

Exploration clinique et biologique du NO

par Benoit Darblade, Christelle Privat*, Dominique Caillaud, Jacques Rami, Jean-François Arnal

INSERM U397 et Physiologie médicale, CHU Rangueil, 31403 Toulouse.

* Laboratoire Pharmacophores Redox, Phytochimie et Radiobiologie, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse.

Reçu le 25 mai 2000

RÉSUMÉ

En 1980, Furchgott *et al.* démontrent que la relaxation des cellules musculaires lisses artérielles en réponse à l'acétylcholine est dépendante de l'intégrité anatomique de l'endothélium. Ils baptisent le principe à l'origine de cette relation intercellulaire EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor), qui fut identifié 7 ans plus tard comme étant le monoxyde d'azote (NO), un gaz radicalaire. Au niveau des vaisseaux, le NO produit localement est généré par la NO synthase endothéliale et a une action essentiellement paracrine (relaxation des cellules musculaires lisses sous-jacentes, mais aussi l'inhibition de l'agrégation plaquettaire). La demi-vie du NO est brève *in vivo*, et son étude est donc difficile.

On dispose actuellement de techniques invasives et non invasives qui permettent d'explorer les variations de calibre ou de débit artériels. L'observation principes de Furchgott préfigure de façon magistrale toute la physiopathologie de la fonction relaxante de l'endo-

thélium. En effet, de nombreuses affections, et en particulier l'athérosclérose, s'accompagnent d'anomalies de la vasodilatation endothélium-dépendante (« dysfonction endothéliale »). Tandis que l'acétylcholine (ou la sérotonine) injectée dans une artère saine entraîne une vasodilatation, elle provoque en revanche une vasoconstriction dans une artère athéroscléreuse, du fait d'une diminution de la biodisponibilité du NO. Ce déficit de NO pourrait précipiter la maladie coronaire en favorisant, outre le spasme artériel, l'interaction entre les plaquettes et la paroi artérielle et donc la thrombose.

En clinique, le NO ne peut pas être mesuré directement, à l'exception du NO détecté dans l'air exhalé. *In vivo*, le NO est rapidement oxydé en nitrite (NO_2^-) et en nitrate (NO_3^-), l'ensemble étant appelé NOx. Nous détaillons ici les limites de ce dosage comme index biochimique de la production de NO d'origine « endothéliale ».

SUMMARY Clinical and biological investigation of nitric oxide

Furchgott *et al.* demonstrated in 1980 that relaxation of arterial smooth muscle cells in response to acetylcholine is dependent on the integrity of endothelium. They named the factor responsible of this intercellular relationship EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor), which was identified 7 years later as nitric oxide (NO), a free radical gas. In vessels, NO is generated locally by the endothelial NO synthase and its effect is mainly paracrine (relaxation of the underlying smooth muscle cells, and inhibition of platelet aggregation). The *in vivo* half-life of NO is short, and the assessment of its production is thus difficult.

Invasive and non invasive techniques are now available to explore the variations of arterial diameter or flow. Furchgott's pioneering work anticipated the whole pathophysiology of endothelial-dependent

relaxation. Indeed, numerous diseases, in particular atherosclerosis, are accompanied by abnormalities of endothelial-dependent vasodilation (« endothelial dysfunction »). Whereas acetylcholine (or serotonin) infused in a normal artery elicits a vasodilation, in contrast, it promotes a vasoconstriction in an atherosclerotic artery, as a consequence of a decrease in NO bioavailability. This defect in NO favors arterial spasm, interaction between platelets and arterial wall and thrombosis, and thus probably cardiovascular events.

NO cannot be measured directly in humans, except in exhaled NO. *In vivo*, NO is rapidly oxidized in nitrite (NO_2^-) and in nitrate (NO_3^-), the summation being NOx. We shall detail the limitations of this measurement as a biochemical index of NO production from « endothelial » origin.

L'intérêt suscité par le monoxyde d'azote (NO) en biologie ne cesse de grandir, comme en témoignent les 3 000 à 4 000 publications consacrées à ce sujet chaque année depuis 1993. Cet intérêt pour le NO reflète

l'importance de son rôle dans des processus comme la vasodilatation, la plasticité neuronale et les défenses immunitaires. Le NO est le premier gaz reconnu comme messenger. Le NO est synthétisé à partir d'un atome

d'azote du radical guanidinium de l'acide aminé L-arginine et d'une molécule d'oxygène. Il va, entre autres, activer la guanylate-cyclase soluble des cellules dans un rayon d'une centaine de micromètres. Le GMP cyclique, formé à partir du GTP, est ainsi le principal second messager intra-cellulaire du NO. La demi-vie brève du NO ainsi que sa très grande diffusibilité à travers les membranes cellulaires permettent la régulation d'effets transitoires et labiles [10, 15, 19].

