

**INRS-Santé**

**ÉTUDE BIOCHIMIQUE DE LA  
NO SYNTHASE NEURONALE DE CHAT ET DE RAT**

**Par  
Jean-François Côté**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences expérimentales de la santé**

**Janvier 1996**

**©droits réservés de Jean-François Côté 1996**

## RÉSUMÉ

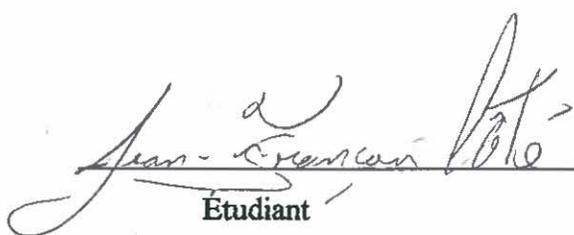
Des cellules et des tissus tels que les cellules endothéliales, les neutrophiles, les neurones et les surrénales ont la capacité d'oxyder la L-arginine en engendrant la formation d'oxyde nitrique (NO) et de citrulline, comme produits. Une telle conversion est générée par la NO synthase (NOS), une enzyme cytoplasmique. Le NO ainsi produit est un messenger cellulaire agissant comme activateur de la guanylyl cyclase.

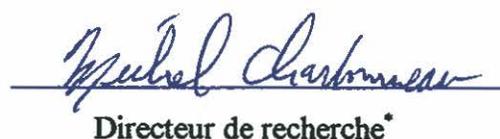
L'objectif des présents travaux est d'étudier biochimiquement la NOS neuronale de chat en s'attardant à : 1) l'effet des cofacteurs (calcium, calmoduline, FAD et tétrahydrobioptérine) sur l'activité enzymatique, 2) la détermination des paramètres cinétiques pour le substrat arginine et 3) la détermination de la constante d'inhibition d'inhibiteurs de la NOS. Un autre objectif est d'étudier la distribution régionale de l'activité spécifique de la NOS dans onze structures neuroanatomiques du cerveau de chat. Les mêmes études seront effectuées dans le cerveau de rat avec le but de faire un comparaison interespèces de la même enzyme. Un dernier objectif est de faire une caractérisation préliminaire du fonctionnement de la NOS des glandes surrénales et du foie. L'activité de la NOS est déterminée en mesurant la formation de [<sup>3</sup>H]-citrulline à partir de [<sup>3</sup>H]-arginine dans un milieu d'incubation contenant une NOS semi-purifiée.

Les travaux montrent que dans le cerveau de chat ainsi que dans celui de rat, l'activité de la NOS neuronale est : 1) dépendante de la présence de NADPH, 2) dépendante du tandem calcium/calmoduline, 3) significativement activée par un ajout de FAD et de tétrahydrobioptérine (chez le chat, le  $V_{max}$  passe de 59.4 à 118 pmol de citrulline/mg prot/min

et chez le rat il passe de 149 à 185 pmol de citrulline/mg prot/min), 4) présente à différents niveaux dans les onze structures du cerveau de chat et les cinq structures du cerveau de rat étudiées montrant que la NOS est largement distribuée dans le système nerveux de ces deux espèces. De plus, le  $K_m$  pour l'arginine chez le chat est de 11  $\mu\text{M}$  en présence de FAD et de tétrahydrobioptérine et de 41  $\mu\text{M}$  lorsque ces cofacteurs ne sont pas ajoutés. Ces résultats montrent qu'en présence de FAD et de tétrahydrobioptérine dans le milieu d'incubation, les interactions enzyme-substrat sont stabilisées. Des résultats allant dans la même direction ont été obtenus chez le rat (un  $K_m$  de 4.8  $\mu\text{M}$  en présence de FAD et tétrahydrobioptérine et de 19.3  $\mu\text{M}$  lorsque les cofacteurs ne sont pas ajoutés).

Les présents travaux montrent aussi que l'activité de la NOS des surrénales est : dépendante du tandem calcium/calmoduline, dépendante de la présence de NADPH, activée par la présence de FAD et de tétrahydrobioptérine et réduite par des inhibiteurs compétitifs de la NOS. La cinétique de l'enzyme face à l'arginine a révélé un  $V_{\max}$  de 84 pmol de citrulline formée/mg prot/min et un  $K_m$  de 28  $\mu\text{M}$ . Ces résultats montrent des propriétés de la NOS surrénalienne très similaires à la NOS neuronale. Finalement, le foie de rat ne démontre aucune activité constitutive de NOS.

  
Étudiant

  
Directeur de recherche\*

\* Le Dr. Charbonneau a agi à titre de co-directeur du 03/05/94 au 31/08/95, période durant laquelle le Dr. Andrée G.Roberge agissait à titre de directrice de recherche.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier très sincèrement Michel Charbonneau, mon directeur de recherche, qui a passé du temps de grande qualité à mes côtés durant mes études à l'INRS et sans qui la rédaction de ce mémoire aurait été beaucoup plus difficile. Sa rigueur et son intégrité scientifique ainsi que ses qualités de pédagogue sont des valeurs auxquelles il m'a initié et qui me suivront tout au long de ma carrière de scientifique.

Je voudrais aussi remercier très affectueusement Martine pour les encouragements et l'amour qu'elle m'a donnés durant cette période importante de ma carrière, ce fut une très grande source de motivation. Son support dans les moments moins faciles a été très généreux et je l'apprécie.

Je tiens aussi à adresser des remerciements spéciaux à Pauline, et Fernand, ainsi qu'à Annie pour m'avoir supporté dans mon projet de maîtrise. Les mots d'encouragements et la fierté qu'ils ont montrée à mon égard furent une source de motivation.

Je suis aussi reconnaissant à Richard, et à Joanne, pour leurs nombreux encouragements ainsi que pour le soutien financier que Richard m'a généreusement donné et qui a significativement facilité mes études.

Je remercie également mes collègues de laboratoire, Isabelle et Ninon, avec qui j'ai travaillé, me suis amusé et traversé des moments inoubliables. Également je remercie Guylaine et Helga pour leur bonne humeur constante ainsi que les réponses qu'elles ont su apporter à mes questions. Je m'en voudrais aussi de ne pas remercier mes amis, des vrais, Richard et Martin, qui m'ont encouragé et supporté durant mes études graduées (en réalité, depuis le 4<sup>ème</sup> secondaire!).

## **AVANT-PROPOS**

Les résultats obtenus sur l'étude biochimique de la NOS du cerveau de chat ont été acceptés pour publication dans le journal "Free radical biology & medicine" en décembre 1995.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	ii
REMERCIEMENTS .....	iv
AVANT-PROPOS .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES FIGURES .....	x
LISTE DES TABLEAUX .....	xii
ABRÉVIATIONS .....	xiii
INTRODUCTION .....	1
<b>CHAPITRE 1 : RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE ET DÉFINITION DES OBJECTIFS .....</b>	<b>3</b>
1.1 Historique .....	3
1.2 Nomenclature des NOS .....	5
1.3 Réaction générale catalysée par la NOS .....	6
1.4 L'arginine comme substrat de la NOS .....	8
1.5 Le couple calcium/calmoduline .....	9
1.6 La tétrahydrobioptérine .....	14
1.7 Le NADPH, les flavines, l'hème et l'homologie avec la cytochrome P-450 réductase .....	18
1.8 Inhibiteur de la NOS .....	20
1.9 Distribution tissulaire et cellulaire de la NOS .....	23
1.10 Les fonctions physiologiques du NO .....	25
1.10.1 Les cibles moléculaires du NO .....	25
1.10.2 Le NO dans le cerveau .....	26

1.10.3 La NOS dans les cellules endothéliales	27
1.10.4 Le NO dans le système immunitaire	27
1.11 Objectifs de la recherche	28
<b>CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>31</b>
2.1 Matériel	31
2.2 Méthodologie chez l'animal	31
2.2.1 Chats	31
2.2.2 Rats	32
2.3 Dissection des cerveaux	32
2.4 Préparation de la fraction cytosolique contenant la NOS	35
2.5 Mesure de l'activité enzymatique de la NOS	36
2.5.1 Caractérisation de la NOS de chat et de rat	37
2.5.2 Séparation de la citrulline et de l'arginine	38
2.6 Exposition des rats aux radiofréquences	39
2.7 Conditions expérimentales de l'exposition aux champs électromagnétiques	41
2.8 Types d'expositions	41
2.9 Dosage des protéines	42
2.10 Statistiques	42
<b>CHAPITRE 3: RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX: CARACTÉRISATION DE LA NOS DANS LE CERVEAU DE CHAT</b>	<b>45</b>
3.1 Caractérisation des paramètres biochimiques de la NOS dans le cerveau de chat	45
3.1.1 Influence du pH	45
3.1.2 Concentration de protéines cytosoliques	46
3.1.3 Concentration de NADPH	47

3.1.4 Effet du calcium et de la calmoduline .....	47
3.1.5 Détermination des paramètres cinétiques .....	50
3.2 Étude de l'effet des cofacteurs .....	51
3.2.1 Tetrahydrobioptérine et ses métabolites .....	51
3.2.2 FAD et FMN .....	52
3.2.3 Autres modulateurs .....	53
3.3 Paramètres cinétiques de la NOS en présence de FAD et H <sub>4</sub> B .....	54
3.4 Étude d'inhibiteur de la NOS analogue à l'arginine .....	55
3.5 Distribution de l'activité NOS dans différentes structures du cerveau de chat .....	56

<b>CHAPITRE 4: RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX: CARACTÉRISATION DE LA NOS DE RAT .....</b>	<b>59</b>
4.1 Caractérisation biochimique de la NOS de cerveau de rat .....	59
4.1.1 Concentration de protéines cytosoliques .....	59
4.1.2 Concentration du NADPH .....	60
4.1.3 Effet du calcium et de la calmoduline .....	61
4.1.4 Détermination des paramètres cinétiques .....	63
4.2 Étude de l'effet de quelques cofacteurs sur la NOS .....	64
4.2.1 Influence de la tétrahydrobioptérine et de ses métabolites .....	64
4.2.2 Influence du FAD, FMN et autres modulateurs .....	64
4.3 Détermination des paramètres cinétiques de la NOS de rat en présence de FAD et H <sub>4</sub> B .....	65
4.4 Caractérisation de deux inhibiteurs de la NOS analogue à l'arginine .....	66
4.5 Distribution de l'activité spécifique de la NOS dans différentes structures du cerveau de rat .....	67
4.6 Caractérisation préliminaire de la NOS surrénalienne de rat .....	69
4.7 Caractérisation préliminaire de la NOS hépatique de rat .....	70

4.8 Exposition de rats aux champs électromagnétiques .....	71
<b>CHAPITRE 5: DISCUSSION .....</b>	<b>74</b>
5.1 Caractérisation de la NOS du cerveau de chat .....	74
5.2 Caractérisation de la NOS du cerveau de rat .....	81
5.3 Caractérisation préliminaire de l'activité NOS des glandes surrénales de rat	84
5.4 Étude de la NOS hépatique .....	85
5.5 Effets des champs électromagnétiques sur l'activité de la NOS .....	86
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>88</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>89</b>

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1: Stoechiométrie de la réaction catalysée par la NOS .....	6
FIGURE 1.2: Représentation schématique d'une sous unité de de la NOS .....	7
FIGURE 1.3: Homéostasie calcique .....	13
FIGURE 1.4: Structure chimique de la tétrahydrobioptérine .....	15
FIGURE 1.5: Hypothèse d'un rôle redox pour la tétrahydrobioptérine .....	16
FIGURE 1.6: Représentation schématique du transport des électrons dans la NOS ...	21
FIGURE 2.1 : (a) Vue schématique du cerveau .....	34
(b) Repères anatomiques qui ont servi de référence lors de la dissection des cerveaux .....	34
FIGURE 2.2: Montage expérimentale pour l'exposition des rats aux radiofréquences .	43
FIGURE 2.3: Disposition des animaux lors de l'exposition .....	44
FIGURE 3.1: Effet du pH sur l'activité de la NOS de chat .....	45
FIGURE 3.2: Influence de la quantité de protéines cytosoliques de cerveau de chat sur la formation de citrulline .....	46
FIGURE 3.3: Effet du NADPH sur l'activité de la NOS de chat .....	47
FIGURE 3.4: Effet du calcium et de la calmoduline sur l'activité de la NOS de chat ..	48
FIGURE 3.5: Influence des chélateurs du calcium sur l'activité de la NOS de chat ....	49
FIGURE 3.6: Effet de l'antagoniste de la calmoduline W-7 sur l'activité de la NOS de chat .....	50
FIGURE 3.7: Détermination des paramètres cinétiques de la NOS de chat .....	51
FIGURE 3.8: Effet de la tétrahydrobioptérine et deux de ses métabolites sur l'activité de la NOS de chat .....	52

FIGURE 3.9: Effet du FAD et du FMN sur l'activité de la NOS de chat . . . . .	53
FIGURE 3.10: Effets de divers modulateurs sur l'activité de la NOS de chat . . . . .	54
FIGURE 3.11: Détermination du $K_m$ et du $V_{max}$ en présence de FAD et de tétrahydrobioptérine . . . . .	55
FIGURE 3.12: Détermination des $K_i$ de la méthyl- et nitro-arginine . . . . .	56
FIGURE 3.13: Effet de la nitrosodiméthylamine sur l'activité de la NOS . . . . .	57
FIGURE 3.14: Distribution de l'activité de la NOS dans onze structures du cerveau de chat . . . . .	58
FIGURE 4.1: Influence de la quantité de protéines cytosoliques de cerveau de rat sur la formation de citrulline . . . . .	59
FIGURE 4.2: Effet du NADPH sur l'activité de la NOS de rat . . . . .	60
FIGURE 4.3: Influence du calcium et de la calmoduline sur l'activité de la NOS . . . . .	61
FIGURE 4.4: Effet des chélateurs du calcium et de l'antagoniste de la calmoduline W-7 sur l'activité de la NOS . . . . .	62
FIGURE 4.5: Détermination des paramètres cinétiques de la NOS du cerveau de rat . . . . .	63
FIGURE 4.6: Influence de la tétrahydrobioptérine et deux de ses métabolites sur l'activité de la NOS de rat . . . . .	64
FIGURE 4.7: Effet du FAD, du FMN et d'autres modulateurs sur l'activité de la NOS . . . . .	65
FIGURE 4.8: Détermination des paramètres cinétiques de la NOS en présence de FAD et de tétrahydrobioptérine . . . . .	66
FIGURE 4.9: Caractérisation de l'inhibiteur de la NOS $N^G$ -monométhyl-arginine . . . . .	67
FIGURE 4.10: Caractérisation de l'inhibiteur de la NOS $N^G$ -nitro-arginine . . . . .	68
FIGURE 4.11: Distribution de l'activité NOS dans cinq structures du cerveau de rat . . . . .	69
FIGURE 5.1: Comparaison de la structure chimique de la nitrosodiméthylamine et de l'arginine . . . . .	80

**LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU 1.1: Résumé de la nomenclature de la NOS .....	6
TABLEAU 1.2: Caractéristiques cinétiques de la NOS rapportées dans la littérature ...	8
TABLEAU 1.3: Activation de la formation de nitrates en présence de ptéridines .....	14
TABLEAU 1.4: Les inhibiteurs de la NOS analogues à l'arginine .....	22
TABLEAU 4.1: Caractéristiques de la NOS des glandes surrénales de rat .....	70
TABLEAU 4.2: Mesure de l'activité de la NOS dans deux structures du cerveau de rats témoins et de rats exposés de façon aiguë à des radiofréquences de 9.3 GHz ..	71
TABLEAU 4.3: Mesure de l'activité NOS dans trois structures du cerveau de rats ayant été exposés de façon aiguë ou chronique à des radiofréquences de 9.3 GHz	72
TABLEAU 4.4: Mesure de l'activité NOS dans trois structures du cerveau de rats témoins et exposés chroniquement à des radiofréquences de 0.915 GHz .....	73

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

CEM	champs électromagnétiques
Ci	curie
dpm	désintégrations par minutes
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
EGTA	éthylènebis (oxéthylène nitrolo) tétraacétate
FAD	flavine adénine dinucléotide
FMN	flavine adénine mononucléotide
H <sub>4</sub> B	L-5,6,7,8 tétrahydrobioptérine
NADPH	nicotinamide dinucléotide phosphate réduite
NDMA	nitrosodiméthylamine
NO	oxyde nitrique (nitric oxide)
NOS	Nitric oxide synthase
NOS <sub>n</sub>	NO synthase neuronale
NOS <sub>s</sub>	NO synthase surrénalienne
PLP	pyridoxal 5' phosphate
POPOP	1,4-bis (5-phényl-2-oxozolyl) benzène
PPO	2,5-diphényloxazole
W-7	N-(6-aminohexyl)-5-chloro 1-naphtalènesulfonamide

## INTRODUCTION

Le monoxyde d'azote (NO) a la propriété d'être un gaz à la pression atmosphérique. Il est présent dans la fumée de cigarette, les émanations des avions et des voitures et, par le fait même, il devient un constituant du smog urbain. En 1988, on découvre que le NO est un produit de sécrétion des cellules eucaryotes et ce constat est venu chambarder le concept de messenger chimique vu sa petite taille et sa nature gazeuse. La communauté scientifique a à cette époque difficilement accepté que le NO puisse être synthétisé au niveau cellulaire entre autres dans les neurones, les cellules endothéliales et les macrophages. Aujourd'hui, les rôles que joue le NO dans le maintien du tonus vasculaire, la neurotransmission et le système immunitaire sont reconnus, acceptés et très étudiés.

C'est la découverte de la NO synthase (NOS), l'enzyme qui synthétise le NO, qui a confirmé que ce dernier était bel et bien fabriqué dans les cellules eucaryotes. La simplicité du NO est remarquable, mais on ne peut, par contre, en dire de même pour la NOS qui est une des enzymes les plus complexes connue à ce jour.

Il est évident que les rôles biologiques que joue le NO ne pourront être complètement compris tant que les mécanismes qui gèrent l'action de la NOS ne seront pas mieux définis, et aussi que la distribution de la NOS ainsi que le niveau d'activité NOS dans les tissus ne seront pas mieux caractérisés.

Cette enzyme fonctionne selon un mécanisme, qui est toujours incompris, et ce même après 5 ans d'étude, mais dont on a reconnu la participation de plusieurs groupements prosthétiques et cofacteurs. C'est dans cette voie d'avancement de la connaissance du fonctionnement de la NOS que s'inscrivent les travaux de recherche qui font l'objet de ce mémoire.

Le chapitre 1 présente principalement une revue de la littérature qui permet de présenter les connaissances actuelles sur la NOS. On retrouve aussi, dans ce chapitre 1, la définition des objectifs spécifiques des travaux de recherche rapportés dans ce mémoire. Le chapitre 2 décrit les méthodologies pour les expérimentations animales ainsi que celles pour mesurer l'activité enzymatique spécifique de la NOS. Les chapitres 3 et 4 exposent respectivement les résultats de la caractérisation biochimique de la NOS dans le cerveau de chats et de rats. On retrouve aussi à la fin du chapitre 4 quelques résultats sur la caractérisation de la NOS surrénalienne et de la NOS hépatique de rat, ainsi que quelques mesures de l'activité de la NOS dans des cerveaux de rats exposés à des radiofréquences. Dans le chapitre 5, les résultats expérimentaux sont discutés, puis comparés entre eux et avec la littérature.

## CHAPITRE 1

### RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE ET PRÉSENTATION DES OBJECTIFS DE RECHERCHE

#### 1.1 Historique

Dès 1916, les premières évidences de l'existence d'une voie métabolique capable de synthétiser des oxydes d'azote étaient rapportées (Mitchell *et al.*, 1916). Dans ces travaux, il avait été remarqué que l'urine de rats contenait plus de nitrites et de nitrates que la diète n'en contenait. Beaucoup plus tard, soit en 1985, Stuehr et Marletta (1985) ont montré que des macrophages exposés à des toxines bactériennes *in vitro* exprimaient une forte activité de synthèse d'oxydes d'azote. Peu après, un des atomes d'azote guanidino de l'arginine a été démontré comme étant la source des nitrites et nitrates et ceci s'accompagnait d'une production de citrulline (Hibbs *et al.*, 1987). Ils ont alors conclu que les macrophages ne formaient pas les nitrites et nitrates, mais plutôt un autre oxyde d'azote beaucoup plus réactif, qui lui, était rapidement transformé en nitrite et nitrate. Cet oxyde d'azote très réactif semblait responsable de l'action cytotoxique des macrophages.

