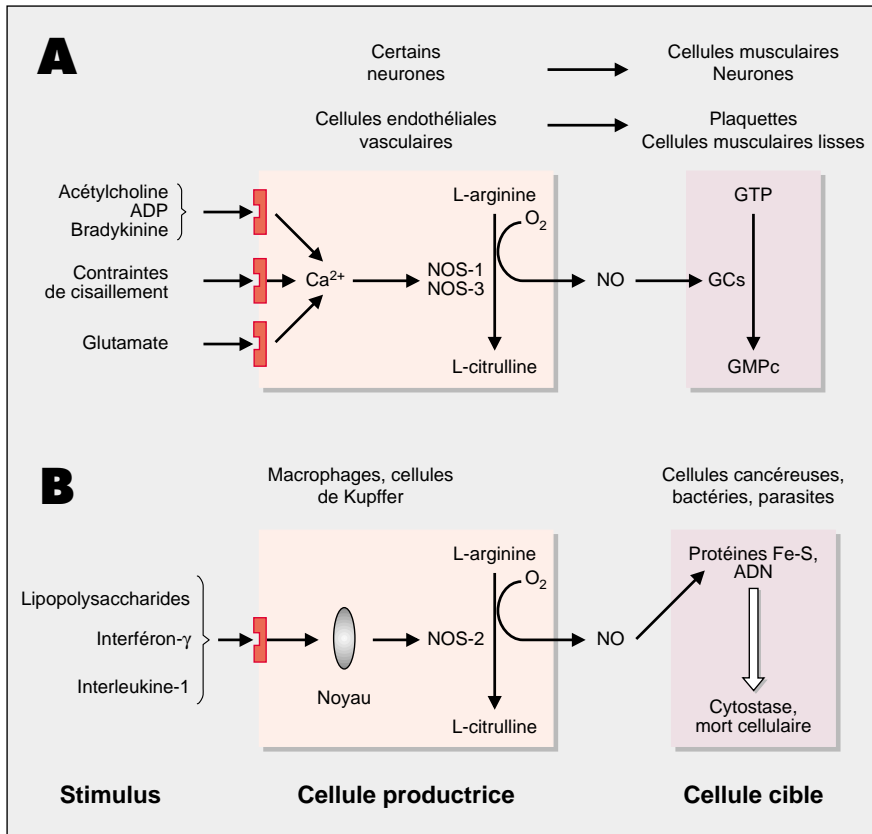


Figure 4. **Synthèse du monoxyde d'azote par les NOS.** A. NO, produit par les isoformes constitutives (NOS-1 et NOS-3), est impliqué dans la transmission d'information, en particulier comme neurotransmetteur lorsqu'il est sécrété par la NOS-1 d'un neurone, et comme vasodilatateur lorsqu'il est sécrété par la NOS-3 d'une cellule endothéliale vasculaire. Un stimulus, tel que le glutamate pour un neurone postsynaptique, ou la contrainte de cisaillement pour une cellule endothéliale, provoque une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium. La calmoduline se fixe alors à l'isoforme constitutive, qui produit du NO. Celui-ci peut diffuser au travers des membranes cellulaires pour atteindre une cible dans une cellule voisine. Lorsque cette cible est la guanylate cyclase, la production de GMPc résultante provoque par exemple une relaxation (si la cellule cible est une cellule musculaire lisse). B. NO, produit par l'isoforme inducible (NOS-2), est impliqué principalement dans la défense immunitaire. L'activation de macrophages par des cytokines ou des endotoxines provoque l'expression de la NOS-2. Celle-ci, n'étant apparemment pas réglée post-transcriptionnellement, produit du NO en continu: la quantité de NO produite dépend donc de celle de NOS-2 exprimée. NO peut alors intervenir sur des cellules tumorales et bactériennes par son action cytostatique et cytotoxique.

réduire la mortalité occasionnée par le choc septique [40] (dans cet exemple, la L-canavanine a été utilisée comme inhibiteur). L'exemple du choc septique souligne l'importance d'une inhibition appropriée des NOS, et les caractéristiques à en attendre. Cette inhibition doit

bien sûr être efficace, afin que les effets secondaires potentiels des inhibiteurs soient limités par leur faible dose. Elle doit aussi être spécifique d'une isoforme, pour ne pas atteindre de mécanisme régulateur dans lequel intervient une des deux autres isoformes.