Il est intéressant de rappeler la chronologie de la découverte de cette nouvelle voie de transmission d'un signal. On peut considérer que la découverte de la production du NO par les cellules de mammifères s'échelonne sur une décennie avec 3 dates clés. En 1977, le groupe de Murad [6] démontre que le NO active la guanylate cyclase soluble et augmente donc le taux de GMPc dans différents tissus. Ce même groupe montre, à la même période, que l'activation de la guanylate cyclase s'accompagne d'une relaxation du muscle lisse. Cependant, personne ne suspecte à cette date que le NO puisse être synthétisé par des cellules de mammifère, en raison de la labilité et de la toxicité de cette espèce radicalaire gazeuse. En 1980, Furchgott et Zawadski [11], démontrent que la relaxation des cellules musculaires lisses artérielles en réponse à l'acétylcholine est dépendante de l'intégrité anatomique de l'endothélium. Ils baptisent le principe à l'origine de cette relation inter-cellulaire EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor). En 1987, le groupe de Moncada [20], et celui d'Ignarro [14], identifient l'EDRF comme étant le NO.

Plusieurs autres groupes (Hibbs, Marletta, Stuehr, Nathan) ont notablement contribué à la description de la voie de la L-Arginine-NO, montrant que les macrophages produisaient des quantités importantes de nitrites et de nitrates, produits stables de la dégradation du NO. Ils ont montré que l'arginine était un acide aminé indispensable à la cytotoxicité non spécifique du macrophage. Enfin, la N^G monométhyl L-arginine (L-NMMA) a été utilisée pour inhiber la cytotoxicité des macrophages activés avant même la découverte du NO dans ce processus et avant la caractérisation des NO synthases [12].

Dans l'organisme, le NO est ainsi généré en permanence par une famille multigénique d'enzymes, les NO-synthases dites « constitutives », car exprimées en permanence dans l'endothélium et certains types de neurones. Le macrophage, en réponse à des cytokines, se met à exprimer une troisième isoforme qui est alors dite « inducible » [21]. Le NO ainsi formé peut entraîner localement la relaxation des cellules musculaires lisses, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, une modulation de la transmission neuronale, ou encore une inhibition de la prolifération de cellules environnantes (cancéreuses par exemple) ou des virus, bactéries ou parasites. Il apparaît qu'une augmentation de la génération de NO est responsable de l'hypotension du choc septique, des lésions tissulaires induites par la réponse inflammatoire, de la mutagenèse ou encore de la formation de N-nitrosamines carcinogéniques [19].

Dans la suite de cet article, nous nous intéresserons principalement à la synthèse endothéliale de NO et à l'évaluation de sa production *in vitro* et en clinique.

EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE LA PRODUCTION ENDOTHÉLIALE DE NO [3]

L'endothélium macrovasculaire joue un rôle majeur dans la physiologie vasculaire du fait de sa situation anatomique (interface entre le sang circulant et la paroi vasculaire). Il joue tout d'abord un rôle de filtre sélectif entre le sang et les cellules musculaires lisses sous-jacentes de la média. Il intervient ensuite dans le contrôle des processus de coagulation (en prévenant en particulier celle-ci en l'absence de lésion vasculaire). Le NO et les dérivés de l'acide arachidonique (au premier rang desquels se situe la prostacycline) provoquent localement la relaxation des cellules musculaires lisses et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire [10, 19]. Leur action est locale et leur demi-vie est brève (quelques secondes). L'importance respective du NO et de la prostacycline varie selon les espèces, les territoires vasculaires et les stimuli physiologiques ou pharmacologiques utilisés. On peut ainsi considérer que le NO est un « dérivé nitré endogène » généré localement par l'endothélium et ayant une action essentiellement paracrine (relaxation des cellules musculaires lisses sous-jacentes, mais aussi l'inhibition de l'agrégation plaquettaire).