À la même époque et dans une ligne de recherche totalement différente, les mécanismes de relaxation de l'endothélium vasculaire étaient très étudiés. Il semblait clair que lorsque l'endothélium vasculaire était stimulé avec de l'acétylcholine, un facteur était relâché par les cellules endothéliales et qu'il stimulait la formation de GMPc dans les cellules

musculaires lisses entourant l'endothélium. Mais personne n'arrivait à isoler ce facteur qui semblait très labile. Finalement, on lui a donné le nom de EDRF (pour "endothelium-derived relaxing factor"). L'équipe d'Ignarro *et al.* (1987) en est venue à la conclusion que le NO était pharmacologiquement identique à l'EDRF. Par la suite, cette équipe a aussi démontré que l'arginine était utilisée par les cellules endothéliales vasculaires pour synthétiser le NO (Sakama *et al.*, 1988).

En 1988, la neurophysiologie suit les traces de l'immunologie et de la cardiologie en proposant un rôle pour le NO dans le cerveau. Il a été démontré qu'une substance labile, similaire au NO, était relâchée dans des tranches de cervelet suite à une exposition à des acides aminés excitateurs (Garthwaite *et al.*, 1988). Cette substance causait une augmentation du GMPc dans plusieurs types cellulaires contenus dans ces mêmes tranches de cervelet et le NO avait la même propriété pharmacologique.

Finalement, à la fin de 1988 l'équipe de Marletta démontra que la conversion de l'arginine en citrulline et NO, dans un extrait de macrophage immunologiquement stimulé, était de nature enzymatique et qu'elle était dépendante de la présence de NADPH (Marletta *et al.*, 1988). En plus d'être observée à l'aide d'extraits cellulaires de macrophages, cette conversion enzymatique a par la suite été démontrée dans les cellules endothéliales (Mayer *et al.*, 1989), le cerveau (Knowles *et al.*, 1989), les poumons (Mayer et Böhme, 1989) et les surrénales (Palacios *et al.*, 1989). Dans ces tissus, la présence de calcium était aussi requise pour observer la synthèse de NO et de citrulline, alors que dans les macrophages, seulement le NADPH était nécessaire.

C'est en 1990 que l'existence de la NOS fut démontrée de façon univoque lorsque Bredt et Snyder (1990) ont purifié une protéine exhibant les propriétés catalytiques de la NOS. De plus, ils ont démontré que la calmoduline (CaM) était essentielle dans l'activité de la NOS purifiée. La même démonstration a été faite pour la NOS purifiée à partir de ces cellules endothéliales (Busse et Mülsch, 1990).

## 1.2 Nomenclature des NOS

À ce jour, toutes les isoformes de la NOS sont répertoriées sous un seul numéro de l'“Enzyme Commission”, soit le E.C.1.14.13.39. Dans la littérature, le qualificatif constitutif est utilisé pour les NOS qui sont exprimées en tout temps dans un type cellulaire, comme par exemple dans les neurones et les cellules endothéliales. Le qualificatif inductible, quant à lui, est utilisé pour définir les NOS qui sont induites par certains messagers chimiques. Dans les macrophages et dans le foie, par exemple, le TNF (tumor necrosis factor) et certaines interleukines induisent la synthèse de l'isoforme inductible de l'enzyme.

La principale nomenclature pour les NOS consiste à nommer les isoformes selon trois critères : 1- leur dépendance ou non envers le calcium et la CaM, 2- leur origine cellulaire et 3- leur expression, à savoir constitutive ou inductible. Ce type de nomenclature peut créer énormément de confusion car les formes inductibles et constitutives peuvent se retrouver en même temps dans un même type cellulaire. De plus, la même isoforme peut se retrouver dans deux types cellulaires. Par exemple, les NOS des muscles et des neurones sont considérées comme étant la même isoforme. Une deuxième méthode de nomenclature consiste à numéroter les NOS selon l'ordre dans lequel elles ont été clonées : le type I est l'isoforme retrouvé dans le cerveau, le type II est l'isoforme inductible retrouvé dans les macrophages et le type III est celui retrouvé dans les cellules endothéliales. La nomenclature est résumée au tableau 1.1.

Ce type de nomenclature ne tient malheureusement pas compte des autres isoformes de la NOS qui se retrouvent dans les muscles, les surrénales, l'estomac, et les poumons. Plus récemment, les différentes isoformes chez l'humain ont été classées selon la position de leur gène sur le chromosome (Nathan et Xie, 1994).

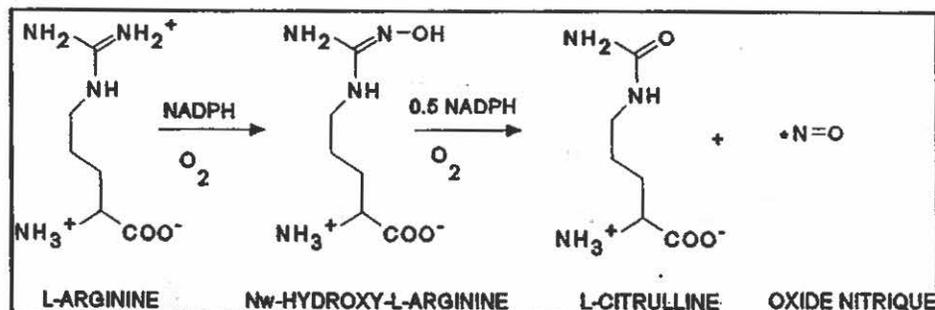
Nomenclature numérale	Nomenclature descriptive	Caractéristiques
NOS type I	NOS <sub>c</sub> n dépendante du Ca <sup>++</sup> /CaM	activation via 1 Ca <sup>++</sup> → liaison de la CaM à la NOS
NOS type II	NOS <sub>c</sub> e dépendante du Ca <sup>++</sup> /CaM	activation via 1 Ca <sup>++</sup> → liaison de la CaM à la NOS
NOS type III	NOS <sub>i</sub> indépendante du Ca <sup>++</sup> /CaM	activation via induction de la transcription

**TABLEAU 1.1** Résumé schématique de la nomenclature des différents isoformes de la NOS et aperçu de leur mécanisme d'activation.

c= constitutive, i= inductible, e= endothéliale, et n= neuronal.

### 1.3 Réaction générale catalysée par la NOS

La réaction enzymatique catalysée par la NOS est complexe et il reste toujours certains détails du mécanisme qui sont incompris. La stoechiométrie de la réaction est décrite à la figure 1.1.

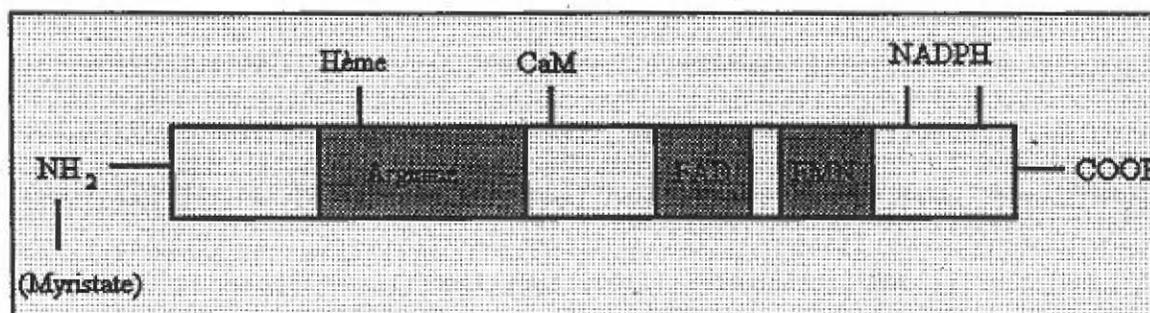


**FIGURE 1.1** Stoechiométrie de la réaction enzymatique catalysée par la NOS.

Les substrats de la NOS sont l'oxygène, le NADPH et la L-arginine. Pendant la réaction, la N<sup>o</sup>-hydroxy-L-arginine est formée comme intermédiaire. Par la suite, cet intermédiaire réactionnel est transformé en L-citrulline et les co-produits de cette réaction sont le NO, l'eau, et le NADP<sup>+</sup>.

Le mécanisme se complique grandement lorsque l'on tient compte des groupements prosthétiques qui participent à la réaction catalysée par la NOS. Le calcium et la CaM permettent à la NOS d'adopter une structure catalytiquement active, et un groupement hème situé près du site actif est le médiateur de l'oxydation de l'arginine en citrulline et NO. De plus, le FAD, le FMN et la tétrahydrobioptérine (H<sub>4</sub>B) jouent un rôle dans le transport des électrons.

La NOS est physiquement composée de deux sous-unités identiques. Sur chaque sous-unité (voir la figure 1.2), on retrouve un domaine de réductase, qui lie le FAD, le FMN et le NADPH, et un domaine d'oxygénase, qui lie la CaM, l'arginine, l'hème et l'oxygène (Bredt *et al.*, 1991). De plus, cette figure montre que l'acide myristique est lié à la portion N-terminale de la NOS des cellules endothéliales, lui permettant ainsi de se lier à la membrane cytoplasmique. Les isoformes des neurones et des macrophages se retrouvent en majeure partie dans le cytosol car elles n'ont pas la séquence consensus à leur extrémité N-terminale qui permet la liaison de l'acide myristique (Hecker *et al.*, 1994).



**FIGURE 1.2** Représentation schématique de la structure protéique primaire d'une sous-unité des NOS. Le domaine de réductase possède les sites de liaisons pour le NADPH, le FAD et le FMN. Le domaine de l'oxygénase contient les sites de liaisons pour l'arginine, la CaM et l'hème. Seulement l'isoforme de la NOS<sub>c</sub> peut lier le myristate.

#### 1.4 L'arginine comme substrat de la NOS

La point tournant dans l'identification de la voie enzymatique responsable de la synthèse de NO fut la démonstration que l'arginine est le précurseur du NO (Marletta *et al.*, 1988). Toutes les isoformes de la NOS utilisent l'arginine et la transforment en NO et citrulline. Durant cette transformation enzymatique, un intermédiaire réactionnel est formé: la N<sup>ω</sup>-hydroxyarginine (Tayeh et Marletta, 1989; Stuehr *et al.*, 1991). Cet intermédiaire est par la suite réoxydé en NO et citrulline tel que schématisé à la figure 1.1. Korth *et al.* (1994) ont montré que le groupement hème de la NOS joue un rôle important dans la transformation de la N<sup>ω</sup>-hydroxyarginine en citrulline et NO.

La cinétique de la NOS a été caractérisée en fonction du substrat L-arginine; le tableau 1.2 résume les données obtenues pour le  $K_m$  et le  $V_{max}$  de la NOS constitutive dans plusieurs tissus et espèces.

Milieu	Structures	$K_m$ $\mu M$	$V_{max}$ (nmol/min/mg)
Semi-purifié	Cortex frontal de rat (Moncada <i>et al.</i> , 1989)	8.4	0.042
	Cervelet de rat (Bredt et Snyder, 1989)	6	0.160
	Cellules de neuroblastomes de souris (Gorsky <i>et al.</i> , 1990)	1.25	—
Purifié	Cervelet de rat (Bredt et Snyder, 1990)	2	960
	Cervelet de porc (Mayer <i>et al.</i> , 1990)	—	730
	Cervelet humain (Schmidt et Murad, 1994)	—	74
	Endothélium bovin (Pollock <i>et al.</i> , 1991)	2.9	15

**TABLEAU 1.2** Caractéristiques cinétiques de la NOS constitutive en fonction de l'arginine dans divers tissus et espèces. Le  $V_{max}$  est exprimé nmol de citrulline formée/mg prot/min sauf pour le cortex frontal ou il est exprimé en nmol de NO<sub>x</sub> formé/mg prot/min. NO<sub>x</sub> = somme des nitrites et des nitrates.

Les différents  $K_m$  rapportés sont tous du même ordre de grandeur et ils indiquent que la NOS possède une grande affinité pour l'arginine. Les  $V_{max}$  ne sont pas comparables entre eux ce qui s'explique par le fait qu'ils dépendent du facteur de purification.

La concentration d'arginine à l'intérieur des cellules endothéliales varie de 100 à 1000  $\mu\text{M}$  et dans la circulation sanguine elle varie entre 100 et 200  $\mu\text{M}$  (Stuehr et Griffith, 1992). Ces concentrations sont bien au-dessus du  $K_m$  de la NOS pour l'arginine. À partir de ces données, il est convenable d'assumer que la biodisponibilité de l'arginine n'est pas un facteur limitant dans la synthèse de NO. De plus, il a été démontré que certains types cellulaires peuvent recycler la citrulline en arginine permettant ainsi de remettre en disponibilité le substrat de la NOS (Hecker *et al.*, 1990; Sessa *et al.*, 1990). Un transporteur membranaire pouvant acheminer l'arginine à l'intérieur des macrophages, des cellules musculaires et des hépatocytes sous différentes conditions physiologiques vient récemment d'être cloné suggérant ainsi que les cellules peuvent rapidement se procurer de l'arginine à partir du milieu extracellulaire (Finley *et al.*, 1995).

### 1.5 Le couple calcium/calmoduline et la NOS

Mülsh *et al.* (1989) et Busse et Mülsh (1990) ont montré que le calcium activait la formation de NO dans des extraits de cellules endothéliales. La même démonstration a été faite dans le cerveau de rat (Knowles *et al.*, 1989) où il est décrit que l'ion calcium est essentiel pour l'activité enzymatique de la NOS. Ces deux isoformes de la NOS sont dépendantes du calcium. On peut aussi généraliser en mentionnant que toutes les isoformes qui sont exprimées de façon constitutive sont dépendantes du calcium, comme dans le cerveau, les cellules endothéliales, les surrénales (Palacios *et al.*, 1989), et les muscles (Kobzik *et al.*, 1994; Snyder, 1994). Par contre, les isoformes inductibles sont toutes indépendantes du calcium pour leurs activités enzymatiques (Yui *et al.*, 1991). Une seule exception a été rapportée pour la NOS inductible retrouvée dans les neutrophiles (Hiki *et al.*, 1991), mais ces travaux sont non concluants à ce moment.

En utilisant une enzyme purifiée et des concentrations de calcium libre bien définies, il a été démontré qu'en présence de 80 nM de calcium, aucune activité NOS n'est observable (Schmidt *et al.*, 1991). Une valeur de 80-100 nM correspond à la concentration de calcium retrouvée dans un neurone au repos. Par contre, à des concentrations de calcium libre supérieures à 200 nM, l'activité enzymatique maximale de la NOS est remarquée (Bredt et Snyder 1990; Schmidt *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1990). Donc, lorsque les neurones et les cellules endothéliales sont stimulés par un agoniste qui cause une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, il y aura une activation simultanée de la NOS. Une étude *in vitro* menée par Mittal et Jadhav (1994) montre que lorsque la NOS est préincubée avec du calcium (3 min), l'activité enzymatique mesurée subséquentement est beaucoup plus faible que la valeur du témoin. Ce groupe de recherche propose que le calcium pourrait réguler la NOS par un double-mécanisme: activateur initialement et inhibiteur après un certain temps. Mais cette démonstration reste à faire *in vivo*.

La CaM est une protéine qui est ubiquitaire et qui est reconnue depuis très longtemps comme un modulateur de l'activité de plusieurs enzymes. Récemment, plusieurs facettes de la CaM ont été discutées (James *et al.*, 1995) et en particulier sur son rôle d'activateur ainsi que d'inhibiteur de certaines enzymes. La CaM fait partie de la famille de protéines liant le calcium. Elle possède une affinité pour le calcium d'environ 1  $\mu$ M, et on peut la considérer comme le premier joueur dans le décodage des signaux intracellulaires reliés à une élévation de la concentration intracellulaire de calcium ( $\geq 1 \mu$ M). Les mesures de l'activité NOS dans des préparations enzymatiques semi-purifiées ne révélaient aucun rôle pour la CaM dans la synthèse de NO puisque que ces préparations avaient des concentrations saturantes de CaM. Par contre, lorsque la NOS a été purifiée pour la première fois, il a été démontré que la présence de CaM était essentielle à l'activité enzymatique (Bredt et Snyder, 1990). La même observation a été rapportée par Schmidt *et al.* (1991) et Pollock *et al.* (1991) lorsqu'ils ont purifié la NOS dans le cervelet et les cellules endothéliales de rat, respectivement. Cette observation expliquait entre autre que la CaM est le modulateur du rôle crucial joué par le calcium dans la synthèse de NO par la NOS des cellules endothéliales et des neurones. D'une

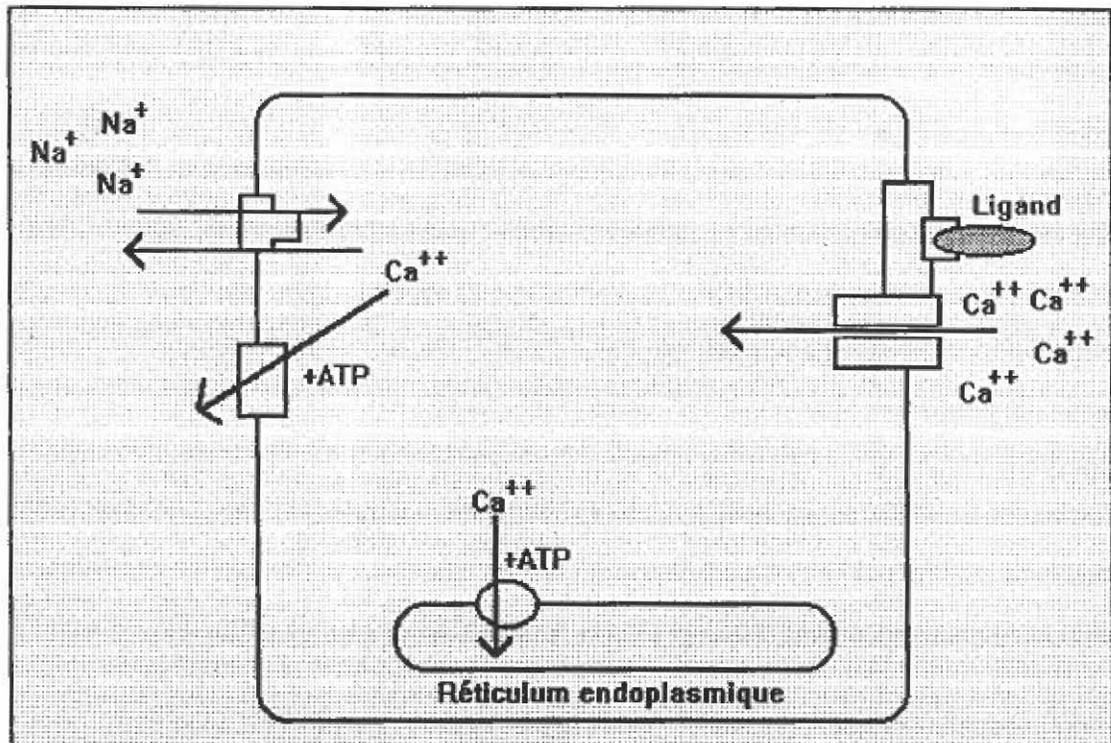
manière opposée, la purification de la NOS des macrophages (isoforme inductible) ne révélait aucune dépendance en CaM, ce qui colle bien avec l'observation de son absence de dépendance en calcium (Yui *et al.*, 1990, Yui *et al.*, 1991). Les isoformes constitutives et inductibles semblaient donc avoir des mécanismes de régulation différents. Par contre, Cho *et al.* (1992) ont montré que la CaM était co-purifiée avec la NOS des macrophages. De plus, elle était liée tellement fortement à l'enzyme qu'on pouvait la considérer comme une sous-unité intégrante de l'enzyme. Les autres isoformes inductibles de la NOS qui ont été caractérisées par la suite ont aussi montré cette forte affinité pour la CaM, comme par exemple pour la NOS du foie qui a un  $EC_{50}$  de 2 nM envers la CaM en absence de calcium (Evens *et al.*, 1992). Ces résultats sont étonnants car la CaM est normalement activée par une augmentation de la concentration de calcium, et elle est par la suite couplée à l'activité de plusieurs enzymes. Donc la NOS inductible démontre un mécanisme de liaison à la CaM qui est indépendant du calcium et qui est unique à cette isoforme et, quant à elle, l'isoforme constitutive de la NOS lie la CaM par un mécanisme dépendant du calcium.

La CaM peut lier quatre atomes de calcium. Cette liaison du calcium induit un changement conformationnel important qui résulte à la formation de deux régions hydrophobes sur la CaM. Ce sont ces régions hydrophobes de la CaM qui vont interagir avec les "domaines de liaison de la CaM" qui sont présents sur les protéines dont l'activité est régulée par le couple calcium/CaM. Les "domaines de liaison de la CaM" possèdent peu d'homologie entre eux, mais ils ont tous le potentiel de former une hélice alpha amphipatique. Un "domaine de liaison de la CaM" a été identifié sur la NOS lorsqu'elle fut clonée pour la première fois. Cette région de la NOS fut caractérisée comme une séquence pouvant former une hélice alpha amphipatique (Bredt *et al.*, 1991). La liaison de la CaM aux NOS constitutives fait suite à une élévation de la concentration intracellulaire de calcium et est un mécanisme de régulation qui permet d'activer l'activité enzymatique NOS constitutive pendant une période de quelques secondes et par la suite, lorsque la concentration de calcium redevient normale, la CaM se redissocie de la NOS et la synthèse de NO se termine. Les NOS inductibles lient la CaM d'une manière irréversible et indépendante du calcium une fois

qu'elles sont induites, et synthétisent du NO pendant de longues périodes de temps (Nathan et Xie, 1994).