## Inhibition des NOS

Les informations disponibles sur les mécanismes de fonctionnement et de régulation des NOS permettent d'envisager plusieurs stratégies pour une inhibition qui réponde aux critères d'efficacité et de sélectivité (pour revue, voir [41]).

L'action sur le domaine réductase (par exemple par le diphénylèneiodonium) ou sur l'hème (par exemple par le 1-phénylimidazole) semble difficilement applicable, étant donné la variété d'enzymes susceptibles d'être inhibées simultanément. En revanche, l'inhibition du couplage avec la calmoduline (réalisée grâce à des chimères de CAM et de troponine C [42]) et de la fixation de la ptérine (avec le 7-nitro-indazole, par exemple [43]) semblent des pistes intéressantes.

Dans le cas de la NOS-2, on pourrait aussi jouer directement sur l'expression de la protéine [25]: elle est inhibée par les glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone ou l'hydrocortisone, en partie *via* la synthèse de la protéine inhibitrice IκB (*m/s 1996, n° 2, p. 236*). Les glucocorticoïdes présentent néanmoins l'inconvénient d'inhiber l'expression de nombreuses protéines. Une autre piste prometteuse est celle de l'inhibition de la dimérisation de la NOS-2 au moment de son expression.

Les inhibiteurs compétitifs du substrat représentent cependant l'une des voies les plus prometteuses [44]. De petites molécules, qui ne sont pas des acides aminés, ont été récemment décrites comme des inhibiteurs efficaces de NOS. L'aminoguanidine [45] est ainsi un inhibiteur assez puissant ( $K_i = 16 \mu\text{M}$  pour la NOS-2 *in vitro*) et surtout relativement sélectif de la NOS-2, même *in vivo*. Des familles d'isothiourees [46] et d'amidines [47] ont été développées; selon les groupements chimiques portés par ces composés, on observe *in vitro* une certaine sélectivité pour l'une ou l'autre des isoformes. Le 1400W ou N(-3-(aminométhyl)benzyl)acétamidine est particulièrement prometteur, par sa capacité à inhiber sélectivement la NOS-2 dans certains tests tels que la contraction d'anneaux d'aorte (sélectivité de 1000 pour la NOS-2 par rapport à la NOS-3), et par son activité dans un



modèle animal de choc endotoxique [47].

Des études *in vitro* et *in vivo* utilisent couramment des analogues d'arginine qui se fixent de façon compétitive et efficace au site du substrat, tels que la N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine, la N<sup>ω</sup>-méthyl-L-arginine, la L-canavanine, la N<sup>6</sup>-(1-iminoéthyl)-L-lysine et la S-méthylisothiocitrulline. Ces analogues étaient globalement peu sélectifs, jusqu'à la découverte récente et inattendue de la N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine comme excellent inhibiteur sélectif de la NOS-1 (K<sub>i</sub> = 57 nM, sélectivité par rapport aux NOS-2 et 3 : 3 158 et 149 respectivement) [48]. Et ce alors que les méthyl, éthyl, allyl et propargyl-L-arginine ne présentent que peu ou pas de sélectivité.

Parce qu'ils n'agissent que sur le domaine oxygénase, les inhibiteurs compétitifs du substrat ne bloquent pas l'activité NADPH-diaphorase des NOS, dans laquelle seul le domaine réductase est impliqué. Ils doivent néanmoins être utilisés avec prudence *in vivo*, à cause du découplage possible. En effet, toute molécule qui pénètre dans le site actif est susceptible d'accélérer le transfert d'électrons du domaine réductase à l'hème, comme le ferait la L-arginine, sans être transformée comme elle [14]. Il en résulterait une production de O<sub>2</sub><sup>-</sup> et de peroxyde d'hydrogène. La N<sup>ω</sup>-méthyl-L-arginine, par exemple, entraîne un fort découplage de l'oxydation du NADPH. Or la production simultanée de NO et de O<sub>2</sub><sup>-</sup> engendre celle de peroxynitrite, qui peut être bien plus toxique que NO.