En 1980, Furchgott et Zawadski démontrent que la relaxation des cellules musculaires lisses artérielles en réponse à l'acétylcholine est dépendante de l'intégrité anatomique de l'endothélium. De nombreuses substances comme l'acétylcholine, mais aussi la bradykinine, l'histamine, la thrombine, la sérotonine et l'ATP (substances libérées au cours de l'agrégation plaquettaire) exercent leur effet vasodilatateur en stimulant la production endothéliale de NO. En revanche, en l'absence d'endothélium, ces mêmes agonistes provoquent la contraction des cellules musculaires lisses. Cette dualité d'action (vasorelaxation ou vasoconstriction) en fonction de l'état anatomique (présence ou absence) de l'endothélium existe chez tous les mammifères et semble être apparue chez les Amphibiens. Toute blessure artérielle s'accompagne d'une lésion de l'endothélium et de l'activation des processus d'hémostase. Les facteurs de la coagulation comme la thrombine et les facteurs libérés au cours de l'agrégation plaquettaire (sérotonine et ATP) provoquent une contraction des cellules musculaires lisses qui n'est pas contrecarrée par la production de NO du fait de la lésion endothéliale. Cette propriété physiologique de l'endothélium pourrait avoir conféré au vaisseau un avantage décisif dans les processus d'hémostase, la suppression du NO favorisant le spasme artériel ainsi que l'agrégation plaquettaire.

Les contraintes mécaniques (forces de cisaillement) engendrées par le flux sanguin influencent la morphologie des cellules endothéliales (allongement dans le sens

du flux), mais aussi un certain nombre de fonctions de ces cellules, comme la libération de NO et de prostacycline. Lorsque l'activité métabolique d'un tissu augmente, les modifications métaboliques locales (diminution de la pO_2 , augmentation de la pCO_2 , diminution du pH, ...) entraînent un relâchement des sphincters précapillaires, ce qui permet l'augmentation du débit sanguin dans les capillaires. L'augmentation du débit sanguin se produit également au niveau des artérioles et des artères d'amont. Cette augmentation du débit s'accompagne d'une augmentation des contraintes de cisaillement de la paroi vasculaire, plus exactement au niveau de l'endothélium, à l'origine d'une augmentation de la production endothéliale de NO, mais aussi de prostacycline. Ces facteurs générés localement produisent une relaxation des cellules musculaires lisses sous-jacentes. La vasodilatation ainsi produite en réponse à l'augmentation de débit est qualifiée de vasodilatation débit-dépendante ou encore flux-dépendante. Elle survient à tous les niveaux de l'arbre vasculaire (artères et veines) et permet à chaque vaisseau d'adapter précisément son calibre aux variations de débit local. Bien que le degré de vasodilatation ne parvienne pas à normaliser les contraintes de cisaillement, l'augmentation de calibre artériel contribue à diminuer les forces de cisaillement. Au-delà de ce rôle régulateur aigu de la dynamique vasculaire, le phénomène de débit-dépendance modifie aussi certaines fonctions des cellules endothéliales. Ainsi, la pratique d'exercices physiques répétés augmente l'expression de la NO synthase endothéliale et donc la capacité à produire de l'EDRF/NO, ce qui contribue probablement à accroître la capacité à l'exercice physique du fait d'un meilleur apport sanguin aux muscles squelettiques.

EXPLORATION « BIOCHIMIQUE » DE LA PRODUCTION DE NO

À l'évidence, la brièveté de la demi-vie du NO dans les milieux biologiques ainsi que sa production extrêmement localisée (une centaine de micromètres) rendent son étude extrêmement difficile. Nous envisagerons d'abord les outils dont nous disposons à l'heure actuelle pour explorer la production du NO dans des systèmes *in vitro* puis ceux utilisables en clinique.

L'électrochimie offre plusieurs possibilités de détection du NO (par oxydation ou réduction) avec des limites de détection variables pour chaque méthode ou chaque électrode utilisée. Actuellement, les ultramicroélectrodes (électrodes de dimensions micrométriques au niveau de la partie active) sont les biocapteurs les plus utilisés. Elles permettent l'utilisation de techniques ampérométriques particulières comme l'ampérométrie différentielle à double impulsion d'amplitude constante. L'étalonnage de ces biocapteurs est réalisé avec des solutions de NO, de S-nitroso-N-acétyl-pénicillamine ou des solutions de nitrites réduites en milieu acide. Chaque électrode doit être étalonnée. Dans le but de rendre plus spécifique la

détection électrochimique de NO, des membranes imperméables aux ions et aux grosses molécules susceptibles de s'oxyder dans les mêmes conditions que NO sont ajoutées à la surface de ces électrodes [13, 18].