L'utilisation de chélateurs du calcium et d'antagonistes de la CaM est monnaie courante dans la littérature discutant de la NOS. L'EDTA et l'EGTA sont les plus fréquemment utilisés pour créer des milieux d'incubation sans calcium et ils ont permis de mieux comprendre les rôles de cet ion dans la réaction NOS. Les antagonistes de la CaM les plus fréquemment utilisés sont les naphthalènesulfonamides substitués (W-5, W-7, W13), la trifluopérazine et le calmidazolium. Ces antagonistes ont une affinité élevée pour la CaM. Okamura et Toda (1994) ont montré que deux antagonistes de la CaM (le calmidazolium et le W-7) diminuaient significativement la relaxation NO dépendante de l'endothélium des artères isolées. Ceci démontre l'importance de la CaM dans la synthèse de NO. Une nouvelle classe d'antagoniste de la CaM, les imidazoles, a récemment été rapportée (Woolf et al, 1993a; Woolf *et al.*, 1993b). Ces composés s'associent à la région de la NOS qui lie normalement la CaM et empêchent par conséquent l'activation de la NOS constitutive par la CaM.

Les cellules ont la propriété de maintenir de faibles concentrations intracellulaires de calcium lorsqu'elles sont aux repos (moins que 80 nM). Des pompes traversant la membrane sont chargées d'expulser le calcium hors des cellules. Le calcium est aussi séquestré à l'intérieur des cellules dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Physiologiquement, plusieurs agonistes ont la propriété d'augmenter la concentration de calcium dans les neurones (voir la figure 1.3). On peut entre autre nommer les acides aminés neuroexcitateurs glycine et glutamate, le kainate et le N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ces agonistes ont tous le pouvoir de lier une sous-classe de récepteur NMDA et de créer une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire via ces récepteurs. Bredt et Snyder (1989) ont montré que des tranches de cervelets exposés aux acides aminés neuroexcitateurs formaient de la citrulline et du NO à partir de l'arginine.



**FIGURE 1.3** Homéostasie calcique. La concentration intracellulaire de calcium est maintenue à un bas niveau par la cellule lorsqu'elle est non-stimulée. Le calcium est expulsé hors de la cellule par des pompes membranaires. Cette figure illustre la pompe Ca<sup>++</sup>/ATPase (complexe de droite) qui expulse des ions calcium dans le milieu extracellulaire à l'aide de l'hydrolyse de l'ATP, et la pompe Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> ATPase (complexes de gauche) qui échange deux ions calcium du milieu intracellulaire contre trois ions sodium en hydrolysant une molécule d'ATP. Le calcium peut aussi être emmagasiné dans le réticulum endoplasmique à l'aide d'une pompe qui traverse sa membrane. Une variété de ligands peut causer l'entrée de calcium dans la cellule en se liant à des récepteurs qui sont couplés à des canaux ioniques. À ce titre, les agonistes des récepteurs NMDA tels le glutamate, la glycine, et le NMDA causent l'ouverture de canaux calciques et il résulte alors une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire de calcium. Cette élévation de calcium cause l'activation de la NOS et, par la suite, le calcium est rapidement repoussé hors de la cellule et l'activité de la NOS se termine.

## 1.6 La tétrahydrobioptérine et la NOS

La tétrahydrobioptérine (H<sub>4</sub>B) a été définie comme un cofacteur de la NOS des macrophages (Kwon *et al.*, 1989), mais aucun travaux ne rapportait un besoin en H<sub>4</sub>B pour les isoformes constitutives de la NOS (cerveau et cellules endothéliales). Les premières années durant lesquelles la NOS neuronale fut le plus caractérisée biochimiquement, la H<sub>4</sub>B n'était pas incluse dans les mesures enzymatiques. Mayer *et al.*(1991) furent les premiers à montrer que la H<sub>4</sub>B a le potentiel d'activer la NOS du cervelet de porc.

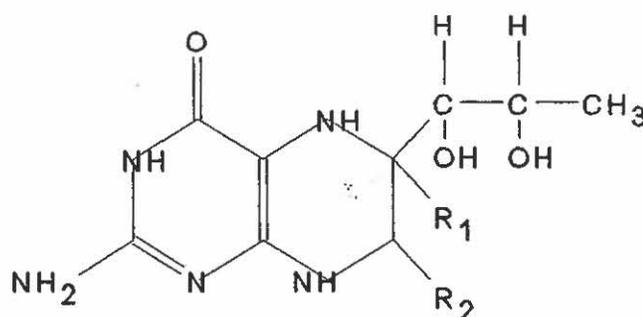
Les structures de la H<sub>4</sub>B et de deux de ses métabolites sont présentés à la figure 1.4. Plusieurs ptéridines ont été testées *in vitro* sur la NOS des macrophages de rat. Le tableau 1.3 résume l'effet activateur de quatre ptéridines sur l'activité de la NOS à une concentration de 50 µM. D'autres ptéridines (la bioptérine, la néoptérine, la xanthoptérine) ont aussi été testées mais elles ont failli à activer la NOS. Ces résultats montrent que c'est vraiment la H<sub>4</sub>B qui est la ptéridine qui joue un rôle significatif sur l'activité enzymatique de la NOS.

Ptéridines ajoutées	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] formé µM
aucune	58.1±1.2
H <sub>4</sub> B	146.9±3.1
H <sub>4</sub> -Néoptérine	77.0±3.3
6-méthyl H <sub>4</sub> B	82.1±2.9
6,7-diméthyl H <sub>4</sub> B	67.0±4.2

**TABLEAU 1.3** Activation de la formation de nitrates, en présence de 50 µM de quatre différentes ptéridines, par la NOS des macrophages pendant une incubation de 3h en présence de 2 mM de NADPH et 2 mM d'arginine (Kwon *et al.*, 1989).

La H<sub>4</sub>B est un cofacteur d'un nombre limité d'enzymes. En plus de la NOS, la H<sub>4</sub>B participe aux réactions enzymatiques catalysées par les hydroxylases de la phénylalanine, la tyrosine et du tryptophane ainsi que par l'alkylglycérol monooxygénase. Pour les

hydroxylases des acides aminés aromatiques, la H<sub>4</sub>B joue un rôle de donneur d'électrons en se liant au site catalytique de ces enzymes en présence d'oxygène. Cela favorise la formation d'un intermédiaire réactif de l'oxygène lié à un atome de fer non-hémique qui hydroxylerait le substrat (Kwon *et al.*, 1989). Un rôle comparable semblait évident pour la H<sub>4</sub>B dans la réaction catalysée par la NOS, mais les résultats expérimentaux ne semblent pas le démontrer clairement.



**FIGURE 1.4** Structure chimique de la tétrahydrobioptérine et de deux de ses métabolites.

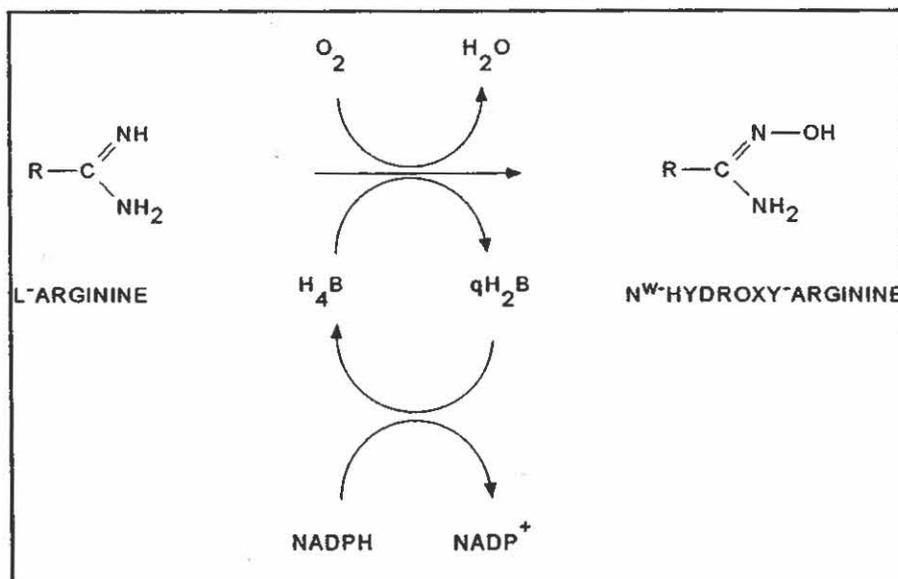
Tétrahydrobioptérine: R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>=H

(6)-méthyl-tétrahydrobioptérine: R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub> et R<sub>2</sub>=H

(6,7)-diméthyl-tétrahydrobioptérine: R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>

Deux modèles sont proposés quant à l'action de la bioptérine dans la réaction catalysée par la NOS. Le premier modèle suggère que la H<sub>4</sub>B joue un rôle redox en fournissant des électrons, permettant ainsi l'oxydation de l'arginine en citrulline et en NO. La synthèse de [<sup>3</sup>H]-H<sub>4</sub>B a permis de montrer la très grande affinité de la H<sub>4</sub>B pour la NOS, soit un K<sub>D</sub> de 0.2 μM (Werner *et al.*, 1994; Klatt *et al.*, 1994). Cette affinité est beaucoup plus élevée que celle observée envers les hydroxylases des acides aminés aromatiques pour lesquelles le K<sub>m</sub> varie entre 100-600 μM. Ils ont aussi montré que cette ptérine réduite n'était pas remplaçable par la quinone dihydrobioptérine (H<sub>2</sub>-bioptérine), une ptéridine oxydée, suggérant ainsi une grande importance des électrons que peut fournir la H<sub>4</sub>B. En accord avec ces résultats, Mayer *et al.* (1991) ont proposé que la H<sub>4</sub>B donnerait deux électrons pour former la N<sup>6</sup>-hydroxyarginine, un intermédiaire réactionnel, et que la ptérine oxydée, la quinone H<sub>2</sub>-bioptérine, est recyclée en H<sub>4</sub>B au coût d'une molécule de NADPH, tel que

schématisé à la figure 1.5. Par contre, la démonstration de ce recyclage n'a pas été faite. Hevel et Marletta (1992) suggèrent eux aussi un rôle redox pour la  $H_4B$  puisqu'un analogue de la  $H_4B$  qui est inoxydable, le 6-méthyl-5-déaza- $H_4B$ , ne permet pas de stimuler la NOS. La conclusion de leurs travaux est que le cofacteur doit être sous la forme réduite et il doit aussi être oxydable par la NOS.



**FIGURE 1.5** Hypothèse impliquant un rôle redox pour la  $H_4B$  lors de la transformation de l'arginine en  $N^{\omega}$ -hydroxyarginine (Mayer *et al.*, 1991). q=quinone.

Le deuxième modèle suggère que la liaison de la  $H_4B$  à la NOS cause une modification allostérique augmentant l'activité enzymatique de la NOS. Ce modèle a été proposé principalement parce qu'il est impossible d'assigner une étape dans la transformation de l'arginine en citrulline et NO où les électrons de la  $H_4B$  pourraient avoir un rôle. La démonstration qu'un cycle redox est présent entre la  $H_4B$  et quinone- $H_2$ -bioptérine n'a pas été possible jusqu'à maintenant (Klatt *et al.*, 1994). De plus, l'observation que la  $H_4B$  est active à des concentrations plus faibles que des concentrations stoechiométriques vis-à-vis la NOS suggère un rôle comme régulateur allostérique de la NOS. En effet, il a été démontré

qu'une molécule de  $H_4B$  permet la formation d'environ 20 molécules de produits (Mayer, 1994). En support avec ce modèle, il a aussi été montré que la reconstitution d'un dimère actif de la NOS à partir de deux monomères inactifs de la NOS (purifiée en conditions dénaturantes) requiert la présence de  $H_4B$  (Nathan et Xie, 1994). Dans la même ligne de pensée, Wang *et al.* (1994) ont montré par des expériences de spectroscopie poussées que la liaison de la  $H_4B$  à la NOS joue un rôle critique pour assurer la liaison de l'oxygène au site actif. Toutes ces données suggèrent que la  $H_4B$  joue un rôle de régulateur allostérique dans la réaction enzymatique catalysée par la NOS.

La plupart des groupes de recherche sont d'accord pour souligner que le rôle de la  $H_4B$  dans la production de NO reste à clarifier (Scott-Burden, 1995). De plus, le fait que la  $H_4B$  était associée seulement à la NOS inducible et qu'elle fut ignorée dans les premières études de la NOS constitutive (cerveau et cellules endothéliales) amène de la confusion dans la littérature. Bredt et Snyder (1991) avaient même mentionné que la  $H_4B$  n'était pas utilisée par la NOS neuronale et que c'était une différence majeure entre cette isoforme et l'isoforme inducible. Des études plus poussées quant au rôle de la  $H_4B$  seront nécessaires pour uniformiser le mécanisme général de la NOS (Stuehr et Griffith, 1992).

Sous un autre angle, la région exacte où se lie la  $H_4B$  sur la NOS demeure inconnue. Klatt *et al.* (1994) ont suggéré que la  $H_4B$  devait se lier près du site actif, et en particulier près du groupement hème. Un autre groupe a rapporté avoir identifié le site de liaison de la  $H_4B$  à la NOS en comparant la séquence en acides aminés de la NOS avec une banque de données composée de plusieurs séquences d'acides aminés de protéines (Uvarov et Lyashenko, 1995). Il faut cependant être prudent avec cette étude qui est de nature théorique et une démonstration plus rigoureuse reste à faire.

La biodisponibilité de la  $H_4B$  *in vivo* pour les isoformes constitutives de la NOS ne devrait pas être un facteur limitant dans la synthèse de NO vu la très forte affinité des NOS envers ce cofacteur. Il est intéressant de mentionner que les messagers chimiques qui

induisent la synthèse de la NOS inducible induisent en même temps la synthèse des enzymes impliquées dans la voie anabolique de la H<sub>4</sub>B. Cette régulation pourrait laisser croire que la disponibilité de H<sub>4</sub>B ne sera pas un facteur limitant dans la synthèse de NO. Mais Muhl et Pfeilschifter (1994) ont démontré le contraire dans des cellules mésangiales stimulées à l'interleukine 1 $\beta$  ou la NOS ainsi que la GTP-cyclohydrolase, une des enzymes impliquées dans la biosynthèse de H<sub>4</sub>B, étaient induites. Ils ont noté que l'ajout d'un précurseur de la H<sub>4</sub>B, la sepiaptérine, augmentait significativement la synthèse de nitrites et de nitrates ainsi que de GMPC suggérant que la NOS n'était pas saturée en H<sub>4</sub>B.

### 1.7 Le NADPH, les flavines, l'hème et l'homologie avec la cytochrome P450 réductase

La démonstration du rôle primordial que joue le NADPH dans l'activité de la NOS date des premières études sur la transformation de l'arginine en citrulline et en NO (Marletta *et al.*, 1988). De façon particulière, ces auteurs ont montré que une mole de NADPH était oxydée pour former la N<sup>ω</sup>-hydroxyarginine et que 0.5 mole de NADPH était nécessaire pour transformer la N<sup>ω</sup>-hydroxyarginine en citrulline (Stuehr *et al.*, 1991). Stuehr *et al.* (1990) ont identifié le FAD comme un cofacteur potentiel de la NOS vu son rôle d'activateur de l'activité de la NOS *in vitro*. Ces résultats sont devenus clairement expliquables lorsque Bredt *et al.* (1991) ont cloné le gène de la NOS neuronale de rat. En déduisant la séquence des acides aminés de la NOS pour la première fois, ils ont montré que la NOS contenait deux sites de liaison pour le NADPH, ainsi qu'un site de liaison pour le FAD et un pour le FMN. De plus, ils ont comparé la séquence de la NOS avec des banques de données et ils ont montré que l'extrémité C-terminale de la NOS et de la cytochrome P-450 réductase possédaient 36% d'homologie. De toutes les protéines caractérisées chez les mammifères jusqu'à maintenant, ce sont les deux seules protéines connues à lier les deux flavines, FAD et FMN.

Des études spectrales sur la NOS purifiée ont proposé que la NOS pourrait contenir un atome de fer. Par un dosage spectroscopique, deux moles de fer et de protoporphyrine IX ont été mesurées par dimère de NOS, suggérant la présence d'un groupement hème

(Stuehr et Saito, 1992; McMillan *et al.*, 1992). La présence des flavines a aussi été confirmée dans ces expériences. Des études préliminaires de mutagenèse ont été entreprises dans le but de déterminer les acides aminés coordonnant l'hème. Chen *et al.* (1994) ont récemment rapporté que la cystéine 184 joue un rôle crucial dans l'activité de la NOS en créant une NOS mutante (cystéine 184 muté en alanine 184). Ils ont montré que ce mutant ne peut plus lier le CO et ils ont donc conclu que l'hème n'était plus coordonné par la NOS mutée. Il a été rapporté que du fer non hème pourrait aussi être lié à la NOS (Stuehr et Griffith, 1992). Finalement Weiss *et al.* (1994) ont ajouté du fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) et un chélateur du fer, la desferrioxamine, à des préparations de NOS pour vérifier si le fer ferrique peut directement influencer de l'activité de la NOS. Ils ont noté que la desferrioxamine n'avait aucun effet sur l'activité de la NOS mais que le fer inhibait la NOS en détruisant la H<sub>4</sub>B. Ces résultats suggèrent que le fer doit être sous la forme hémique lorsque lié à la NOS.

Les études spectrales ont aussi révélé un maximum d'absorption à 450 nm, caractéristique typique des cytochromes P-450, une famille de protéines impliquées dans le métabolisme de produits endogènes et de xénobiotiques. Mécanistiquement, les cytochromes P-450 catalysent des réactions de monooxygénation sur leurs substrats. Il est bon à ce point de mentionner que les cytochromes P-450 ont besoin d'une réductase pour assurer l'apport des électrons. Dans ce sens la NOS pourrait être le premier cytochrome P-450 cytosolique (soluble) ainsi qu'auto-suffisant (puisque sur le même peptide se retrouvent les composantes réductase et oxygénase). Certaines équipes ont rapporté que la NOS pouvait être classée comme un cytochrome P-450 vu son activité de réductase, de monooxygénase ainsi que de ses caractéristiques spectrales (White et Marletta, 1992). Par contre, l'analyse de la portion N-terminale de la NOS ne révèle aucune homologie avec la famille des cytochromes P-450, et ce même dans la portion impliquée dans la liaison de l'hème (Marletta, 1994). Ces résultats ne sont pas vraiment surprenants puisque le substrat de la NOS est l'arginine, une molécule très hydrophile, et le substrat de cytochrome P-450 sont des substrats endogènes ou des xénobiotiques plutôt hydrophobes.

La chaîne de transporteur d'électrons de la NOS n'est pas complètement comprise, mais plusieurs étapes sont bien caractérisées. Les électrons du NADPH sont extraits par les flavines de la portion réductase de la NOS tel que démontré par la présence d'un radical semiquinone d'une flavine, et les électrons seraient par la suite transférés au groupement hème (Stuehr et Ikeda, 1992). Ce mécanisme qui a été confirmé par ce même groupe (Abu-Soud et Stuehr, 1993) est très similaire à celui de la cytochrome P-450 réductase.

Le contrôle du passage des électrons des flavines vers le groupement hémique est régi par la liaison de la CaM à la NOS. En effet, il a été montré que la NOS neuronale peut réduire des substrats autres que l'arginine, tels que le ferricyanure et le cytochrome c, seulement en présence de CaM (Abu-Soud et Stuehr, 1993, Abu-Soud *et al.*, 1994a). À partir de ces expériences, ils ont déterminé une valeur de  $K_m$  du NADPH pour la NOS de 2  $\mu$ M. La liaison de la CaM à la NOS induirait un changement de conformation qui permettrait le passage des électrons des flavines vers l'hème. La liaison de l'arginine augmente la vitesse à laquelle le NADPH est oxydée comparativement à d'autres substrats tel le cytochrome c (Abu-Soud *et al.*, 1994b). Dans ces travaux, il a aussi été remarqué qu'en absence d'arginine comme accepteur d'électrons, il y avait une consommation de NADPH plus faible, ce qui est très différent des cytochromes P-450 qui n'en consomment pas en absence de substrat. Cette oxydation du NADPH non-couplée à la synthèse de NO résulte en la formation d'espèces réactives de l'oxygène, tels le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde (Mayer *et al.*, 1991). La figure 1.6, inspirée de Marletta (1994), résume le transfert d'électrons à travers la NOS.