Si la découverte de la N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine montre que des molécules simples peuvent s'avérer des inhibiteurs efficaces et sélectifs, l'élargissement de la palette d'inhibiteurs véritablement spécifiques reste nécessaire. La récente mise en évidence de la fixation au site actif de deux imidazoles (l'un sur l'hème, l'autre au site de fixation du substrat) [18] devrait ouvrir la voie à de nouveaux inhibiteurs bifonctionnels à forte affinité pour les NOS.

Enfin, on peut ajouter que, si l'aspect « inhibition des NOS » n'a pas encore trouvé d'applications cliniques, des maladies liées à une sous-production de NO sont aujourd'hui couramment traitées par NO ou des donneurs de

NO. Ainsi, l'hypertension pulmonaire persistante des nouveau-nés est traitée par inhalation de NO gazeux, et des précurseurs de NO tels que la trinitroglycérine sont utilisés en cardiologie (traitement de l'angine de poitrine par exemple).

## Conclusion

L'état des connaissances sur NO permet de mieux discerner les potentialités liées au contrôle de ce médiateur biologique. L'exploration des NO synthases progresse, avec en particulier les premières structures aux rayons X. L'obtention d'inhibiteurs efficaces et sélectifs des NOS en sera probablement l'une des premières retombées. De tels inhibiteurs représenteraient une avancée thérapeutique pour les maladies causées par une surproduction de NO, maladies qui pourraient inclure l'ischémie cérébrale, le choc septique et les migraines. L'éventail de rôles dans lesquels chacune des NOS est impliquée reste un défi pour la mise au point de médicaments et souligne la nécessité de disposer d'inhibiteurs sélectifs de chacune des NOS pour régler leur activité. A cette condition seulement, il est probable qu'à l'avenir, des traitements impliquant la régulation de la production de NO se multiplieront ■

## Remerciements

Les auteurs ont réalisé leurs travaux de thèse, dont les sujets portaient sur les NO synthases, sous la direction de Daniel Mansuy et Jean-Luc Boucher, au sein de l'Ura 400 du Cnrs (Laboratoire de chimie et biochimie pharmacologiques et toxicologiques, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France). Ils remercient également les arbitres anonymes de *m/s* pour leurs critiques fructueuses.

## RÉFÉRENCES

1. Kerwin JF, Lancaster JR, Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995; 38: 4343-62.
2. Lancaster JR. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8137-41.
3. Packer L. *Methods in enzymology*. London: Academic Press, 1996: 58-259.

4. Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 339-59.

5. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995; 82: 743-52.

6. Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expression control. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1321-32.

7. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases : which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997; 100: 2146-52.

8. Stuehr DJ, Ikeda-Saito M. Spectral characterization of brain and macrophage nitric-oxide synthases – cytochrome-P450-like heme proteins that contain a flavin semiquinone radical. *J Biol Chem* 1992; 267: 20547-50.

9. Renaud JP, Boucher JL, Vadon S, Delaforge M, Mansuy D. Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of N<sup>ω</sup>-hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in NO synthases of a sequence very similar to the heme-binding sequence in P450s. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 53-60.

10. Ghosh DK, Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Domains of macrophage NO synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. *Biochemistry* 1996; 35: 1444-9.

11. Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, Venema VJ. Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem* 1997; 272: 1276-82.

12. Hellermann GR, Solomonson LP. Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 1997; 272: 12030-4.

13. Presta A, Siddhanta U, Wu C, et al. Comparative functioning of dihydro- and tetrahydrobiopterins in supporting electron transfer, catalysis and subunit dimerization in inducible NO synthase. *Biochemistry* 1998; 37: 298-310.

14. Sennequier N, Stuehr DJ. Analysis of substrate-induced electronic, catalytic, and structural changes in inducible NO synthase. *Biochemistry* 1996; 35: 5883-92.

15. Venema RC, Sayegh HS, Kent JD, Harrison DG. Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases. *J Biol Chem* 1996; 271: 6435-40.