La détection repose, le plus souvent, sur la mesure de l'intensité du courant induit par l'oxydation de NO à la surface d'une électrode selon la réaction : $NO \rightarrow NO^+ + e^-$. Cette oxydation se réalise à un potentiel fixe qui diffère selon le type d'électrodes employées. L'intensité du courant (qui dépend du nombre d'électrons générés) est proportionnelle à la concentration de NO.

L'utilisation de biocapteurs de petite dimension offre comme avantage un temps de réponse court qui permet de suivre en temps réel une production de NO sans perturber le métabolisme cellulaire. Seule une concentration locale, dans laquelle le NO métabolisé (nitrites, nitrates, peroxynitrites...) n'est pas pris en compte, est évaluée. De plus, l'emploi de techniques ampérométriques impulsométriques rend la mesure de NO plus sensible (limite de détection de l'ordre du nanomolaire) et plus spécifique. Ces méthodes impulsométriques permettent, en effet, de s'affranchir de l'interférence de composés susceptibles de s'oxyder à des potentiels inférieurs au potentiel de mesure à l'inverse des méthodes ampérométriques classiques. En outre, les méthodes de mesure électrochimique sont directes, non destructives et spécifiques vis-à-vis de NO par rapport à l'anion superoxyde et à l'anion peroxynitrite [22, 23].

Il est ainsi possible de mesurer une production cellulaire de NO. Cependant, cette méthode ne permet pas d'accéder à une production basale de NO puisqu'il n'est possible de suivre que des variations de concentration de NO. Ceci limite son application à l'étude des activités des NO-synthases constitutives (NOS I ou NOS III). Par ailleurs, la technique impose un étalonnage interne pour chaque mesure et un contrôle strict de la position de l'électrode par rapport aux cellules (à l'aide d'un microscope à optique inversée). La quantité de NO détectée est en effet fonction du gradient de diffusion de NO : la microélectrode doit donc être placée à une distance quasi-constante des cellules. Dans le cas d'études pharmacologiques de la régulation de la synthèse de NO, il faut être très vigilant quant aux signaux (interférences ou artefacts) que peuvent induire certains composés à l'électrode.

Le NO produit dans le surnageant de cellules en culture peut aussi être évalué grâce à l'utilisation de cellules « reporter » [16]. Cette technique d'évaluation fait appel à des cellules RFL6 très riches en guanylate cyclase soluble. Le transfert rapide du surnageant des cellules productrices de NO provoque l'activation de la guanylate cyclase soluble et la génération du GMPc, qui peut être quantifié par un dosage radioimmunologique.

Nous avons exploré grâce à ce système l'effet des œstrogènes sur la production endothéliale de NO. En effet, la potentialisation de la relaxation endothéliale-dépendante et l'augmentation de l'expression de la NO synthase endothéliale sous l'effet de l'oestradiol ont été rapportées au niveau de l'artère utérine [24]. Pour notre part, nous n'avons pas observé de variations de l'ARNm,

de la protéine ou de l'activité de la NO synthase endothéliale dans un modèle de cellules endothéliales d'aorte de bœuf en culture sous l'effet de l'œstradiol. En revanche, l'œstradiol augmente la biodisponibilité du NO dans le milieu de culture, secondaire à une moindre génération d'anion superoxyde [2]. L'ensemble de ces résultats montre que l'œstradiol a un effet antioxydant sur l'endothélium en culture. Cet effet est médié par un récepteur ($EC_{50} < 1$ nM) et il est aboli par un anti-œstrogène. Il n'apparaît qu'après 24 heures d'incubation et il concourt à diminuer la dégradation du NO. Au total, l'augmentation de la relaxation endothélium-dépendante en réponse aux œstrogènes pourrait être due, en fonction des espèces et du lit vasculaire, à une augmentation de la production de NO et/ou à sa moindre dégradation par l'anion superoxyde.

En clinique, en raison de son instabilité, le NO ne peut pas être mesuré directement, à l'exception du NO détecté dans l'air exhalé. *In vivo*, le NO est rapidement oxydé en nitrite (NO_2^-) et en nitrate (NO_3^-), l'ensemble étant appelé NOx. Les études chez l'Homme utilisant des traceurs (N^{15} L-arginine) ont démontré qu'environ 50 % des NOx totaux de l'organisme proviennent de la synthèse de NO à partir de l'arginine. Ainsi, de nombreux travaux de recherche clinique utilisent actuellement les taux de NOx dans les liquides biologiques et en déduisent un index de NO endogène d'origine « endothéliale ». Jusqu'à quel point cette extrapolation est-elle licite, c'est ce que nous allons discuter (références dans la revue [7]).