## 1.8 Inhibiteurs de la NOS

L'implication de plusieurs cofacteurs et groupements prosthétiques dans la réaction catalysée par la NOS permet à l'enzymologiste de tenter d'inhiber cette réaction par diverses stratégies. Pour les études *in vitro*, les chélateurs du calcium comme l'EDTA et l'EGTA ont fréquemment été utilisés pour étudier le rôle du calcium dans la réaction catalysée par la

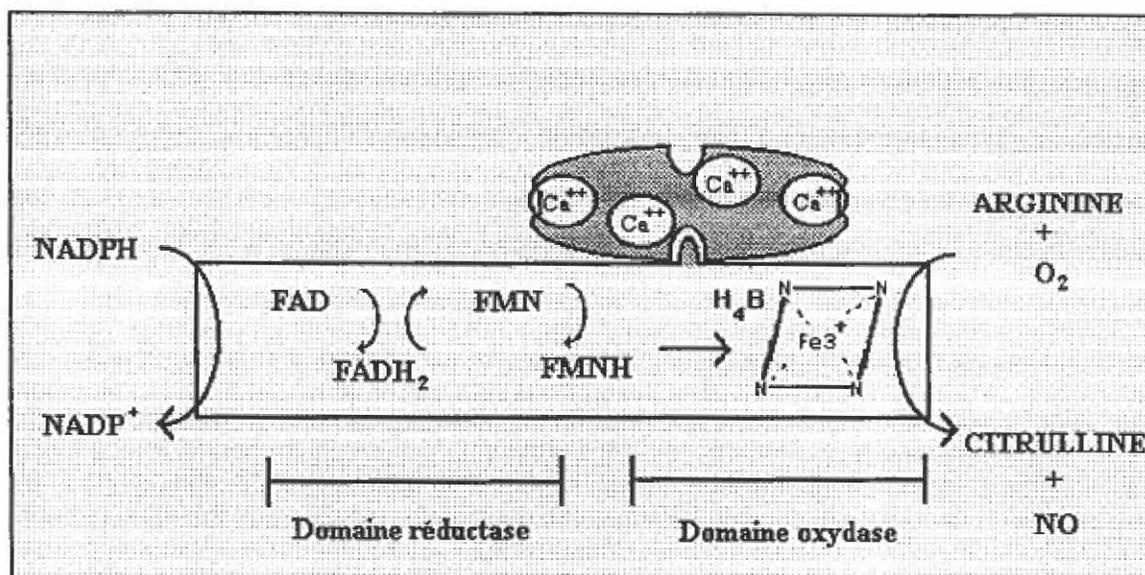


FIGURE 1.6 Représentation schématique de la NOS constitutive résumant le transfert des électrons via l'enzyme à partir du NADPH jusqu'au substrat, l'arginine. La CaM et quatre ions calcium sont liés à la NOS permettant l'interaction entre les flavines et l'hème.

NOS (par exemple Hayashi *et al.*, 1994). D'autres classes de molécules comme les antagonistes des flavoprotéines, les antagonistes de la CaM et les inhibiteurs de la synthèse de la H<sub>4</sub>B ont évidemment tous le potentiel d'inhiber la NOS. Ces molécules ont surtout été utilisées pour tenter d'expliquer les mécanismes auxquels les flavines, la CaM et la H<sub>4</sub>B participent dans la réaction NOS (Nathan, 1992). De plus, ces inhibiteurs, qui sont très utiles pour des expériences *in vitro*, sont très peu utiles pour des usages pharmacologiques et thérapeutiques *in vivo*. L'activité ubiquitaire du calcium et de la CaM à l'égard d'un bon nombre de mécanismes intracellulaires, le fait que plusieurs oxydoréductases utilisent le FAD ou le FMN et, que la H<sub>4</sub>B est impliquée dans les réactions catalysées par les hydroxylases des acides aminés neutres, ne donnent aucun potentiel aux inhibiteurs mentionnés précédemment à devenir des inhibiteurs spécifiques de la NOS.

Une autre classe de molécules capables d'inhiber les actions enzymatiques de la NOS sont les analogues de l'arginine. Une panoplie de ces molécules ont été synthétisées et elles sont toutes caractérisées par une substitution sur un des atomes d'azote guanidino de

l'arginine. Le tableau 1.4 présente les principaux analogues de l'arginine qui ont été utilisés comme inhibiteurs de la NOS. On peut noter à l'aide de ce tableau que la N<sup>ω</sup>-nitro-arginine (NNA) est un inhibiteur plus puissant de la NOS constitutive que de l'inductible. Cette caractéristique de la NNA la rend l'inhibiteur le plus utilisé envers la NOS constitutive. La N<sup>ω</sup>-monométhyl-arginine est aussi très utilisée, surtout pour son faible coût et sa bonne efficacité.

Analogues de l'arginine	Spécificité envers les NOS	
	constitutive neuronale	inductible
N <sup>ω</sup> -monométhyl-arginine (NMMA)	++	++
N <sup>ω</sup> -nitro-arginine (NNA)	++	+
N <sup>ω</sup> -amino-arginine (NAA)	++	++
N <sup>ω</sup> -éthyl-arginine	++	++
N <sup>ω</sup> -iminoéthyl-ornithine	++	-

**TABLEAU 1.4** Les analogues de l'arginine les plus fréquemment utilisés comme inhibiteur de la NOS. La spécificité envers les NOS inductibles et constitutives est aussi notée. Ce tableau est inspiré de Stuehr et Griffith (1992).

++ = un IC<sub>50</sub> de 1 à 20% de la concentration d'arginine utilisée.

+ = un IC<sub>50</sub> de 20 à 100% de la concentration d'arginine utilisée.

- = n'est pas un inhibiteur.

Le mécanisme d'action de cette classe d'inhibiteur dépend de la présence ou non du substrat, l'arginine. Lorsque l'arginine est présente dans le milieu d'incubation, ces molécules se comportent comme de purs inhibiteurs compétitifs. Par contre, en absence d'arginine, ces analogues de l'arginine sont métabolisés par la NOS par un mécanisme dépendant du NADPH et ils deviennent ainsi des inhibiteurs irréversibles. Dans ce sens, la NMMA a été très étudiée comme inhibiteur irréversible de la NOS et il a été démontré qu'elle cause la perte de l'hème de la NOS (Olken et Marletta, 1993, Olken *et al.*, 1994).

Récemment, la thiocitrulline ainsi que des thiocitrullines alkylées (3 à 4 carbones) se sont avérées des inhibiteurs puissants de la NOS inductible et constitutive (Frey *et al.*, 1994, Narayanan *et al.*, 1995). Dans ces travaux, les thiocitrullines ont été définies comme des inhibiteurs compétitifs de la NOS puisque l'ajout d'arginine lève l'inhibition.

Enfin, une question toujours sans réponse est à savoir si le NO produit par la NOS peut venir rétroinhiber la NOS vu la présence de l'hème. Des études spectrales de la NOS ont montré que le NO est bien coordonné par le groupement hème (Wang *et al.*, 1994). Cette nitrosylation de l'hème de la NOS résulte en une inhibition de l'activité enzymatique en absence de H<sub>4</sub>B ajoutée au milieu d'incubation (Griscavage *et al.*, 1994). Par contre, cette inhibition est levée par l'ajout de 50 µM de H<sub>4</sub>B. Mayer *et al.* (1995) ont montré que la H<sub>4</sub>B, en présence d'oxygène, pouvait oxyder le NO très rapidement. Donc, à partir de ces études, il est difficile d'interpréter si le NO peut inhiber la NOS. Des études plus poussées seront nécessaires. L'autre produit de la NOS, la citrulline, n'a pas encore été rapportée comme ayant un potentiel à inhiber la NOS.

### **1.9 Distribution tissulaire et cellulaire de la NOS**

La purification de la NOS neuronale a permis la génération d'anticorps polyclonaux et la réalisation d'études immuno-histochimiques. Bredt *et al.* (1990) ont montré que la NOS constitutive se retrouve seulement dans des populations discrètes de neurones de rat à l'aide de cette technique. Entre autre, le marquage immunologique a fait ressortir la présence de la NOS dans le cortex cérébral, le corpus striatum, le cervelet et quelques petites régions localisées comme le colliculi supérieur, le colliculi inférieur, ainsi que les îlots de Callejae. Dans le cervelet, la NOS se localisait seulement dans les cellules en panier et elle était absente des cellules de Purkinje où on retrouve une forte synthèse de GMPc. Par la même technique, Dun *et al.* (1994) ont étudié la distribution de la NOS dans les neurones et les fibres nerveuses de la protubérance et du bulbe rachidien. Ils ont noté que le tegmentum de la protubérance était riche en NOS, alors que les noyaux de raphé de la protubérance en

étaient faiblement colorés. À l'intérieur du bulbe rachidien, les noyaux du faisceau solitaire contenaient le plus de marquage pour la NOS. La NOS a de plus été localisée dans les neurones pyramidaux CA1 de l'hippocampe de rat. La NOS a aussi été localisée immunohistochimiquement dans le cerveau humain de façon très détaillée (Egberongbe *et al.*, 1994). Les résultats sont similaires à ceux obtenus chez le rat. Dans le cerveau de chat, aucune étude ne rapporte la distribution histochimique de la NOS, mais elle fut localisée dans les axones rejoignant la carotide de chat (Wangz *et al.*, 1994).

Une deuxième méthode pour localiser la NOS est l'étude de l'activité NADPH-diaphorase. Cette méthode consiste à incuber des tranches de tissus en présence de NADPH et de bleunitro tetrazolium. Les neurones contenant une activité NADPH-diaphorase transformeront le bleunitro tetrazolium en un dérivé bleu en présence de NADPH même après fixation du tissu. Ces neurones sont alors visibles par microscopie puisqu'ils possèdent une coloration bleu. Dawson *et al.* (1991) ont affirmé que la coloration due à l'activité NADPH diaphorase et la localisation histochimique de la NOS étaient identiques. À ce moment, il est pertinent de présenter les points faibles de cette méthode. Tout d'abord, il existe une multitude de protéines qui peuvent oxyder le NADPH. Il a été rapporté que la fixation du cerveau à l'aide de la formaldéhyde cause la perte de la plupart des activités NADPH-diaphorase, mais pas celle de la NOS (Chayen *et al.*, 1994). Ces mêmes auteurs suggèrent d'être prudent avec cette méthode de coloration liée à l'activité NADPH-diaphorase puisque des neurones ne contenant pas d'activité NOS peuvent être aussi colorés.

Murphy *et al.* (1993) de même que Wallace et Bisland (1994) ont montré à l'aide de cette technique que suite à des lésions sur le cerveau de souris, les astrocytes ont une forte activité NADPH-diaphorase qui est due à la présence de la NOS inductible dans ces cellules. Bien avant que l'activité NADPH-diaphorase ne soit reliée à la présence de la NOS, l'équipe de McGeer ont étudié en détail la distribution de l'activité de la NADPH-diaphorase dans le cerveau de chat: ils ont trouvé que cette activité se retrouvait dans la substance blanche (Mizukawa *et al.*, 1988 a), le cortex frontal, l'amygdale et le noyau caudé (Mizukawa *et al.*,

1988 b). Dans une étude plus poussée, l'activité NADPH-diaphorase a été localisée dans l'hypothalamus, le mésencéphale, la protubérance ainsi que plusieurs régions cérébrales plus discrètes (Mizukawa *et al.*, 1989).

Par une mesure directe de l'activité NOS, Forstermann *et al.* (1990) ont montré que l'activité NOS était la plus élevée dans le cervelet et qu'elle décroissait dans les autres structures selon l'ordre suivant: hypothalamus > cerveau moyen > striatum > hippocampe > cortex frontal. Le point faible de ce travail est qu'on ne mesurait pas la transformation de l'arginine en citrulline, mais plutôt la formation de nitrites et de nitrates ce qui peut biaiser les résultats. Néanmoins, cette étude a permis de comparer l'activité NOS mesurée directement dans la structure anatomique, puis de la comparer avec les résultats obtenus par marquage immuno-histochimique et ceux de l'activité NADPH-diaphorase. De plus ces résultats permettent de confirmer que l'activité NOS est bien présente dans ces structures. Aucune autre étude de ce genre n'est rapportée pour d'autres espèces.

### **1.10 Les fonctions physiologiques du NO**

Même si l'étude des rôles physiologiques du NO ne fait pas partie des travaux effectués dans le cadre de ce mémoire, il est quand même important de les résumer brièvement.

#### **1.10.1 Les cibles moléculaires du NO**

La liaison d'un messager chimique à son récepteur est un mécanisme classique en biologie. Cette liaison est normalement très spécifique. Le NO est un messager chimique très particulier. Sa nature gazeuse lui permet de diffuser à travers les membranes. Les récepteurs du NO, ou encore mieux les cibles du NO, sont très variés. Toutes les molécules contenant un atome de fer peuvent être considérées comme un récepteur du NO. La guanylyl cyclase soluble contient un groupement hème qui peut être nitrosylé par le NO, ce qui résulte

en une augmentation de la synthèse de GMPc (Bredt et Snyder, 1989). Le NO peut aussi attaquer la ferritine, une protéine qui accumule le fer, et causer ainsi la libération du fer (Nathan, 1992).

Il a aussi été démontré que le NO peut interagir avec les groupements soufrés pour former des S-nitrosothiols. Les macromolécules contenant des S-nitrosothiols pourraient être un réservoir important de NO bioactif, puisque cette liaison est réversible. Il a été rapporté que la S-nitrosylation de certaines enzymes joue un rôle dans la régulation de leurs activités enzymatiques (McCall et Vallance, 1992).

### 1.10.2 Le NO dans le cerveau

Il a été montré que le NO est le médiateur de l'augmentation de GMPc liée au glutamate dans le cervelet. La liaison du glutamate (et d'autres agonistes) à la sous-classe de récepteur NMDA cause l'ouverture de canaux calciques. L'augmentation intracellulaire de la concentration de calcium active la synthèse de NO et ce NO diffuse jusqu'aux cellules en panier et active la guanylyl cyclase (Bredt et Snyder, 1989). Bien que le GMPc soit un messager secondaire bien connu des biologistes, ses actions biologiques dans le système nerveux ne sont pas très bien connues, surtout lorsque comparé à l'AMPc qui est un messager secondaire semblable au GMPc (Garthwaite *et al.*, 1989).

Un rôle a été suggéré comme messager rétrograde (O'Dell *et al.*, 1991) dans la plasticité synaptique des neurones. À cette plasticité synaptique sont associés les mécanismes de potentialisation (LTP) et de dépression à long terme (LTD) (Schuman et Madison, 1991). La LTP est impliquée dans les mécanismes d'actions reliés à la mémoire. Elle prend place particulièrement dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Dinerman *et al.*, 1994). La LTP est régulée principalement via les récepteurs NMDA et c'est à partir de cette observation que les biologistes tentent d'impliquer la NOS dans ce mécanisme (McNaughton *et al.*, 1994). Tous les travaux entourant la LTP et la LTD sont très confus car les résultats sont très

contradictoires. Le réputé journal "Trends in neurosciences" a d'ailleurs pris position en mettant en gros titre sur une page couverture : "The answer is NO!" (La réponse est non). À l'aide d'un jeu de mots, il suggérait donc que le NO ne participe pas à la LTP.

La présence de la NOS dans des fibres nerveuses innervant les glandes surrénales a suggéré un rôle possible pour le NO dans la régulation de la sécrétion des catécholamines par les surrénales (Bredt *et al.*, 1990; Levi et Raiteri, 1993). La NOS des surrénales n'a pas encore été caractérisée biochimiquement et elle n'a pas été purifiée. Palacio *et al.* (1989) ont démontré une activité de type NOS dans les surrénales, mais ils ne l'ont pas caractérisée d'avantage.

### **1.10.3 La NOS dans les cellules endothéliales**

Le NO synthétisé par les cellules endothéliales, suite à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, diffuse jusqu'à la musculature lisse qui entoure l'endothélium. Une fois rendu dans ces cellules musculaires, le NO se lie au groupement hème de la guanylyl cyclase ce qui active la synthèse de GMPc. L'augmentation du second messenger GMPc est responsable de la relaxation des cellules musculaires ce qui résulte en une réduction du tonus de l'endothélium vasculaire. Ce rôle du NO dans le maintien du tonus vasculaire a été décrit en détail par Ignarro *et al.* (1990).

### **1.10.4. Le NO sécrété par certaines cellules appartenant au système immunitaire**

Les macrophages et les neutrophiles n'expriment pas d'activité NOS en condition normale. Par contre, lorsque des lipopolysaccharides bactériens (LPS), des cytokines (entre autre l'interleukine-1 $\beta$ ), l'interféron-gamma et le facteur de nécrose des tumeurs (TNF) se retrouvent dans la circulation sanguine, séparément ou en combinaison, la NOS inductible est exprimée, par les macrophages et les neutrophiles. Ces cellules vont donc synthétiser une forte quantité de NO pour tuer les bactéries et les cellules tumorales. Le NO peut inhiber la

ribonucléotide réductase en se liant à son atome de fer. Il en résulte alors l'inhibition de la synthèse d'ADN dans ces bactéries ou cellules tumorales (Nathan, 1992).

La grande synthèse de NO par les macrophages peut aussi causer des complications. La diffusion du NO jusqu'au muscle lisse de l'endothélium cause un état d'hypotension. Cette pathologie peut être traitée par l'administration d'inhibiteur de la NOS (Ingbarro *et al.*, 1990). La nature radicalaire du NO lui donne aussi la possibilité de réagir avec une panoplie de molécules non spécifiques. Le NO peut entre autres peroxyder les lipides générant ainsi des substances réactives de l'oxygène. La création de mutations sur l'ADN a aussi été démontrée (Wink *et al.*, 1991). Le NO peut aussi réagir avec l'anion superoxyde et générer le peroxyde d'azote, l'oxydant le plus puissant des espèces réactives de l'oxygène (Freeman, 1994).

### 1.11 Objectifs de la recherche

À partir des connaissances actuelles sur la NOS que nous venons de décrire, on remarque que la NOS n'est pas encore bien caractérisée relativement à ses cofacteurs et ses substrats. L'objectif général de ce mémoire est donc d'étudier biochimiquement la NOS neuronale chez le chat, une espèce animale encore non-étudiée vis-à-vis la NOS. Le cerveau de chat possède une anatomie qui ressemble beaucoup plus au cerveau humain que celui de rat, le rendant particulièrement intéressant. Pour ce faire nous utiliserons un milieu semi-purifié. De plus, les études de caractérisation de la NOS effectuées chez le rat nous semblaient incomplètes et nous allons donc aussi étudier de façon systématique la NOS chez cette espèce. Les objectifs spécifiques de la caractérisation de la NOS chez ces deux espèces animales sont:

A) d'étudier les besoins de la NOS en calcium, calmoduline, NADPH, H<sub>4</sub>B, FAD, FMN et en arginine.

B) d'estimer la constante d'affinité de Michaelis ( $K_m$ ) pour l'arginine, ainsi que la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) de la NOS dans le milieu enzymatique semi-purifié.

C) d'estimer les constantes d'inhibition ( $K_i$ ) de deux inhibiteurs compétitifs de la NOS dans le milieu enzymatique semi-purifié.

D) d'étudier la distribution de l'activité enzymatique de la NOS dans le cerveau de rat et de chat au niveau de diverses structures, soit chez le rat: le cervelet, le tronc cérébral, le télencéphale, l'hypothalamus et le cortex frontal et chez le chat: le cervelet, le bulbe rachidien, le mésencéphale, les noyaux de raphé du mésencéphale, la protubérance, les noyaux de raphé de la protubérance, le thalamus, l'hypothalamus, le striatum, l'hippocampe et le cortex frontal.

Un autre objectif spécifique pour ce mémoire est de faire une étude biochimique préliminaire de la NOS présente dans les glandes surrénales de rats. Ces travaux ne sont pas encore détaillés dans la littérature et devraient permettre de comprendre les mécanismes de régulation de l'activité NOS dans les surrénales. Le NO produit par cette NOS pourrait être un régulateur de la libération des catécholamines et ainsi jouer un rôle capital dans la physiologie reliée à ces hormones.

Finalement, le dernier objectif est de mesurer l'activité spécifique de la NOS, à l'aide de la technique optimisée résultant des travaux de ce mémoire, dans le cerveau de rats exposés à des champs électromagnétiques (radiofréquences, 9.3 et 0.915 GHz) de façon aiguë ou chronique, et d'en comparer l'activité à celle de rats témoins.

Les champs électromagnétiques sont plus correctement appelés ondes ou rayonnement électromagnétiques. Les champs électromagnétiques discutés dans nos travaux sont des ondes dont la fréquence correspond à celle des micro-ondes dans le spectre d'énergie. Ces ondes n'ont pas d'effet thermique sur les rats pendant l'exposition. L'absorption de ces ondes

par les tissus biologiques dépend entre autres de la fréquence ainsi que de la constitution diélectrique du tissu biologique (Mortek, 1995).