16. Klatt P, Pfeiffer S, List BM, et al. Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 1996; 271: 7336-42.

## RÉFÉRENCES

17. Gorren AC, List BM, Schrammel A, *et al.* Tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric oxide synthase: evidence for two identical highly anticooperative pteridine binding sites. *Biochemistry* 1996; 35: 16735-45.
18. Crane BR, Arvai AS, Gachhui R, *et al.* The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* 1997; 278: 425-31.
19. Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, *et al.* Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* 1998; 279: 2121-6.
20. Ortiz de Montellano PR. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. New York: Plenum Press, 1995: 556.
21. Abu-Soud HM, Presta A, Mayer B, Stuehr DJ. Analysis of neuronal NO synthase under single-turnover conditions: conversion of N<sup>ω</sup>-hydroxyarginine to nitric oxide and citrulline. *Biochemistry* 1997; 36: 10811-6.
22. Boucher JL, Genet A, Vadon S, *et al.* Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine by NADPH and O<sub>2</sub> to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 880-6.
23. Sennequier N, Boucher JL, Battioni P, Mansuy D. Superoxide anion efficiently performs the oxidative cleavage of C = NOH bonds of amidoximes and N-hydroxyguanidines with formation of nitrogen oxides. *Tetrahedron Lett* 1995; 36: 6059-62.
24. Mansuy D, Boucher JL, Clement B. On the mechanism of nitric oxide formation upon oxidative cleavage of C = N(OH) bonds by NO-synthases and cytochromes P450. *Biochimie* 1995; 77: 661-7.
25. Thiemermann C. Inhibition des synthèses de monoxyde d'azote dans la défaillance circulatoire: effet bénéfique ou délétère? *Med Sci* 1995; 11: 1643-51.
26. Abu-Soud HM, Yoho LL, Stuehr DJ. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism - activation of intra- and interdomain electron transfer. *J Biol Chem* 1994; 269: 32047-50.
27. Jaffrey SR, Snyder SH. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1996; 274: 774-7.
28. Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 1998; 43: H342-8.
29. Boucher JL, Custot J, Vadon S, *et al.* N-omega-hydroxy-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1614-21.
30. Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, *et al.* Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *J Clin Invest* 1998; 101: 660-6.
31. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997; 100: 2153-7.
32. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-23.
33. Christopherson KS, Bredt DS. Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997; 100: 2424-9.
34. Kendrick KM, Guevara-Guzman R, Zorrilla J, *et al.* Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature* 1997; 388: 670-4.
35. Smalt R, Mitchell FT, Howard RL, Chambers TJ. Induction of NO and prostaglandin E-2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. *Am J Physiol* 1997; 36: E751-8.
36. Endo S, Inada K, Nakae H, *et al.* Nitrite/nitrate oxide (NOx) and cytokine levels in patients with septic shock. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996; 91: 347-56.
37. Mac Micking JD, Nathan C, Hom G, *et al.* Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995; 81: 641-50.
38. Ou J, Carlos TM, Watkins SC, *et al.* Differential effects of nonselective nitric oxide synthase (NOS) and selective inducible NOS inhibition on hepatic necrosis, apoptosis, ICAM-1 expression, and neutrophil accumulation during endotoxemia. *Nitric Oxide Biol Chem* 1997; 1: 404-16.
39. Rosselet A, Feihl F, Markert M, *et al.* Selective iNOS inhibition is superior to norepinephrine in the treatment of rat endotoxic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 162-70.
40. Liaudet L, Rosselet A, Schaller MD, *et al.* Nonselective versus selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental endotoxic shock. *J Infect Dis* 1998; 177: 127-32.
41. Fukuto JM, Chaudhuri G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 165-94.
42. Su Z, Blazing MA, Fan D, George SE. The calmodulin-nitric oxide synthase interaction. Critical role of the calmodulin latch domain in enzyme activation. *J Biol Chem* 1995; 270: 29117-22.
43. Wolff DJ, Gribin BJ. The inhibition of the constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms by indazole agents. *Arch Biochem Biophys* 1994; 311: 300-6.
44. Vadon-Le Goff S, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis in mammals. In: Henry YA, Guissani A, Ducastel B, eds. *Nitric oxide from chemistry to biology: EPR spectroscopy of nitrosylated compounds*. Paris: Landes, 1996: 173-90.
45. Wolff DJ, Lubeskie A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316: 290-301.
46. Garvey EP, Oplinger JA, Tanoury GJ, *et al.* Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Inhibition by non-amino acid isothioureas. *J Biol Chem* 1994; 269: 26669-76.
47. Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, *et al.* 1400W is a slow, tight binding and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 1997; 272: 4959-63.
48. Zhang HQ, Fast W, Marletta MA, Martasek P, Silverman RB. Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine. *J Med Chem* 1997; 40: 3869-70.