Métabolisme du NO *in vivo* : (Fig. 1)

Ce NO a une demi-vie courte de quelques secondes dans les systèmes biologiques. Dans des cellules en culture, le NO est rapidement dégradé en nitrites, mais la présence de fer hémique et de certains autres métaux de transition provoque la conversion des nitrites en produits plus stables, les nitrates. Ainsi, *in vivo*, les nitrites sont instables et la principale forme de NOx retrouvée

sont les nitrates. Cependant, le métabolisme du NO endogène est, de façon surprenante, assez mal compris. De nombreux métabolites intermédiaires (en particulier des thiols de haut et de bas poids moléculaire) existent probablement, dont certains en quantités suffisantes pour exercer des effets biologiques. De plus, le NO réagit avec une autre espèce radicalaire, l'anion superoxyde, pour former le peroxynitrite [8]. Le peroxynitrite est considéré comme une espèce réactive toxique conduisant à la nitration de résidus tyrosine sur les protéines, et pouvant aussi se décomposer en nitrate. L'importance de la génération de peroxynitrite *in vivo* en physiologie comme en physiopathologie demeure inconnue. Toutefois, la plupart des métabolites intermédiaires conduisent à la génération de nitrates qui sont stables, la mesure des nitrates paraît une mesure de choix sensible, seule ou associée à la mesure de nitrite comme reflet des NOx. Cependant, on doit toujours garder présent à l'esprit que les nitrates représentent un métabolite inactif du NO. Ainsi, si la demi-vie du NO est diminuée (en particulier par augmentation de sa dégradation par l'anion superoxyde, comme par exemple sous l'effet de stress oxydants), ou augmentée (comme par exemple sous l'effet des œstrogènes), la biodisponibilité du NO et donc ses effets biologiques varieront, tandis que la mesure de la concentration du NOx demeurera constante. Ainsi, les nitrates, les nitrites et les NOx ne reflètent en rien la biodisponibilité du NO *in vivo*, et ceci constitue l'une des limites principales de cette approche.

Origine et excrétion des nitrates endogènes

Comme le montre la figure 2, les NOx de l'organisme proviennent de nombreuses sources : alimentation, inhalation de NO présent dans l'air en cas de pollution (source mineure) ou synthèse endogène de NO. L'alimentation amène essentiellement des nitrates présents dans les légumes verts et des nitrites comme conservateur de certains aliments. Ainsi, l'absorption de NOx est très variable entre individus mais aussi chez un même

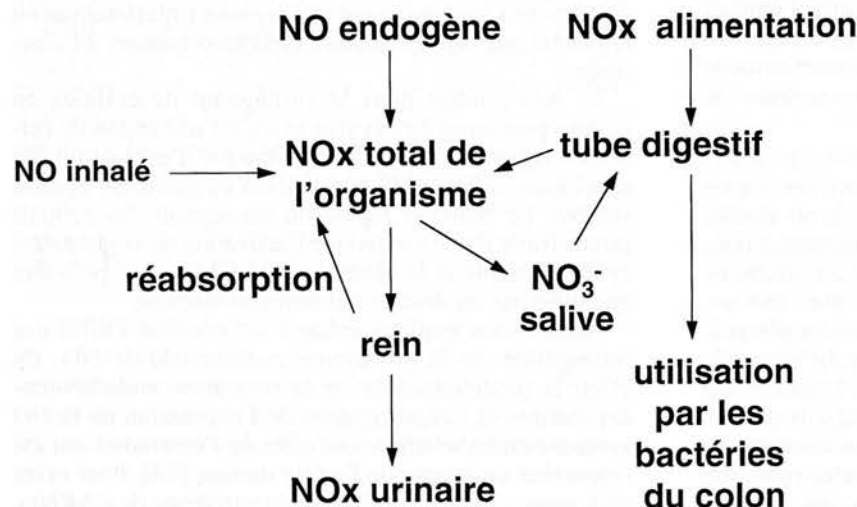
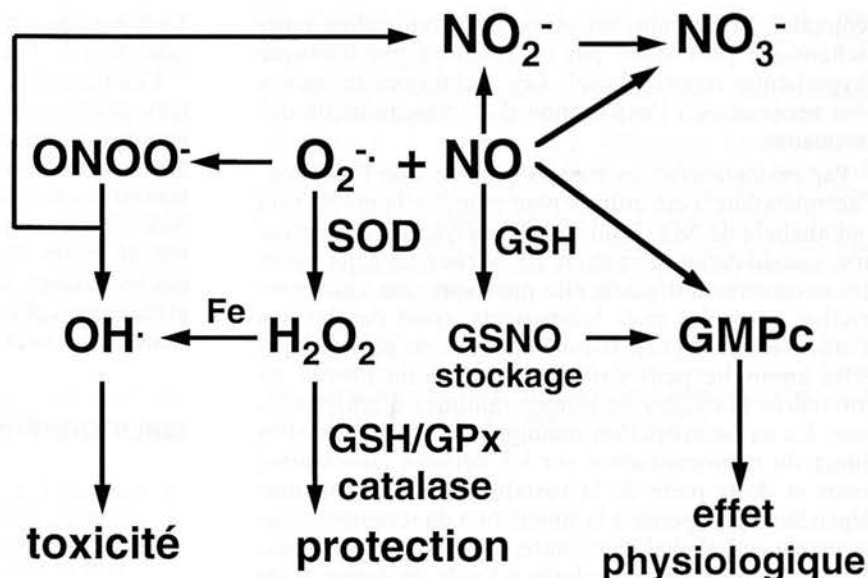