L'exposition des rats aux champs électromagnétiques a été conduite par les équipes des Docteurs Andrée G. Roberge de l'INRS-Santé et Gilles Y. Deslisle de l'INRS-Télécommunication. Leur hypothèse est basée sur le fait qu'il a été démontré que des champs électromagnétiques (micro-ondes) appliqués sur des cellules du cerveau causent une augmentation de la perméabilité membranaire à l'ion calcium, résultant en une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Bernhardt, 1992). Il a aussi été démontré *in vitro* que des concentrations élevées de calcium inhibent l'activité enzymatique de la NOS après un certain temps (Mittal et Jidav, 1994). Donc, leur hypothèse suggère que l'activité de la NOS mesurée dans le cerveau de rats exposés aux champs électromagnétiques pourrait être plus faible que celle mesurée dans les cerveaux des rats témoins en raison d'un effet médié par le calcium.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Matériel

Les réactifs suivants proviennent de chez Sigma (St-Louis, MO) : la L-[2,3 <sup>3</sup>H]-arginine (30-60 Ci/mmol), le L-dithiothréitol, la L-citrulline, l'EDTA, l'EGTA, le TRIS, le POPOP, le FAD et le FMN. La calmoduline bovine ultra pure, le NADPH (réduit), le W-7, la L-arginine, et le tampon biologique HEPES proviennent de chez Calbiochem (San Diego, CA). La résine échangeuse d'ions AG50 WX8 200-400 mesh et le réactif de Bradford ont été achetés de la compagnie Bio-Rad (Ontario Canada). La L-[ureido <sup>14</sup>C] citrulline provient de NEN/DuPont et la L-5-6-7-8, tétrahydrobioptérine provient de Dr. B. Schirks Laboratories (Jona, Suisse). Le chlorure de calcium, le Triton X-100, le PPO, et le toluène proviennent quant à eux de la compagnie Biopharm (Québec, Canada).

#### 2.2 Méthodologie chez l'animal

##### 2.2.1 Chats

Des chats ont été utilisés pour caractériser la NOS ainsi que pour déterminer l'activité enzymatique de cette dernière dans une dizaine de structures neuronales. Pour les expériences de caractérisation, trois chats ont été utilisés, alors que l'étude de la distribution de la NOSn dans le cerveau comportait douze chats. Les chats étaient adultes, de souche génétique non-contrôlée, les deux sexes étant présents, et, ils pesaient  $2.8 \pm 0.2$  kg. Ils ont eu une période d'adaptation de trois semaines aux conditions environnementales de l'animalerie et un vétérinaire les a jugés en bonne santé. Les chats étaient gardés à l'animalerie dans des cages individuelles sous des conditions contrôlées de température

(21°C) et d'humidité (55%), avec de la lumière fluorescente et de la musique légère de 6:00 à 18:00h. Ils étaient nourris par une diète supplémentée en caséine comme source principale de protéines et ils avaient de l'eau ad libitum. Les chats ont tous été guillotines, la même journée entre 8h et 10h am, sans anesthésie pour éviter des interférences pharmacologiques au niveau du cerveau. Douze cerveaux ont été rapidement sortis de la boîte crânienne, puis disséqués sur une plaque en aluminium préalablement refroidie et les structures disséquées ont par la suite été congelées à -80°C. Trois cerveaux ont été prélevés et immédiatement congelés à -80°C.

### **2.2.2 Rats**

Des rats ont été utilisés pour caractériser la NOSn et pour étudier les effets des champs électromagnétiques sur la NOSn. Ces rats ont été maintenus dans des conditions environnementales similaires à celles utilisées pour les chats à l'exception qu'ils étaient logés six par cage et nourris avec une diète Purina 5012. Ils ont été sacrifiés à l'aide d'une guillotine et les cerveaux prélevés ont été congelés à -80°C. Les cerveaux ont été décongelés pour être disséqués.

## **2.3 Dissection des cerveaux**

Cette section est inspirée de Glowinski et Iversen (1963) et de Bouchard (1982). Le cerveau est d'abord disséqué en trois sections: la section A qui est le rhombencéphale, la section B qui correspond au cerveau moyen, et la section C qui correspond au cortex frontal (fig.2.1 a). De la section A deux structures sont isolées, soit le cervelet et le tronc cérébral.

### **Cervelet**

Le cervelet est une imposante structure qui recouvre le tronc cérébral. Pour l'isoler, il faut seulement le séparer doucement du tronc cérébral. Le cortex et la substance blanche du cervelet sont ainsi prélevés.

### **Tronc cérébral**

Une fois le cervelet séparé du rhombencéphale, le tronc cérébral est isolé de la section A11 à A3 (fig 2.1 b). Pour douze cerveaux de chat, le tronc cérébral a été disséqué en cinq structures supplémentaires : mésencéphale, noyaux de raphé du mésencéphale, protubérance, noyaux de raphé de la protubérance et le bulbe rachidien.

### **Mésencéphale et noyaux de raphé du mésencéphale**

Le mésencéphale est isolé en faisant une coupe entre les section A11 et A6 (fig 2.1 b). Les noyaux de raphé du mésencéphale sont récupérés en faisant une coupe latérale de 1 mm de part et d'autre de la ligne médiane du mésencéphale.

### **Protubérance et noyaux de raphé de la protubérance**

La protubérance se situe entre les sections A6 et A3 (fig 2.1 b). Les noyaux de raphé sont isolés en faisant une coupe latérale de 1 mm de part et d'autre de la ligne médiane de la protubérance.

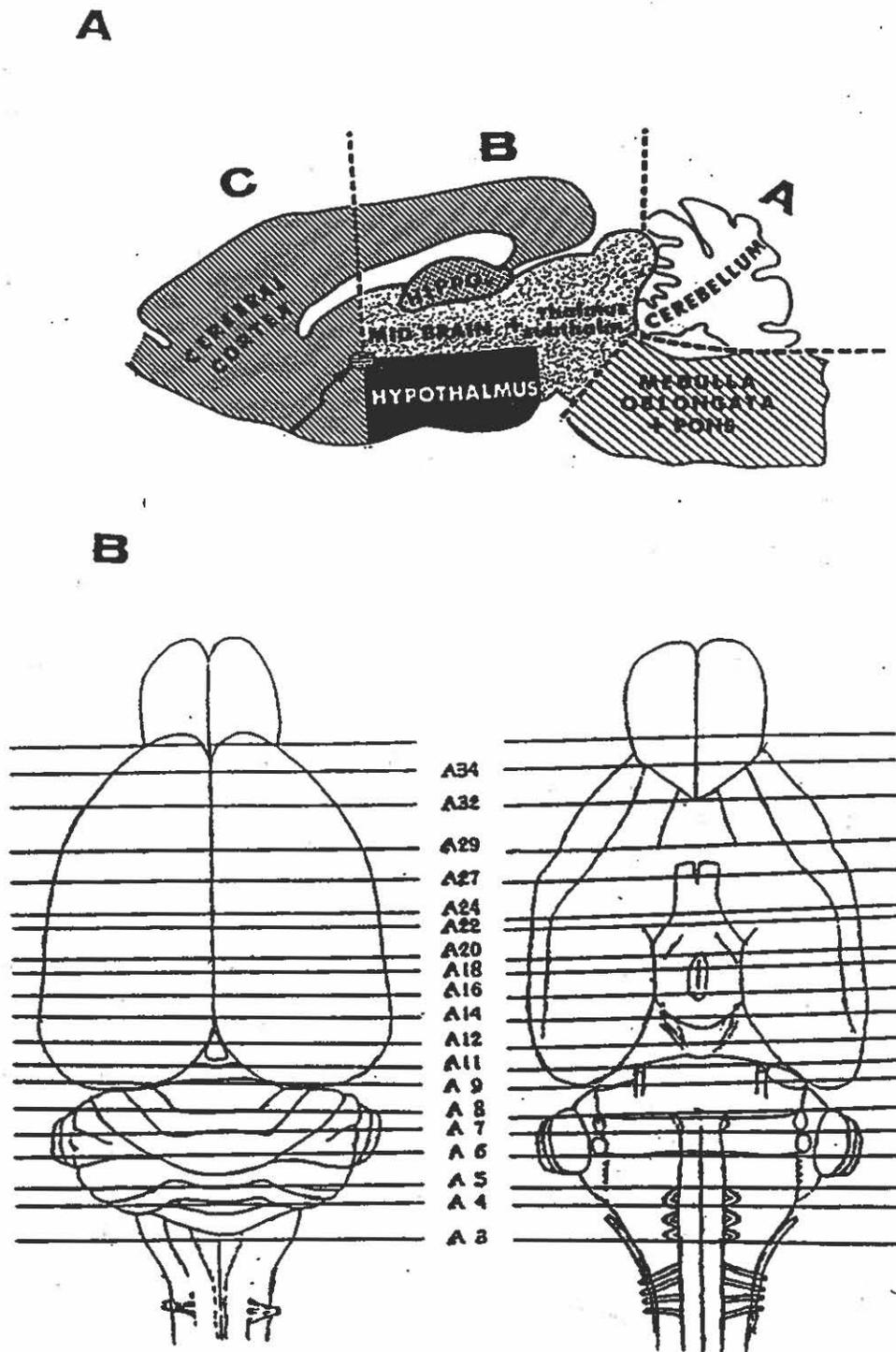
### **Bulbe rachidien**

Le bulbe rachidien est isolé par une coupe à la section A3 (fig 2.1 b). La limite inférieure est la base cervicale de la moelle.

### **Cortex frontal**

Le cortex frontal est prélevé en faisant une coupe au niveau A34 (fig 2.1 b) qui correspond à la section C de la fig 2.1 a). Les tubercules olfactifs sont enlevés du cortex frontal.

À partir de la section B, le striatum, l'hypothalamus, le thalamus et l'hippocampe sont isolés.



**FIGURE 2.1** A) Représentation schématique de la dissection d'un cerveau. Les lignes pointillées indiquent l'étape initiale pour disséquer le cerveau en trois sections, soit A, B et C (Tiré de Glowinski et Iversen, 1966). B) Vue schématique de la surface dorsale et ventrale du cerveau. Les repères anatomiques utilisés lors de la dissection sont indiqués par des chiffres allant de A34 à A3 (Tiré de Blais, 1991).

### **Striatum**

Le striatum correspond au tissu isolé entre la section A34 et A24 (fig 2.1 b) par une coupe longeant le corps calleux, les ventricules latéraux et autour du claustrum. À l'intérieur de ce tissu, on retrouve notamment le noyau caudé, le globus pallidus, le putamen et le claustrum.

### **Hypothalamus et thalamus**

Le diencephale est tout d'abord prélevé en faisant une coupe entre les sections A22 et A14 (fig 2.1 b). L'hypothalamus est par la suite isolé en faisant une coupe latérale le long de la capsule interne et une coupe supérieure au niveau du lemnicus médian. Pour le thalamus, la coupe latérale se fait toujours en longeant la capsule interne à partir du lemnicus médian et la coupe supérieure se fait au niveau des ventricules.

### **Hippocampe**

L'hippocampe est disséquée, à la section A14 (fig 2.1 b), dans le repli du lobe temporal au niveau du mésencéphale.

## **2.4 Préparation de la fraction cytosolique contenant la NOS**

L'activité enzymatique de la NOS des neurones se retrouve dans la fraction cytosolique. L'objectif est donc d'isoler cette fraction de façon relativement pure et de l'utiliser comme source de NOS. Pour ce faire, le tissu biologique est homogénéisé, à l'aide d'un homogénéisateur potter-Elvehjem, dans 10 volumes de tampon HEPES 20 mM pH 7.4 contenant aussi du sucrose à 0.32 M, de l'EDTA à 0.4 mM et du DTT à 1 mM. Le rôle du sucrose est de créer un tampon isotonique empêchant ainsi la rupture des organelles (noyau, mitochondries et lysosomes en particulier) minimisant du même coup le relargage d'enzymes protéolytiques dans l'homogénat. L'EDTA inhibe les métallo-protéases en chélatant les ions divalents, en particulier le calcium et le magnésium. Le DTT est un agent reducteur qui permet une protection supplémentaire de l'enzyme d'intérêt. L'homogénat repose 30 minutes

à 4°C et il est ensuite centrifugé pendant 20 minutes à 20 000 g à 4°C à l'aide une centrifugeuse Sorvall RC 5C équipée d'un rotor SS-34. Le surnageant est ensuite passé sur une colonne contenant 2 millilitres de résine AG50 WX-8 200-400 mesh équilibrée sous la forme Na<sup>+</sup> pour enlever l'arginine endogène. Le surnageant ci-après est appelé "surnageant NOS", et est ensuite aliquoté en fraction de 1 millilitre à -20 °C sans perte apparente d'activité pour au moins 1 an.

## 2.5 Mesure de l'activité enzymatique de la NOS

L'activité de la NOS est déterminée en mesurant la formation de [<sup>3</sup>H]-citrulline à partir du substrat, l'[\*<sup>3</sup>H]-arginine en se basant sur la méthode de Bredt et Snyder (1990). La sensibilité de cette méthode est proportionnelle à la disponibilité de l'[\*<sup>3</sup>H]-arginine. Pour que cette technique soit utilisée de façon quantitative, il faut absolument que l'arginine endogène soit enlevée des échantillons à analyser car les concentrations d'arginine froide et d'arginine marquée doivent être connues exactement de façon à établir l'activité spécifique de l'[\*<sup>3</sup>H]-arginine pour calculer le taux de production de citrulline.

Les réactifs sont préparés dans du tampon HEPES à 20 mM. Le milieu d'incubation typique est composé de:

- \*10 µL de CaCl<sub>2</sub> 18.9 mM
- \*10 µL d'arginine 8.4 mM
- \*10 µL d'[\*<sup>3</sup>H]-arginine (400 000 dpm)
- \*10 µM de NADPH 50.4 µM
- \*10 µL de FAD 420 µM
- \*10 µL de FMN 420 µM
- \*10 µL de H<sub>4</sub>B 1.05 mM
- \*50 µL de HEPES 20 mM
- \*300 µL de surnageant NOS

La réaction prend place dans un microtube de type "Eppendorf" de 1.5 mL et elle est initiée par l'ajout de 300  $\mu$ L de surnageant NOS. Donc, le milieu d'incubation final est composé de: 400  $\mu$ g de protéines cytosolique, 200  $\mu$ M arginine froide ainsi que 0.18  $\mu$ Ci de [ $^3$ H]-arginine (entre 2-4 pmol selon le lot, soit une dilution de l'arginine chaude d'environ 1:14 000), 0.45 mM de calcium, 1.2 mM NADPH, 10  $\mu$ M FAD et FMN et 25  $\mu$ M de  $H_4B$  pour un volume final de 420  $\mu$ L. Chaque mesure est effectuée en triplicata.

Une fois le milieu d'incubation constitué, les tubes sont agités et placés à incubation dans un bain agitateur Fisher, réglé à 37°C, pendant 60 minutes. La réaction est arrêtée par 5  $\mu$ L d'une solution d'acide trichloroacétique 6 N. Deux minutes plus tard, les échantillons sont neutralisés par 250  $\mu$ L d'une solution de TRIS•HCl 1 M à pH 7.5, et par la suite ils sont centrifugés à 20 000 g pendant 5 minutes à l'aide d'une mini-centrifugeuse de table Baxter à la température de la pièce. La prochaine étape est la séparation de la [ $^3$ H]-citrulline formée de l' [ $^3$ H]-arginine par chromatographie échangeuse d'ions, tel que décrit à la section 2.5.2.

### **2.5.1 Caractérisation de la NOS de chat et de rat**

On a fait varier la concentration des divers constituants du milieu d'incubation en vue de caractériser leurs actions sur l'activité de la NOS. La quantité de protéines contenue dans le surnageant NOS a été étudiée pour des valeurs allant de 0.025 à 2 mg de protéines. L'activité de la NOS a aussi été testée en fonction de diverses valeurs de pH, allant de 6.6 à 8.0. Pour ce faire, des tranches de tissu ayant approximativement tous le même poids ont été homogénéisées dans du tampon HEPES ajusté à diverses valeurs de pH. L'activité de la NOS a par la suite été mesurée dans chacun des surnageants NOS.

Le NADPH a été étudié, quant à lui, en faisant varier sa concentration dans le milieu d'incubation de 0 à 2.8 mM. Les concentrations de calcium ajoutées au milieu d'incubation allaient de 0 à 1.4 mM et celles de la CaM de 0 à 60  $\mu$ M. Différentes concentrations d'EDTA et d'EGTA allant de 0 à 2 mM ont été ajoutées au milieu d'incubation, et ce en présence et

en absence de calcium ajouté. Diverses concentrations, de 0 à 1 mM, de l'antagoniste de la CaM W-7 ont été testées sur l'activité de la NOS. Il est pertinent de noter que le W-7 a été solubilisé dans un millilitre d'éthanol absolu et un millilitre de tampon HEPES à 20 mM.

Pour mesurer les paramètres cinétiques de la NOS, la concentration d'arginine présente dans le milieu d'incubation a été étudiée entre 0 et 225  $\mu\text{M}$ . Deux inhibiteurs compétitifs de la NOS, la  $\text{N}^{\omega}$ -monométhyle-arginine et la  $\text{N}^{\omega}$ -nitro-arginine, ont été ajoutés au milieu d'incubation à des concentrations allant de 0 à 500  $\mu\text{M}$ . La tétrahydrobioptérine a été ajoutée au milieu d'incubation pour des concentrations allant de 0 à 100  $\mu\text{M}$  et le FAD et le FMN, de 0 à 50  $\mu\text{M}$ .

### 2.5.2 Séparation de la citrulline et de l'arginine

Les acides aminés arginine et citrulline, à pH neutre, se retrouvent sous la forme ionisée et possèdent des densités de charges différentes. La citrulline ne possède pas de charge nette (sa chaîne latérale est neutre) alors que l'arginine possède une charge nette qui est positive (sa chaîne latérale est chargée positivement). Donc en utilisant une résine chargée négativement, un échangeur de cation, on lie l'arginine et on laisse passer la citrulline. La résine utilisée est la Dowex AG50 WX-8 200-400 mesh de Bio-Rad. La matrice de cette résine est le styrène, contenant du divinylbenzène à 8% auquel sont greffés des groupements d'acides sulfoniques ( $\text{SO}_3^-$ ). La résine est préalablement conditionnée sous la forme  $\text{H}^+$  et par la suite conservée au frigo. La résine, de 0.7 à 1 millilitre, est chargée dans des micros colonnes Bio-Rad de 10 millilitres et elle est conditionnée sous la forme  $\text{Na}^+$  en la lavant avec 1 millilitre de  $\text{NaOH}$  2 M et en la rinçant avec de l'eau (18 millilitres) jusqu'à ce que le pH soit voisin de 7.5.

L'échantillon à analyser est déposé sur la colonne et l'éluat est récupéré directement dans un vial à scintillation. La citrulline est éluée par un mL d'eau qui est aussi récupéré dans le vial à scintillation. Dix millilitres du liquide à scintillation décrit ci-après sont ajoutés aux

vials et la radioactivité dans les échantillons est alors comptée à l'aide d'un compteur à scintillation LKB. Le liquide à scintillation est composé de: 2.2 litres de toluène de la qualité "scintillation", 18g de PPO comme fluorochrome primaire, 0.354g de POPOP comme fluorochrome secondaire ainsi que d'un litre de Triton X-100 pour solubiliser l'échantillon aqueux. Le compteur à scintillation a été calibré pour tenir compte de l'efficacité de comptage, du "quenching" et du type de vials utilisés (plastique ou verre). La courbe de quench a été construite en mesurant la radioactivité dans des échantillons témoins dans lesquels on a ajouté différentes concentrations de tétrachlorure de carbone. Les résultats obtenus à la sortie du compteur à scintillation étaient sous la forme de désintégrations par minute (dpm).

Cette méthode de séparation dépend du pH et de la force ionique de l'échantillon à analyser. Des étalons permettant de vérifier le pourcentage de récupération de la citrulline et la liaison de l'arginine doivent être testés pour chaque expérience. De plus, l' $[^3\text{H}]$ -arginine possède un certain pourcentage d'impuretés radioactives (2 à 4% selon le lot), qui constitue un bruit de fond qui doit être quantifié et soustrait des comptes radioactifs des échantillons. Ce bruit de fond augmente avec le temps, particulièrement lorsque l' $[^3\text{H}]$  arginine est diluée dans le tampon. Les étalons internes sont préparés de la même façon que les échantillons à l'exception que le surnageant NOS est bouilli. Le premier standard contient 200  $\mu\text{M}$  (400 000 dpm) d'arginine et le deuxième 30  $\mu\text{M}$  (10 000 dpm) de citrulline. Ces étalons sont passés sur les colonnes comme les échantillons. Les deux standards externes contiennent respectivement de l' $[^3\text{H}]$ -arginine (400 000 dpm) ou de la  $[^{14}\text{C}]$ -citrulline (10 000 dpm) seule. Le bruit de fond relié à l' $[^3\text{H}]$ -arginine est de 6 000 dpm (10 000 dpm après 6 mois) et la citrulline est récupérée avec une efficacité de 95 et 100%.