## TIRÉS À PART

S. Vadon-Le Goff.

## Summary

### Biosynthesis of NO: mechanism, regulation and control

Nitric oxide (NO), a reactive molecule, is a biological mediator synthesized by the three isoforms of NO synthase (NOS), two of which are constitutive (NOS-1 and NOS-3), and one inducible (NOS-2). These homodimeric heme enzymes catalyze the oxidation of their substrate, L-arginine, in the presence of NADPH, molecular oxygen and tetrahydrobiopterin, into a hydroxylated intermediate, NOHA, and then into citrulline and NO. The heme is probably responsible for both steps of product formation. The C-terminal half of NOS has a sequence homology with cytochrome P450 reductase. In the N-terminal half, where substrate oxidation is carried out, comparison to P450 shows the conservation of several amino-acids surrounding the

cysteine responsible of heme coordination. NOS is therefore an autonomous P450 system. Furthermore, the dimeric structure of NOS-2 is essential for its activity, potentially because it is crucial to the constitution of the active site. Two recent crystal structures of NOS-2 (monomer and dimer) show unique features in NOS structure. Oxidation of NOHA into NO by NOS is an atypical monooxygenation because it requires only a half-equivalent of NADPH. NOS-mediated NOHA oxidation into citrulline and NO might be carried out in a unique mechanism by an iron peroxide resulting from molecular oxygen binding to NOSFe(II). The NOS are regulated in a number of ways, including transcriptionally (especially NOS-2), by calcium/calmodulin binding (for

the constitutive isoforms), by some of their cofactors, and by their substrates and products. At low levels, NO seems involved in the transmission of information, especially in blood pressure regulation, as a vasodilator, and in the nervous system. NO production at higher doses plays a role in immune response, through its cytostatic and cytotoxic properties, but also in several pathologies, including septic shock. As attempted treatments of the latter have shown, the selectivity of NOS inhibition is crucial to its therapeutic efficacy. Beyond action on its characteristics that are shared by other enzymes, which would therefore lack selectivity, selective NOS inhibition could be obtained by competitive substrate binding inhibitors, like S-alkylisothioureas or N<sup>ω</sup>-propylarginine.



Le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC/WHO)

The National Institute of Environmental Health Sciences, USA (NIEHS)

organisent un *Symposium International*

### CELL ADHESION AND COMMUNICATION IN GROWTH CONTROL AND CANCER

Lyon, France

19-21 janvier 1999

#### Orateurs et principaux thèmes :

*The cell adhesion apparatus (W. Franke)*

*The molecular changes in e-cadherin and wnt pathways in cancers*

**(G. Christofori, S. Hirohashi, P. Polakis\*, P. Guilford, F. van Roy)**

*Cell adhesion and signal transduction in growth control*

**(J.C. Barrett, W. Birchmeier, H. Clevers, T. Noda)**

*Gap junctions (N.B. Gilula)*

*Connexins in growth control and cancer (M. Mesnil, K. Willecke, H. Yamasaki)*

*Connexins and growth control mechanisms*

**(V. Krutovskikh, A.F. Lau, W.H. Moolenaar, C. Naus, B. Rousset)**

*Integrin-related signalling pathways in growth control and cancer*

**(F. Giancotti, E. Ruoslahti, J.P. Thiery)**

Renseignements et inscriptions IARC WebSite : [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)

e-mail to : [dechaux@iarc.fr](mailto:dechaux@iarc.fr)

Fax : [33] (0) 472 73 84 42 / Tél. : [33] (0) 472 73 85 39

**DATE LIMITE DE RÉCEPTION DES INSCRIPTIONS ET DES RÉSUMÉS : 10 décembre 1998**