FIG 1. — Schéma des différentes sources de nitrites et nitrates de l'organisme, ainsi que de leur élimination.

FIG 2. — Toutes les cellules de l'organisme produisent des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), qui sont l'une des principales espèces réactives de l'oxygène. Pour se défendre contre ce stress oxydant permanent, toutes les cellules de l'organisme expriment une famille d'enzymes, les superoxydes dismutases (SOD), qui catalysent la dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui constitue une deuxième espèce réactive de l'oxygène. H_2O_2 est lui-même normalement inactivé par la catalase ou le système glutathion-glutathion peroxydase (GSH/GPx). En présence de fer (Fe^{++}), H_2O_2 génère le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), qui est l'espèce réactive de l'oxygène la plus toxique. NO exerce son effet physiologique en se fixant à un certain nombre de cibles moléculaires, dont la mieux caractérisée est probablement la guanylate cyclase soluble, dont l'activation génère du guanosine monophosphate cyclique (GMPc). NO peut se lier transitoirement au glutathion (GSH), forme de stockage qui, de plus, prévient la dégradation de NO. En l'absence d'inactivation de $O_2^{\cdot-}$ par les SOD, $O_2^{\cdot-}$ et NO interagissent rapidement l'un avec l'autre pour donner du peroxynitrite ($ONOO^-$) qui peut se décomposer à son tour et générer le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$). Il peut résulter de l'interaction entre $O_2^{\cdot-}$ et NO d'une part une diminution de la demi-vie du NO, et d'autre part la génération d' $ONOO^-$ et d' $OH^{\cdot}$ (et les phénomènes de cytotoxicité qui en découlent).



individu au cours du temps. Une partie des NOx ingérés peuvent d'ailleurs être dégradés par les bactéries intestinales au niveau du colon. Il se produit également une sécrétion salivaire de nitrates, qui sont activement sécrétés dans la salive (qui peut contenir jusqu'à une concentration de 1 mmole/l). Qu'en est-il de l'excrétion urinaire de NOx ? Une partie des NOx filtrés par le rein sont réabsorbés et donc l'excrétion urinaire de NOx tend à sous-estimer la quantité de NOx de l'organisme.

Existe-t-il d'autres facteurs confondants ? L'exercice physique, comme nous l'avons mentionné, est associé à une augmentation de la production de NO. L'activité physique doit donc être contrôlée. Un certain nombre de substances interfère aussi avec les méthodes chimiques communément utilisées pour mesurer les NOx dans les milieux biologiques, notamment les phosphates, les citrates, un pH acide et la vitamine C.

Mesure des nitrites et des nitrates urinaires

Plusieurs études récentes ont suggéré que les NOx plasmatiques reflètent la synthèse de NOx systémique tandis que l'excrétion de NOx urinaire reflète la synthèse de NO rénal. Cela n'est probablement pas correct. En effet, le NO généré au niveau du tube proximal contribue au NOx plasmatique, mais il y a surtout une réabsorption substantielle des NOx au niveau tubulaire. Il est de plus nécessaire de mesurer l'excrétion urinaire de NOx sur 24 heures. Au total, la mesure des nitrates ou des NOx dans le plasma ou dans les urines sur 24 heures peut être un indice de la génération de NO mais son interprétation doit être faite avec toutes les pré-

cautions que nous venons de mentionner. Il est indispensable de contrôler l'apport alimentaire de NOx, et la mesure de NOx dans le sang et dans les urines ne doit être effectuée que 24 à 48 heures après un régime pauvre en NOx. Cependant, il est frappant de constater, à la lecture de la méthodologie décrite dans de nombreuses publications, que cette précaution est rarement prise, et de nombreux résultats sont probablement de ce fait sujets à caution. Incontestablement, le traceur N^{15} L-arginine fournit l'évaluation la plus précise de la génération de NOx à partir de la voie NO arginine. Ce type d'étude est cependant coûteux et lourd à mettre en œuvre.