## **2.6 Exposition des rats aux radiofréquences**

Un montage expérimental a été construit par l'équipe du Dr. Gilles Delilse de l'INRS-Télécommunications pour examiner les effets athermiques des champs électromagnétiques

chez le rat. Dans le cadre de ce mémoire, l'activité spécifique de la NOS fut étudiée en regard de l'exposition aux champs magnétiques de hautes fréquences. Le système d'exposition a été décrit en détail dans la thèse de doctorat de Mortek (1995). Brièvement, voici la description des principales composantes du système d'exposition:

### **Sources génératrices de RF**

La première source utilisée est une source sinusoïdale à magnétron de 9.3 GHz (8.8-10 GHz) (Radio Research International) dont la puissance maximale varie entre 150 et 225 W. Pour ce qui est de la deuxième source, elle émet des fréquences de 0.915 GHz. Ces sources sont reliées à une antenne à cornet pyramidale (Lab-volt), qui émet les RF, et qui est installée sur le dessus de la chambre d'exposition.

### **Chambre d'exposition**

La chambre d'exposition est une chambre de Faraday (3.12 x 2.45 x 2.10 m) à l'intérieur de laquelle une chambre anéchoïque (1.2 x 1.2 x 1.4 m) a été montée, tel qu'illustré à la figure 2.2. Les parois de ces compartiments sont recouvertes de matériau absorbant empêchant la réflexion des ondes électromagnétiques. Les rats sont placés dans des cages de restrictions à l'intérieur de la chambre d'exposition. À noter que ces cages n'immobilisent pas complètement les rats, car ils ont la possibilité de se retourner sur eux-mêmes. Ces cages sont formées principalement de polyméthyl méthacrylate, un matériel causant un minimum de perturbation des ondes électromagnétiques. Les animaux sont disposés à l'intérieur de la chambre anéchoïque comme décrit par la figure 2.3 et ils sont séparés par une distance de trois longueurs d'ondes, minimisant ainsi toutes interactions ou réflexions des champs électromagnétiques causées par les individus. La chambre anéchoïque est installée à une distance de 1.55 m de l'antenne.

## 2.7 Conditions expérimentales de l'exposition aux champs électromagnétiques

Les conditions de température et d'humidité à l'intérieur de la cage Faraday, même si non contrôlées, étaient respectivement  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  et  $22 \pm 2.5\%$ . De plus, la cage Faraday est équipée d'un système de ventilation qui assure au moins vingt changements d'air par heure, ainsi que d'un système d'éclairage de 120 W. L'exposition des animaux a été faite à deux fréquences, soit 9.3 GHz et 0.915 GHz, et dans les deux cas à une densité de puissance de  $0.75 \text{ mW/m}^2$ . La densité de puissance a été mesurée partout à l'intérieur de la cage par des méthodes calorimétriques et il a été démontré que la variation était de moins que 10%.

## 2.8 Types d'expositions

**Aiguë :** L'exposition aiguë ne comportait qu'une seule séance d'exposition aux champs électromagnétiques d'une durée de trois heures. Un groupe de six rats identifiés groupe aiguë AM était exposé le matin, de 8 h-11 h et un autre groupe de six rats (aiguë PM) était exposé l'après-midi, de 13 h-16 h. Les animaux ont été sacrifiés dans l'heure suivant l'exposition, comme décrit à la section 2.2.2).

**Chronique :** L'exposition chronique s'étendait sur 5 séances d'exposition journalières consécutives. Comme pour l'exposition aiguë, il y avait un groupe de 6 rats exposé le matin (chronique AM) et un autre exposé l'après-midi (chronique PM). Les animaux ont été sacrifiés dans l'heure suivant la dernière exposition.

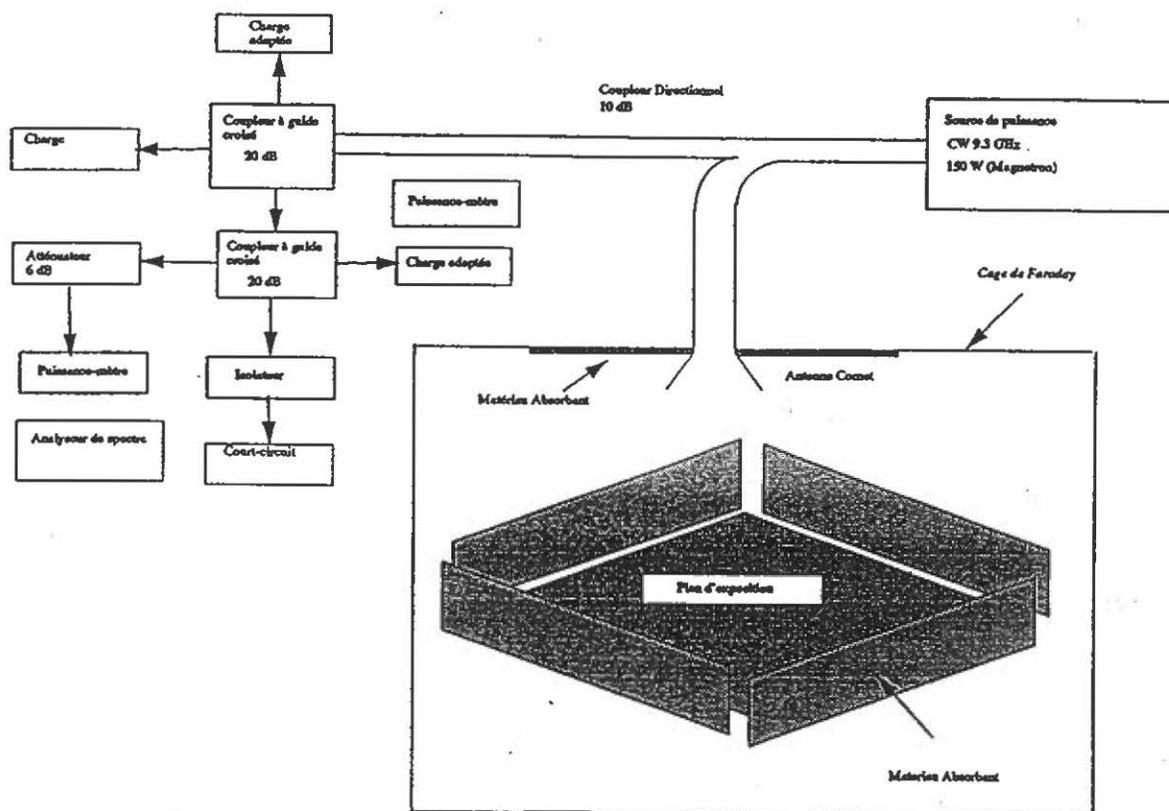
Pour les deux types d'expositions, il y avait aussi deux groupes de rats témoins: témoin et sham. Le groupe témoin était formé de rats maintenus à l'écart dans l'animalerie et le groupe sham était constitué de rats manipulés de la même manière que les rats exposés, à l'exception qu'ils ne recevaient pas le rayonnement électromagnétique. Pour les calculs de l'activité NOS, ces deux groupes ont été confondus lors du calcul de la moyenne puisqu'aucune différence statistique n'était notable.

## **2.9 Dosage des protéines**

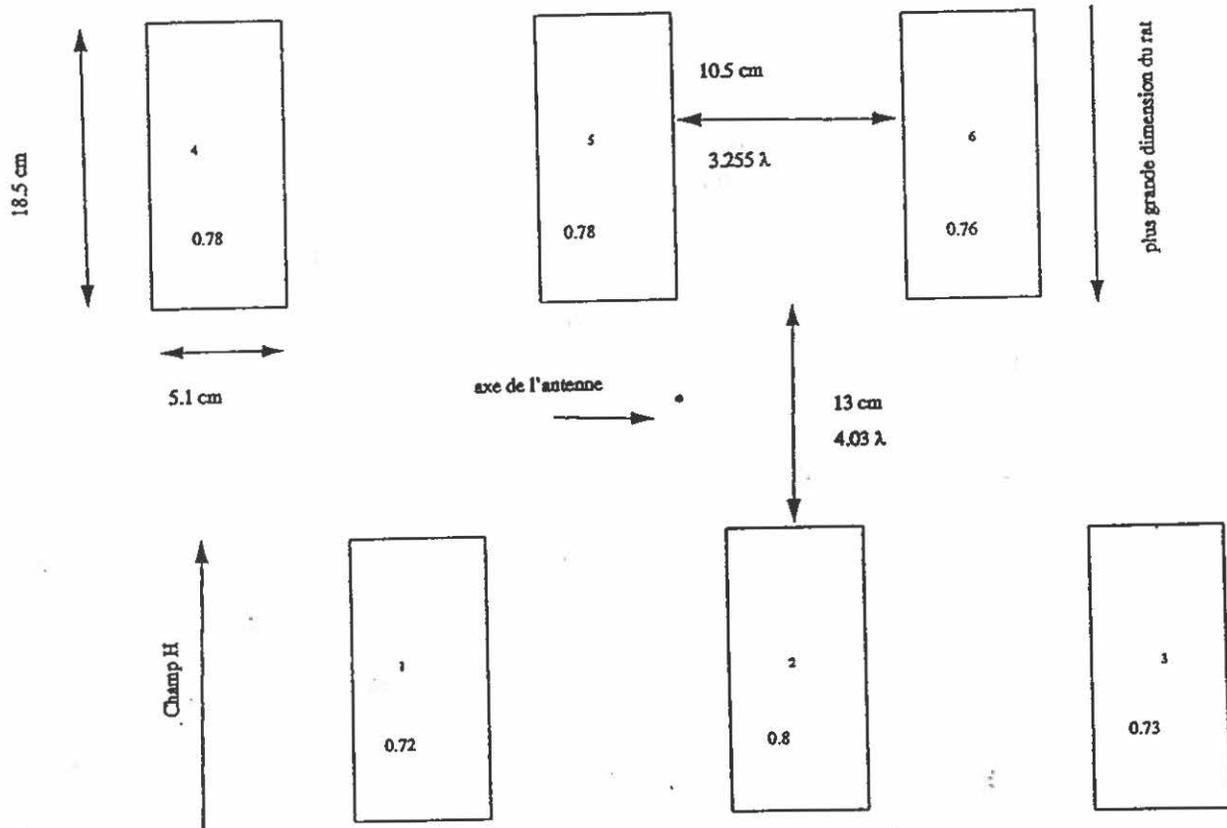
Les protéines ont été mesurées dans les échantillons selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant comme standard protéique l'albumine bovine et comme réactif, la solution commerciale de bleu de coomassie mise en marché par Bio-Rad. Les lectures se faisaient à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer ajusté à 595 nm dans des cuvettes jetables de 1.5 mL.

## **2.10 Statistiques**

La moyenne, l'écart-type, et l'erreur sur la moyenne (SEM) ont été calculés pour chaque échantillon et groupe analysés. Pour comparer les moyennes des groupes exposés aux radiofréquences à celles des témoins, le test de t de Student a été effectué. Le seuil de signification était de 0.05.



**FIGURE 2.2** Représentation schématique du montage expérimental utilisé pour exposer les rats aux radiofréquences. On peut voir sur la figure : la source génératrice de radiofréquences, la cage de Faraday, la chambre d'exposition ainsi que l'ensemble des appareils de mesure (Tiré de Mortek, 1995).



**FIGURE 2.3** Représentation schématique de la distribution des rats à l'intérieur de la cage d'exposition. La figure illustre aussi l'axe de l'antenne, l'orientation du champ H (magnétique) ainsi que la densité de puissance en mW/m<sup>2</sup> (Tiré de Mortek, 1995).

## CHAPITRE 3

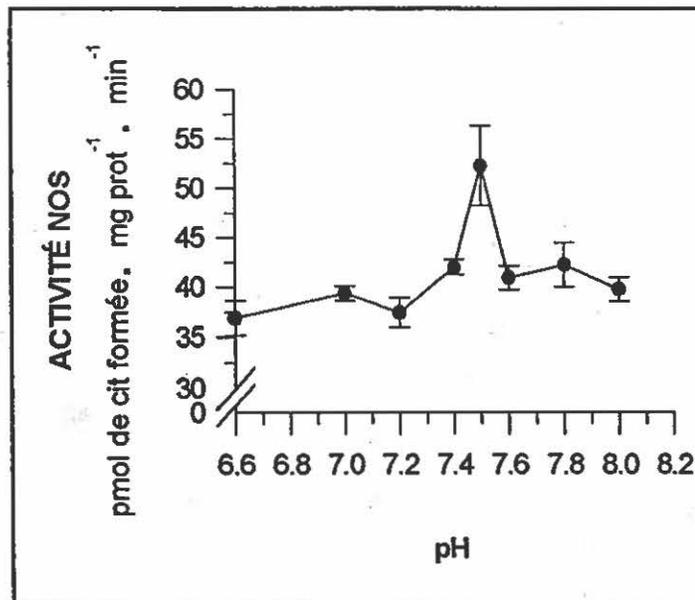
### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX: CARACTÉRISATION DE LA NOS DANS LE CERVEAU DE CHAT

#### 3.1 Caractérisation des paramètres biochimiques de la NOS dans le cerveau de chat

La NOS de chat a été caractérisée dans le surnageant NOS de cerveau total de chat.

##### 3.1.1 Influence du pH

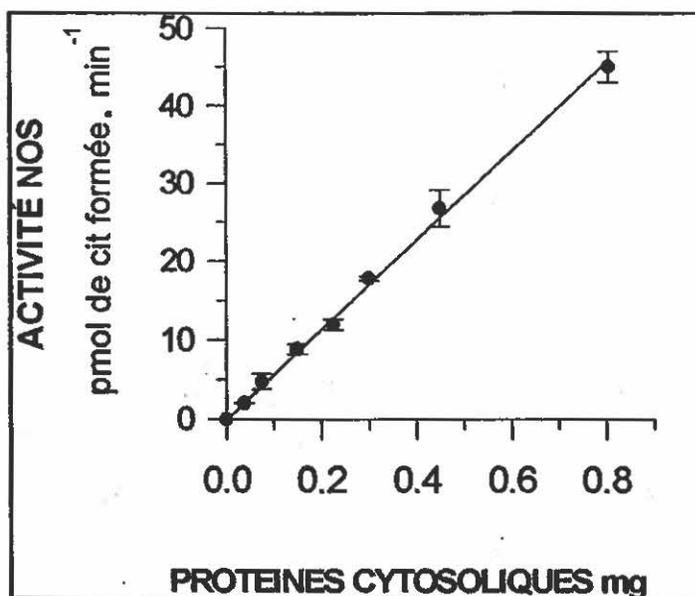
La figure 3.1 montre l'influence du pH, pour des valeurs de 6.6 allant jusqu'à 8.0, sur l'activité enzymatique de la NOS du chat. L'enzyme atteint son activité maximale de  $53.3 \pm 3.4$  pmol de citrulline formée/mg prot/min, au pH 7.5. C'est ce pH qui a été retenu pour les expériences suivantes.



**FIGURE 3.1.** Effet du pH sur l'activité NOS dans un surnageant de cerveau de chat. Chaque point sur le graphique est exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais.

### 3.1.2 Concentration de protéines cytosoliques

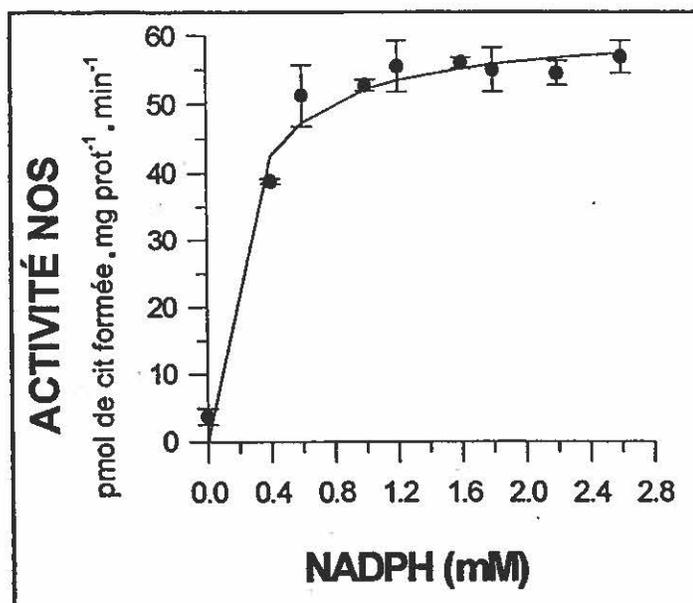
La linéarité de l'activité enzymatique de la NOS (mesurée en pmol de citrulline formée/ min) en fonction de la quantité de protéines cytosoliques (en mg) présente dans le milieu d'incubation est décrite à la figure 3.2. La quantité de citrulline formée est linéaire à l'intérieur des quantités allant de 0 à 0.84 mg de protéines cytosoliques avec un coefficient de corrélation de 0.999. La mesure de la pente donne une activité spécifique de 57 pmol de citrulline formée/mg prot/min. Pour les expériences subséquentes, 450  $\mu$ g de protéines étaient ajoutées au milieu d'incubation. L'effet de la période d'incubation a aussi été évalué; à pH 7.5, et la formation du produit était linéaire de 0 à 60 minutes (données non présentées). Un temps d'incubation de 60 minutes a été retenu car la détection du produit marqué était facilitée.



**FIGURE 3.2.** Effet de la quantité de protéines cytosoliques d'un surnageant de cerveau de chat sur la formation de citrulline. Chaque point sur le graphique est comme la moyenne  $\pm$  SEM de trois essais..

### 3.1.3 Concentration de NADPH

La figure 3.3 décrit l'influence du NADPH sur l'activité enzymatique de la NOS. Une augmentation significative de l'activité est observée entre 0 et 0.4 mM de NADPH, suivie par un plateau qui se maintient de 1.0 à 2.6 mM. À noter que sans addition de NADPH au milieu d'incubation, l'activité enzymatique n'est que de 7% de la valeur optimale en présence de NADPH (1.2 mM). La concentration de NADPH retenue pour les expériences subséquentes est de 1.2 mM.



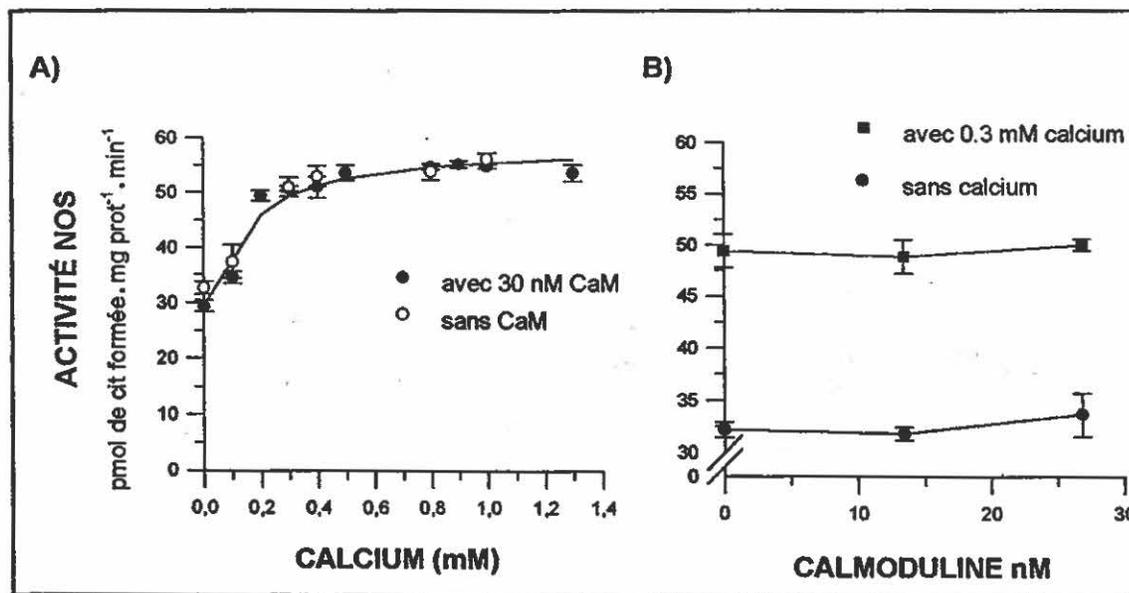
**FIGURE 3.3.** Effet de différentes concentrations de NADPH sur l'activité NOS dans un surnageant de cerveau de chat. Chaque point sur le graphique est exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais.

### 3.1.4 Effets du calcium et de la calmoduline

L'effet du calcium sur l'activité NOS est décrit à la figure 3.4 (a). L'effet du calcium a été étudié, en présence et en absence d'un ajout exogène de 30 nM de CaM, et une seule

courbe a été tracée puisqu' aucune différence statistique n'est notable entre ces deux conditions expérimentales ( $P > 0.05$ ). L'activité enzymatique augmente jusqu'à une concentration de 0.3 mM de calcium, et ensuite un plateau est atteint et maintenu jusqu'à 1.3 mM. Il est intéressant de noter qu'une activité est présente, même sans l'addition de calcium (60% de l'activité optimale).