Enfin, le GMP cyclique est un des principaux second messager du NO. Il peut être mesuré dans le plasma ou les urines, et pourrait théoriquement constituer un indice de la génération de NO. Cependant, il est principalement le reflet de l'effet du facteur atrial natriurétique circulant sur l'endothélium, car le récepteur de ce facteur est la guanylate-cyclase particulaire [5]. Le GMPc plasmatique ou urinaire ne reflète donc pas la production de NO [4].

ÉVALUATION DE LA GÉNÉRATION DE NO PAR L'ÉTUDE DE LA VASOMOTRICITÉ

Reste donc l'évaluation indirecte des effets de la production du NO. On dispose actuellement de techniques invasives et non invasives. Les techniques non invasives permettent d'explorer les variations de calibre (échographie à haute résolution ou « échotracking ») ou de débit (Doppler) des artères des membres (humérale, radiale,

fémorale). Le stimulus utilisé est la vasodilatation post-ischémique provoquée par un brassard pneumatique (hyperhémie réactionnelle). Les techniques invasives sont nécessaires à l'exploration de la vasomotricité des coronaires.

Par analogie avec les travaux pionniers de Furchgott, l'acétylcholine a été utilisée pour stimuler la production endothéliale de NO. Tandis que l'acétylcholine entraîne une vasodilatation d'environ 10 % chez un sujet ayant des coronaires normales, elle provoque une vasoconstriction coronaire chez les patients ayant des lésions d'athérosclérose [17]. Il est important de préciser que cette anomalie peut s'observer même au niveau de coronaires porteuses de lésions minimales d'athérosclérose. La vasoconstriction témoigne à la fois d'un effet direct du neuromédiateur sur les cellules musculaires lisses et de la perte de la vasodilatation endothélium-dépendante en réponse à la stimulation du récepteur muscarinique endothélial. Par contre, la vasodilatation endothélium-indépendante, explorée à l'aide de donneurs de NO (nitroglycérine, SIN-1, nitroprussiate de sodium), est en général conservée quel que soit l'état des coronaires.

Enfin, la perfusion intra-artérielle d'un antagoniste de l'arginine ou d'un inhibiteur de cyclo-oxygénase a permis de déterminer la responsabilité respective du NO et de la prostacycline dans le processus de vasodilatation. Chez l'Homme sain, l'administration intra-artérielle de L-NMMA entraîne une diminution locale de débit en rapport avec une augmentation des résistances artérielles locales, tandis que les inhibiteurs de cyclo-oxygénase sont sans effet.

Signification physiopathologique de la dysfonction endothéliale

Une diminution de la biodisponibilité du NO pourrait précipiter la maladie coronaire en favorisant l'interaction entre les plaquettes et la paroi artérielle ainsi que le spasme artériel. Cependant, l'effet du NO sur les métalloprotéases, dont le rôle semble important dans l'évolution d'une plaque stable vers une plaque instable, n'a pas été vraiment clarifié *in vivo*, du fait de la complexité de la biologie du NO et des métalloprotéases. De plus, on ne dispose pas à l'heure actuelle de modèles expérimentaux permettant de tester directement l'implication du NO dans la stabilité des plaques.

D'un point de vue pragmatique, la dysfonction endothéliale peut-elle constituer un « end-point » dans un essai thérapeutique ? Un traitement hypocholestérolémiant seul (inhibiteur de l'HMGCoA-réductase) et son association à un antioxydant (inhibiteur de l'HMGCoA-réductase + probucol) entraîne une amélioration de la vasomotricité coronaire endothélium-dépendante [1]. De la même façon, le traitement substitutif par les œstrogènes en période post-ménopausique entraîne une amélioration de la vasomotricité endothélium-dépendante. Une amélioration de la vasomotricité endothélium-dépendante a aussi été décrite après traitement par une

forte dose de vitamine C ou d'arginine, ou encore après inhibition de l'enzyme de conversion (réf dans [9]).