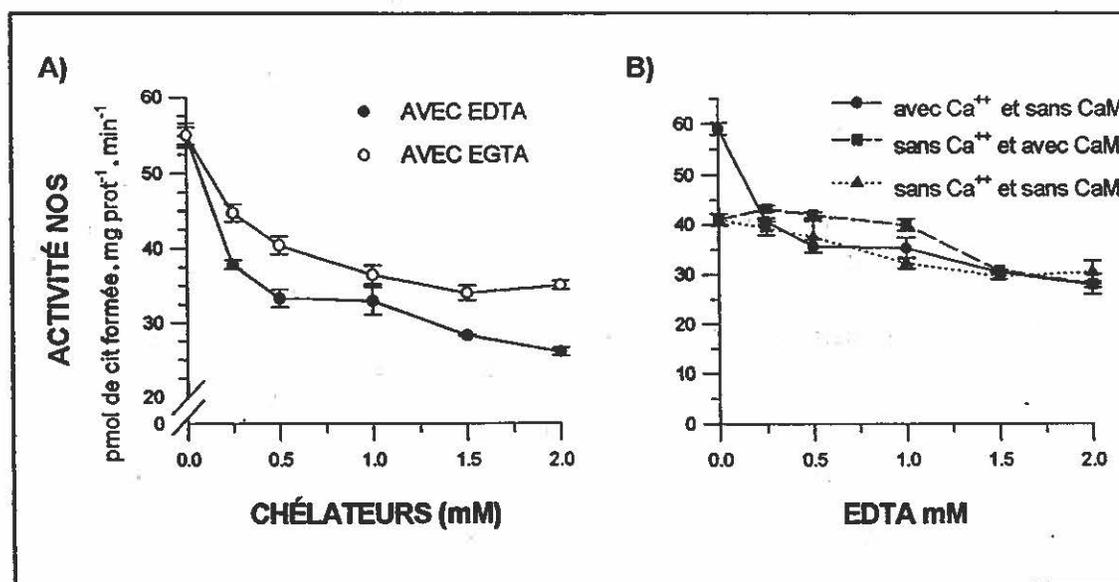
La figure 3.4 (b) décrit l'influence d'un ajout exogène de CaM, en absence ou présence d'une concentration fixe de calcium (0.3 mM), sur l'activité enzymatique NOS. À n'importe laquelle des concentrations de CaM ajoutée (jusqu'à 800 nM, résultat non présenté), l'activité NOS en présence de calcium n'est pas modifiée, et de même en absence de calcium. Donc, pour les expériences suivantes, la CaM exogène n'est pas ajoutée au milieu d'incubation puisqu'elle n'est pas nécessaire lorsque la source enzymatique est le surnageant NOS de cerveau de chat.



**FIGURE 3.4.** Influence a) du calcium sur l'activité NOS de chat en présence (●) et en absence (○) de 30 nM de CaM, et b) de la CaM sur l'activité NOS de chat en présence (■) et absence (●) de 0.3 mM de calcium. Chaque point sur le graphique est exprimé sous la forme moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais..

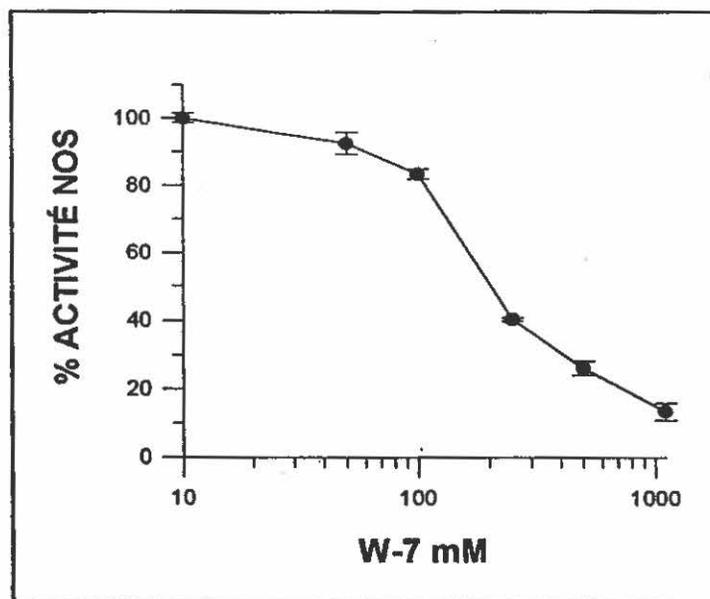
Une étude plus précise, quant au rôle du calcium sur l'activité enzymatique NOS, a été réalisée en ajoutant des chélateurs du calcium au milieu d'incubation. La figure 3.5 (a) décrit l'influence inhibitrice de l'EDTA et de l'EGTA sur l'activité NOS. Les deux chélateurs causent une inhibition progressive de l'activité NOS à mesure que leurs concentrations augmentent de 0 à 2 mM dans le milieu d'incubation. Lorsque la concentration d'EDTA ou d'EGTA est de 2 mM, l'activité NOS est réduite à 47 et 60%, respectivement. L'EDTA semble un inhibiteur un peu plus puissant que l'EGTA de l'activité NOS de chat. En présence de 5 mM d'EDTA, l'activité de la NOS est significativement réduite à 25% de la valeur optimale (résultat non montré).

La figure 3.5 (b) décrit l'effet de l'EDTA sur l'activité NOS: en absence de calcium et CaM ajoutés, en absence de calcium et présence de 30 nM de CaM et, en présence de 30 nM de calcium et absence de CaM. On peut noter que l'activité enzymatique NOS est la même pour les trois conditions expérimentales décrites lorsque la concentration d'EDTA est 2 mM dans le milieu d'incubation.



**FIGURE 3.5** a) effet des chélateurs du calcium EDTA et EGTA sur l'activité NOS de chat et b) effet inhibiteur de l'EDTA sous différentes conditions expérimentales. Chaque point sur les graphiques est un triplicata exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM.

Une autre étude visait à définir un rôle plus précis quant au besoin de la présence de la CaM, dans le milieu d'incubation, pour la réaction enzymatique catalysée par la NOS. La figure 3.6 montre l'influence du W-7, un antagoniste de la CaM, sur l'activité NOS. L'inhibition de l'activité NOS est progressive en fonction de la concentration de W-7 présente dans le milieu d'incubation. La valeur de la  $IC_{50}$  est estimée à 218  $\mu$ M. À 1000  $\mu$ M de W-7, seulement 14 % de l'activité NOS est détectable, suggérant ainsi une importance capitale de la CaM dans la réaction enzymatique.

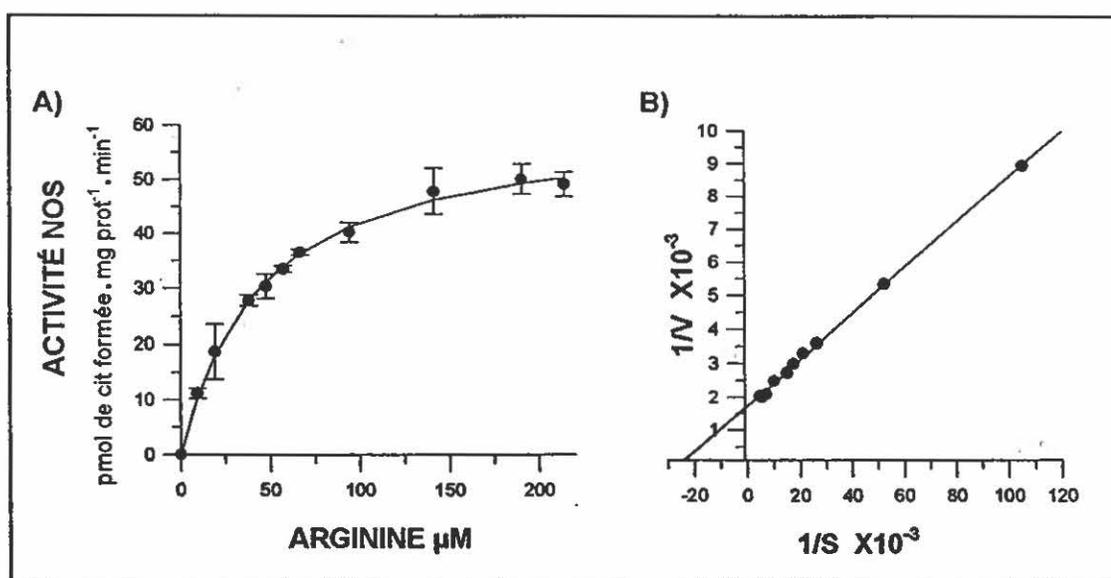


**FIGURE 3.6** Effet de l'antagoniste de la CaM W-7 sur l'activité de la NOS dans un surnageant de cerveau de chat. Chaque point sur le graphique est exprimé sous la forme moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais.

### 3.1.5 Détermination des paramètres cinétiques

L'influence du substrat, la L-arginine, sur l'activité enzymatique NOS est décrite à la figure 3.7 (a). À partir de cette représentation du type Michaelis-Menten, une représentation graphique de Lineweaver-Burk (Lineweaver-Burk, 1934) a été construite pour extraire les

paramètres cinétiques  $V_{max}$  et  $K_m$  (figure 3.7 b). L'activité NOS augmente en fonction de la concentration d'arginine jusqu'à ce qu'un plateau apparent soit atteint vers 200  $\mu\text{M}$ . La vitesse maximale ( $V_{max}$ ) est de 59.4 pmol de citrulline formée/mg prot/min et le  $K_m$  apparent est de 41.1  $\mu\text{M}$ . La concentration de 200  $\mu\text{M}$  d'arginine a été retenue pour les expériences subséquentes, pour s'assurer de mesurer une activité enzymatique maximale.



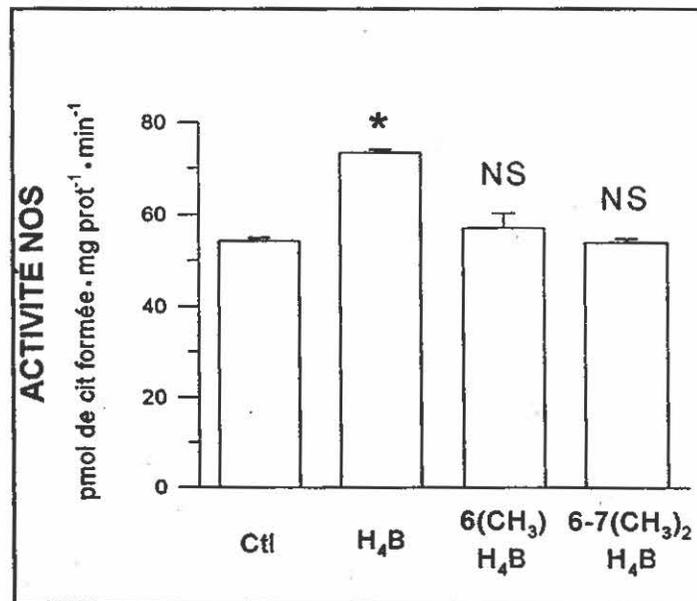
**FIGURE 3.7.** Détermination des paramètres cinétiques; a) effet de la concentration de l'arginine sur l'activité de la NOS dans un surnageant de cerveau de chat et, b) représentation graphique de Lineweaver-Burk d'où sont calculés le  $V_{max}$  de 59.4 pmol de citrulline formée/mg prot/min et le  $K_m$  de 41.1  $\mu\text{M}$ .

### 3.2 Étude de l'effet de cofacteurs et autre molécules sur la NOS

#### 3.2.1 Tétrahydrobioptérine et ses métabolites

La tétrahydrobioptérine ( $\text{H}_4\text{B}$ ) est un cofacteur de la NOS dont le rôle de modulateur de l'activité enzymatique ne semble pas être reconnu et, encore moins caractérisé pour l'enzyme neuronale. La figure 3.8 montre le rôle activateur de ce cofacteur à une

concentration de 50  $\mu\text{M}$ , alors que deux de ses métabolites, soit la 6-méthyl et la 6,7-diméthyl  $\text{H}_4\text{B}$  (100  $\mu\text{M}$ ), échouent dans l'activation de l'activité enzymatique NOS. La  $\text{H}_4\text{B}$  active de façon significative ( $P < 0.05$ ) la NOS de 40 %, c'est à dire de 55 à 76 pmol de citrulline formée/mg prot/min. Une concentration de 0.5  $\mu\text{M}$  est suffisante pour créer cette activation de 40% de l'activité NOS (résultat non-présenté) et, même à une concentration de 50  $\mu\text{M}$ , la  $\text{H}_4\text{B}$  ne stimule pas davantage la NOS.

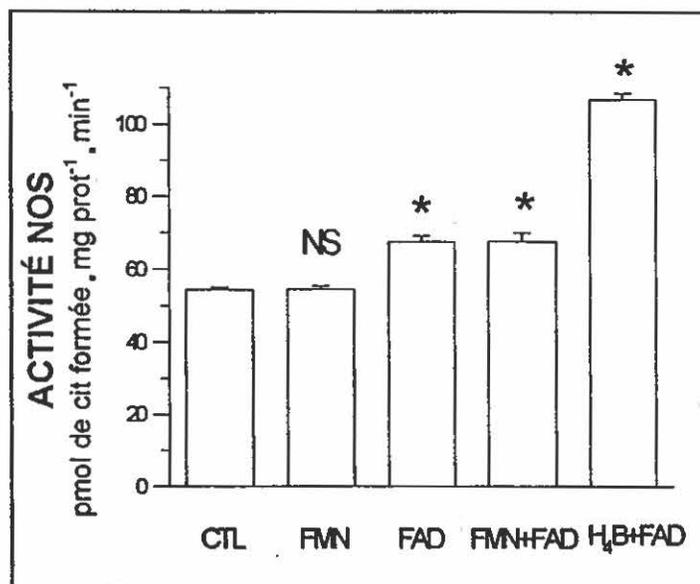


**FIGURE 3.8.** Effet de 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_4\text{B}$ , de 100  $\mu\text{M}$  de 6-méthyl  $\text{H}_4\text{B}$  et de 100  $\mu\text{M}$  de 6,7-diméthyl  $\text{H}_4\text{B}$  sur l'activité NOS dans un surnageant de cerveau de chat. Chaque barre sur le graphique représente la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais. \* =  $P < 0.05$ . NS = non significatif.

### 3.2.2 FAD et FMN

La figure 3.9 décrit l'effet du FAD et du FMN sur l'activité NOS. L'ajout au milieu d'incubation de FAD stimule ( $P < 0.05$ ) l'activité de la NOS de 24%, i.e. de 54.2 à 67.5 pmol de citrulline formée/mg prot/min. La présence de FMN (50  $\mu\text{M}$ ) dans le milieu d'incubation

ne stimule pas ( $P > 0.05$ ) l'activité enzymatique, alors que la présence simultanée de FAD et de FMN active la NOS au même niveau que le FAD seul (68 pmol de citrulline formée/mg prot/min). La présence de FAD et de  $H_2B$  (50  $\mu M$  chacun) dans le milieu d'incubation a un effet très important sur l'activité NOS, soit une activation de 94% (55.4 à 107 pmol de cit formée/ mg prot/ min).

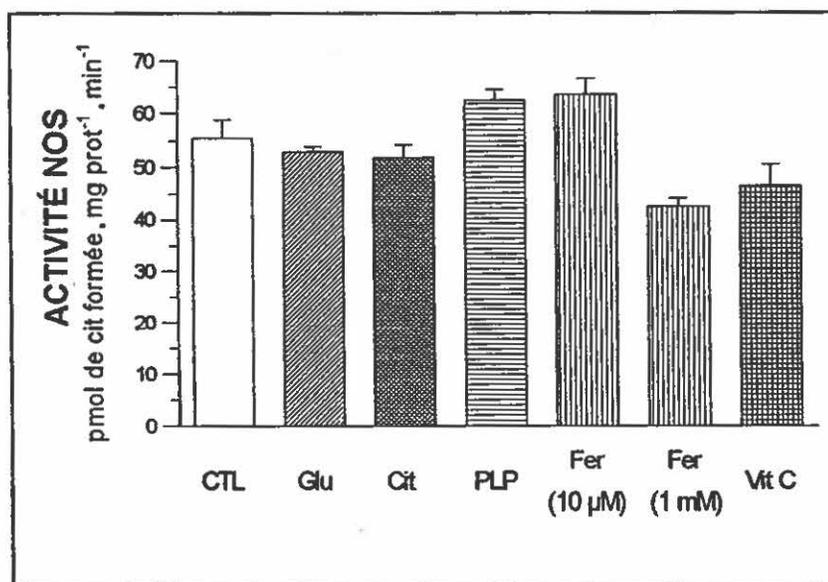


**FIGURE 3.9** Effet du FAD et FMN (50  $\mu M$ ) et de la  $H_2B$  sur l'activité NOS de chat. Chaque barre sur le graphique est exprimée sous la forme moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais. \* =  $P < 0.05$ . NS = non significatif

### 3.2.3 Autres modulateurs

La figure 3.10 montre l'influence de la citrulline, du glutamate, de l'acide ascorbique (vit C), du fer ferrique et du pirydoxal 5' phosphate (PLP) sur l'activité enzymatique NOS. Aucune de ces molécules n'influence l'activité enzymatique NOS à ces concentrations, sauf le fer, qui à une concentration de 1 mM fait précipiter une partie des protéines du milieu d'incubation, donc qui interfère avec l'essai enzymatique; à des concentrations plus faibles, le fer n'a pas d'influence sur l'activité enzymatique NOS de chat. Le même phénomène a été

rencontré avec l'acide ascorbique où dans le cas de concentrations supérieures à 1 mM les protéines précipitent, alors qu'à des concentrations inférieures, il n'a aucun effet sur l'activité enzymatique NOS.

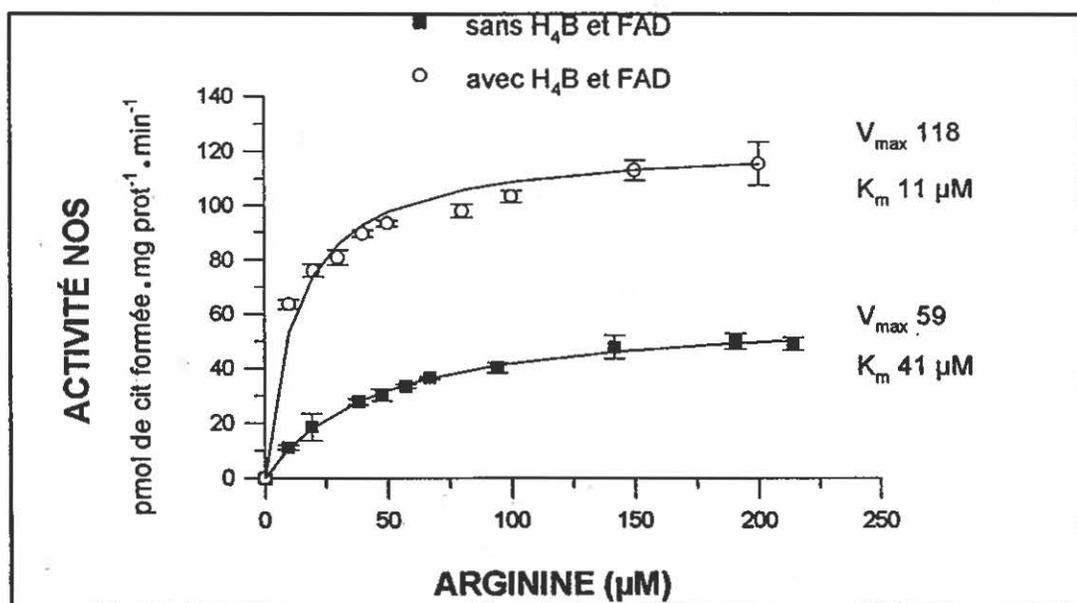


**FIGURE 3.10** Effet de 200 µM de glutamate, de 200 µM de citrulline, de 1 mM de vitamine c, de 1 mM et 10 µM de fer ainsi que 60 µM de pyridoxal 5'phosphate sur l'activité NOS de chat. Chaque barre sur le graphique est exprimée comme moyenne ± SEM pour trois essais.