Ces travaux à visée physiopathologique (expérimentaux ou cliniques) ne pourront certes jamais remplacer de grands essais prospectifs de morbi-mortalité. Cependant, étant donné le coût et le temps nécessaires à la réalisation de ces derniers, l'évaluation de la fonction endothéliale dans le cadre de la pathologie athéromateuse constitue, au moins dans l'état actuel de nos connaissances et des techniques d'étude disponibles, l'un des principaux mécanismes physiopathologiques touchant la paroi artérielle que l'on puisse étudier en clinique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anderson T. I., Meredith A., Yeung B., Frei A., Selwyn and Ganz P., The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332, 488-493.
2. Arnal J. F. S., Clamens C., Pechet A., Nègre-Salvayre C., Allera J. P., Girolami R., Salvayre and Bayard F., Ethinyl-estradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine aortic endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, 93, 4108-4113.
3. Arnal J. F. A., Dinh-Xuan B., Darblade B., Pueyo and Rami J., Endothelial NO synthase in physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci.*, 1999, 55, 1078-1087.
4. Arnal J. F., Amrani A. I. El and Michel J. B., Atrial natriuretic factor influences *in vivo* plasma, lung and aortic wall cGMP concentrations differently. *Eur. J. Pharmacol.*, 1993, 237, 265-273.
5. Arnal J. F., Warin L. and Michel J. B., Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.*, 1992, 90, 647-652.
6. Arnold W. P., Mittal C. K., Katsuki S. and Murad F., Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, 74, 3203-3207.
7. Baylis C. and Vallance P., Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine – what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr. Op. Nephrol. Hypertens.*, 1998, 7, 59-62.
8. Beckman J. S. and Koppenol W. H., Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrate : the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 1996, 271, C1424-C1437.
9. Celermajer D., Endothelial dysfunction : Does it matter ? Is it reversible? *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1997, 30, 325-333.
10. Furchgott R. F. and Vanhoutte P. M., Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J.*, 1989, 3, 2007-2018.
11. Furchgott R. F. and Zawadzki J. V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond)*, 1980, 228, 373-376.
12. Hibbs J. B., Taintor R. and Vavrin Z., Macrophage cytotoxicity : role for arginine deiminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 1987, 235, 473-476.
13. Ichimori K., Ishida H., Kukahori M., Nakazawa H. and Murakami E., Practical nitric oxide measurement employing a nitric oxide-selective electrode. *Rev. Science Instrument.*, 1994, 65, 2714-2718.
14. Ignarro L., Buga G., Wood K., Byrns R. and Chanduri G., Endothelial derived relaxing factor produced and released

- from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, 84, 9265-9269.
15. Ignarro L. J., Endothelium-derived nitric oxide : actions and properties. *FASEB J.*, 1989, 3, 31-36.
 16. Ishii K., Sheng H., Warner T. D., Forstermann U. and Murad F., A simple and sensitive bioassay method for detection of EDRF with RFL-6 rat lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 30)*, 1991, 261, H598-603.
 17. Ludmer P. L., Selwyn A. P., Shook T. L., Wayne R. R., Mudge G. H., Alexander R. W. and Ganz P., Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.*, 1986, 315, 1046-1051.
 18. Malinski T. and Taha Z., Nitric oxide release from a single cell measured *in situ* by a porphyrinic - based microsensor. *Nature*, 1992, 358, 676-678.
 19. Moncada S. and Higgs A., The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 1993, 329, 2002-2012.
 20. Moncada S. and Higgs E. A., Endogenous nitric oxide : physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1991, 21, 361-374.
 21. Nathan C., Inducible nitric oxide synthase : what difference does it make? *J. Clin. Invest.*, 1997, 100, 2417-2423.
 22. Privat C. F., Lantoin B. F., Millanvoye Van Brussel E., Devynck J. and Devynck M.-A., Life Sciences. Nitric oxide production by endothelial cells : comparison of three methods of quantification. 1997, 61, 1193-1202.
 23. Privat C., Trévin S., Bedioui F. and Devynck J., Direct electrochemical characterization of superoxide anion and its reactivity toward nitric oxide in solution. *J. Electroanal. Chem.*, 1997, 436, 261-265.
 24. Weiner C. P., Lizasoain I., Baylis S. A., Knowles R. G., Charles I. G. and Moncada S., Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994, 91, 5212-5216.