### 3.3 Paramètres cinétiques de la NOS en présence de FAD et H<sub>4</sub>B

Suite aux études effectuées sur les cofacteurs FAD et H<sub>4</sub>B, qui ont montré des rôles d'activateurs de la NOS, les paramètres cinétiques de la NOS de chats ont été mesurés à nouveau en leur présence. La figure 3.11 montre l'activité enzymatique de la NOS en fonction de la concentration d'arginine présente dans le milieu d'incubation. Sur la courbe de Michaelis-Menten en présence de FAD et H<sub>4</sub>B, l'activité enzymatique augmente en fonction de la concentration d'arginine, jusqu'à 100 µM, où un plateau est atteint et maintenu jusqu'à 200 µM. Le V<sub>max</sub> est de 118 pmol de citrulline formée/mg prot/min et le K<sub>m</sub> est de 11 µM. La courbe de Michaelis-Menten en absence de FAD et H<sub>4</sub>B (la même qu'à la figure

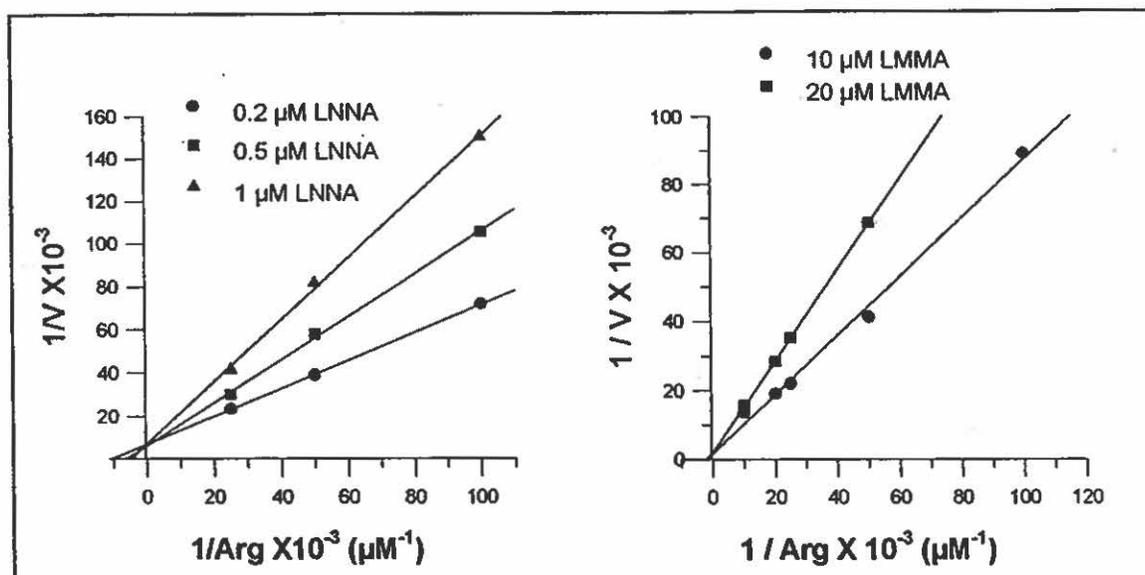
3.7 a) est aussi présentée pour accentuer le fait que le  $V_{max}$  est supérieur en présence de ces molécules, soit 118 vs 59 pmol de citrulline formée/mg prot/min. Il est très intéressant de noter que le  $K_m$ , quant à lui, est diminué en présence de  $H_4B$  et FAD (11  $\mu M$ ) comparativement à en absence de  $H_4B$  et FAD (41  $\mu M$ ), reflétant ainsi que ces molécules modulent les interactions entre l'arginine et la NOS.



**FIGURE 3.11** Détermination des paramètres cinétiques en présence (○) et en absence (■) de 10  $\mu M$   $H_4B$  et FAD. Chaque point sur le graphique est exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais.

### 3.4 Étude d'inhibiteurs de la NOS analogue à la L-arginine

La figure 3.12 (a) montre les résultats de cinétique, sous la représentation de Lineweaver-Burk, en présence de 0.2, 0.5 et 1  $\mu M$  de  $N^{\omega}$ -L-nitro arginine (LNNA). La figure 3.12 (b) montre les résultats de cinétique, sous la forme de représentation de Lineweaver-Burk, en présence de 10 et 20  $\mu M$  de  $N^{\omega}$ -monométhyle-L-arginine (NMMA). Les  $K_i$  calculés à partir de ces droites sont de  $0.3 \pm 0.5 \mu M$  et  $0.041 \pm 0.009 \mu M$  pour la L-NMMA et L-NNA, respectivement.

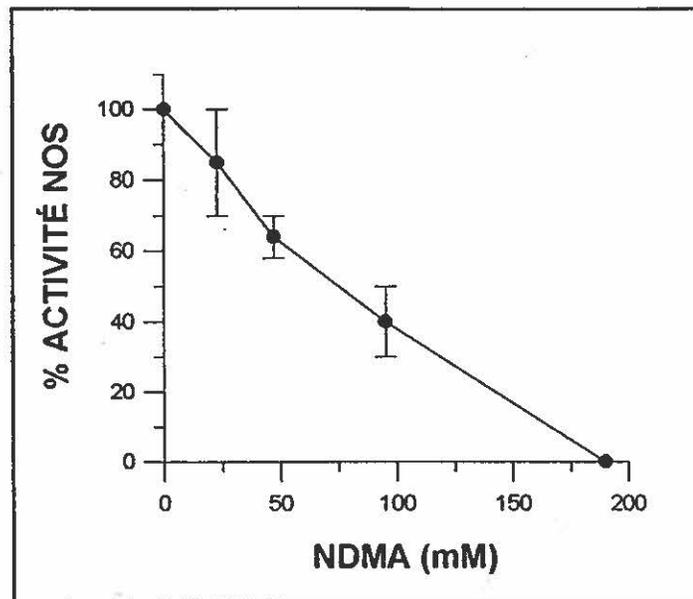


**FIGURE 3.12.** Représentation de Lineweaver-Burk d'études de cinétique en présence de a) LNNA dont le  $K_i$  calculé à partir de ces courbes est  $0.041 \mu\text{M}$  et b) LMMA dont le  $K_i$  calculé est  $0.35 \mu\text{M}$ . Chaque point sur ces graphiques est comme la moyenne de trois essais.

Un autre inhibiteur, la nitrosodiméthyleamine (NDMA), qui n'est pas un analogue de l'arginine en tant que tel, mais dont la structure ressemble à la partie de l'arginine qui est oxydée par la NOS, est étudié en fonction de sa concentration dans le milieu d'incubation (0 à 190 mM) comme décrit à la figure 3.13. Les concentrations qui sont nécessaires pour inhiber l'activité enzymatique de la NOS sont très élevées. Une inhibition d'environ 30% est notée à une concentration de 47.6 mM de NDMA et aucune activité enzymatique n'est notable à 190 mM. Une valeur de la  $IC_{50}$  est estimé à 75 mM.

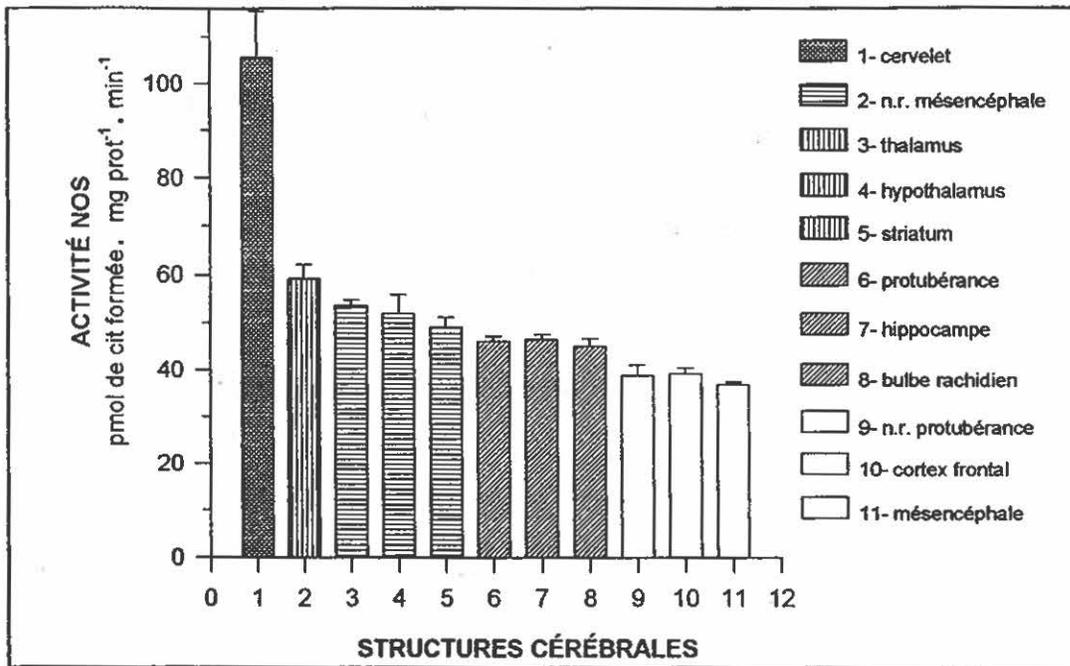
### 3.5 Distribution de l'activité NOS dans différentes structures du cerveau de chat

La figure 3.14 décrit l'activité spécifique de la NOS dans 11 structures du cerveau de chat. Ces structures ont été disséquées comme décrit à la section 2.2 du chapitre "Matériel et méthode". L'activité NOS a été déterminée dans les conditions expérimentales décrites jusqu'à présent (i.e. sans ajout de FAD, FMN et  $H_4B$ ). L'activité enzymatique est maximale dans le cervelet ( $106 \pm 8$  pmol de citrulline formée/mg prot/min) et minimale dans le



**FIGURE 3.13.** Courbe dose réponse du nitroso-diméthylamine (NDMA) sur l'activité NOS dans un surnageant de cerveau de chat. Chaque point sur le graphique est exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais.

mésencéphale dépourvu de ses noyaux de raphé ( $37 \pm 8$  pmol de citrulline formée/mg prot/min). Pour ce qui est des autres structures, les noyaux de raphé du mésencéphale, le thalamus et l'hypothalamus ont des activités semblables, de même que le striatum, la protubérance, l'hippocampe et le bulbe rachidien et, avec une activité plus faible, se retrouve les noyaux de raphé de la protubérance et le cortex frontal. Ce graphique démontre bien que la distribution de la NOS est très large dans le SNC et non confinée à des systèmes anatomiques précis.



**FIGURE 3.14.** Distribution de l'activité NOS dans 11 structures du cerveau de chat. Pour chaque structure, les résultats sont exprimés comme moyenne  $\pm$  SEM (n=12).

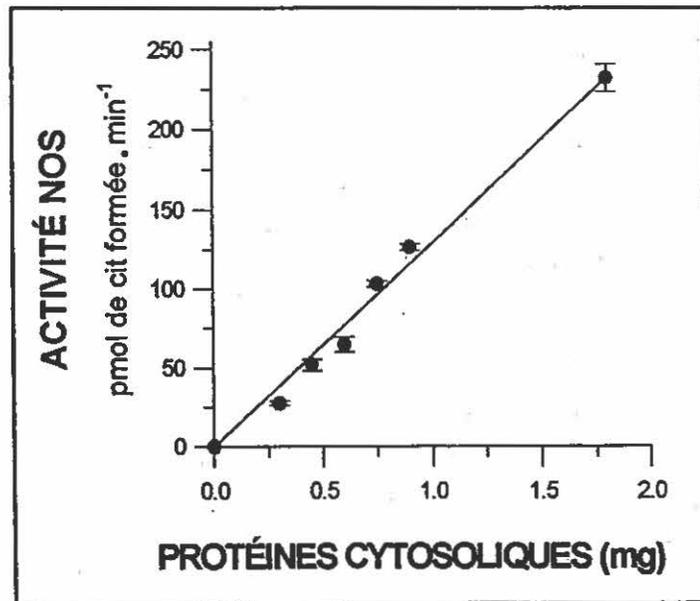
## CHAPITRE 4

### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX: CARACTÉRISATION DE LA NOS CHEZ LE RAT

#### 4.1 Caractérisation biochimique de la NOS de cerveau total de rat

##### 4.1.1. Concentration de protéines cytosoliques

La figure 4.1 montre la linéarité de la formation de citrulline en fonction de la quantité de protéines cytosoliques ajoutée au milieu d'incubation. La formation de citrulline à partir de l'arginine s'est avérée linéaire (coefficient de corrélation de 0.994) en utilisant des quantités de protéines cytosoliques de cerveau total de rat allant de 0 à 1.8 mg. La période d'incubation a aussi été vérifiée jusqu'à 60 minutes et la formation de citrulline est linéaire en fonction du temps (résultats non montrés). En général, un surnageant contenant environ 1.5



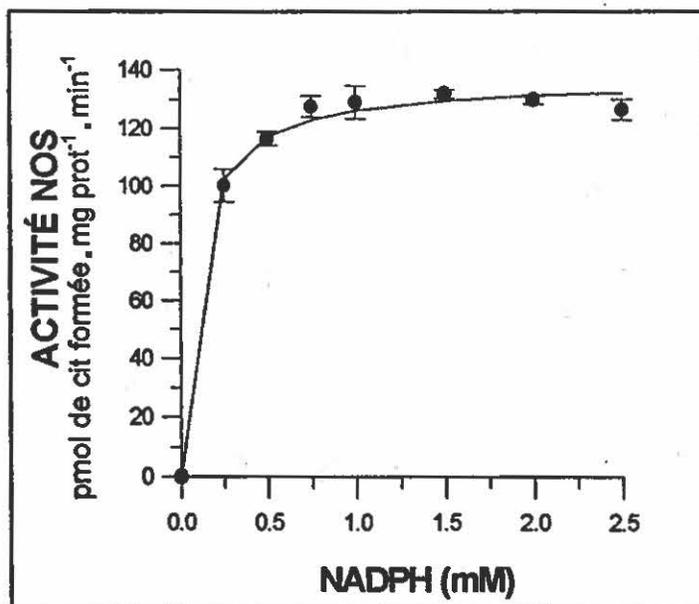
**FIGURE 4.1.** Effet de la quantité de protéines cytosoliques de cerveau de rat sur la formation de citrulline. Chaque point sur le graphique est exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais.

mg prot/mL était utilisé pour caractériser la NOS chez le rat. Le pH utilisé est celui suggéré par la littérature de la NOS de rat, soit un pH de 7.4.

Une source enzymatique préparée dans du tampon à 20 mM HEPES a été comparée à une source enzymatique préparée dans du TRIS-HCl à 50 mM et aucune différence (perte ou gain d'activité) n'était notable. Aussi, l'omission de l'EDTA dans le tampon d'homogénéisation ne change pas l'activité spécifique de la NOS.

#### 4.1.2 Concentration du NADPH

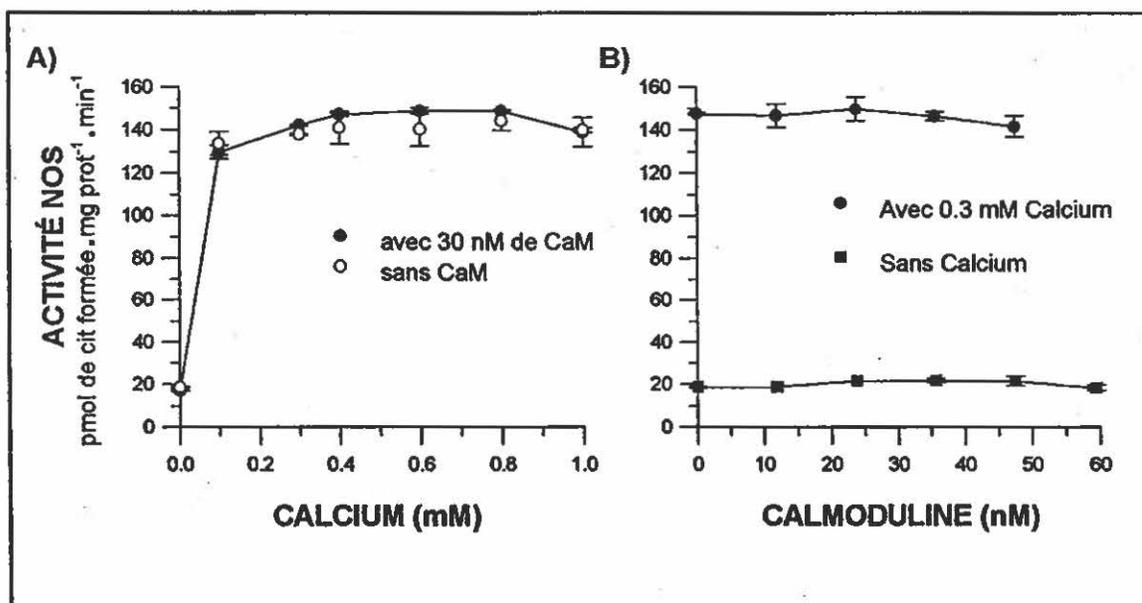
L'effet du NADPH sur l'activité enzymatique de la NOS est décrit à la figure 4.2. L'activité enzymatique augmente de façon significative entre 0 et 0.5 mM de NADPH et par la suite un plateau est atteint et maintenu jusqu'à 2.5 mM. Sans NADPH ajouté au milieu d'incubation, l'activité enzymatique NOS est seulement à 2.3% de la valeur optimale en présence de 1 mM de NADPH.



**FIGURE 4.2.** Effet de différentes concentrations de NADPH sur l'activité NOS dans un surnageant de cerveau de rat. Chaque point sur le graphique est exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais.

#### 4.1.3 Effets du calcium et de la calmoduline

La figure 4.3 (a) décrit l'effet d'un ajout de calcium sur l'activité enzymatique NOS. L'activité NOS a été mesurée en présence de concentrations de calcium variant entre 0 et 1 mM et ce en présence et en absence d'un ajout de 30 nM de CaM exogène au milieu d'incubation. Aucune différence statistique n'est notable entre ces deux conditions expérimentales et une seule courbe représentant la moyenne des deux courbes a été tracée. On peut noter qu'en absence de calcium ajouté, l'activité enzymatique NOS n'est que de 11% de la valeur optimale en présence de 0.3 mM de calcium. De plus, l'activité NOS augmente de façon significative entre 0 et 0.1 mM de calcium, et un plateau est par la suite atteint à partir de 0.3 et se maintient jusqu'à 1 mM de calcium.

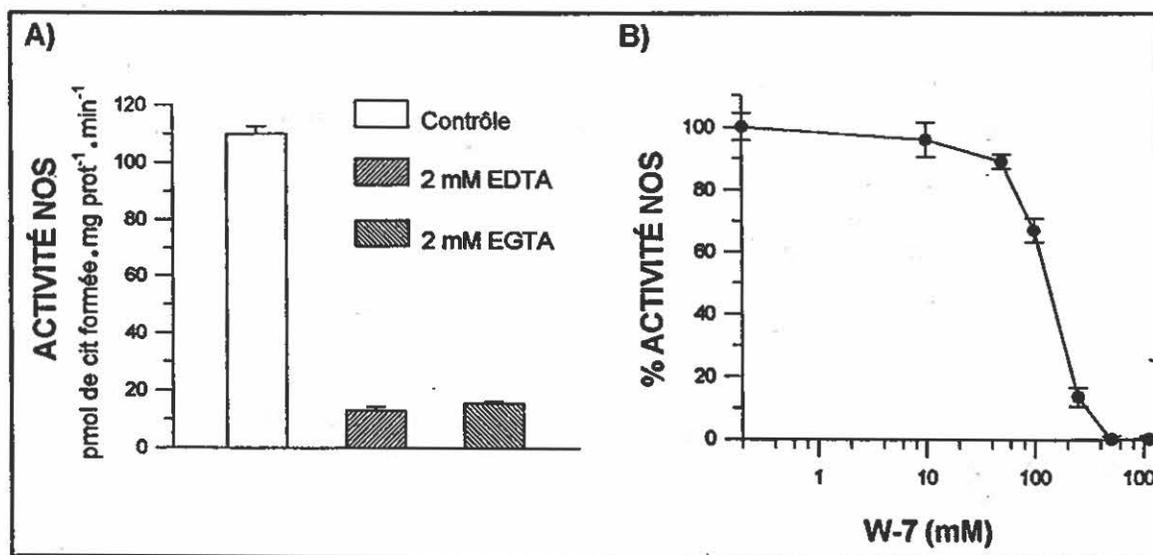


**FIGURE 4.3.** Influence a) du calcium sur l'activité NOS de rat en présence (●) et en absence (○) de 30 nM de CaM et b) de la CaM sur l'activité de la NOS de rat en présence (●) et en absence (■) d'une concentration fixe de calcium (0.3 mM). Chaque point sur ces graphiques est exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais.

L'effet d'un ajout exogène de CaM (0 à 60  $\mu$ M) sur l'activité de la NOS est décrit à la figure 4.3 (b) et ce, en présence ou en absence d'une concentration fixe de calcium de 0.3

mM. Dans les deux cas, la CaM échoue à activer l'activité enzymatique NOS. Pour les expériences suivantes utilisant un surnageant de rat comme source de NOS, la calmoduline exogène n'est plus ajoutée.

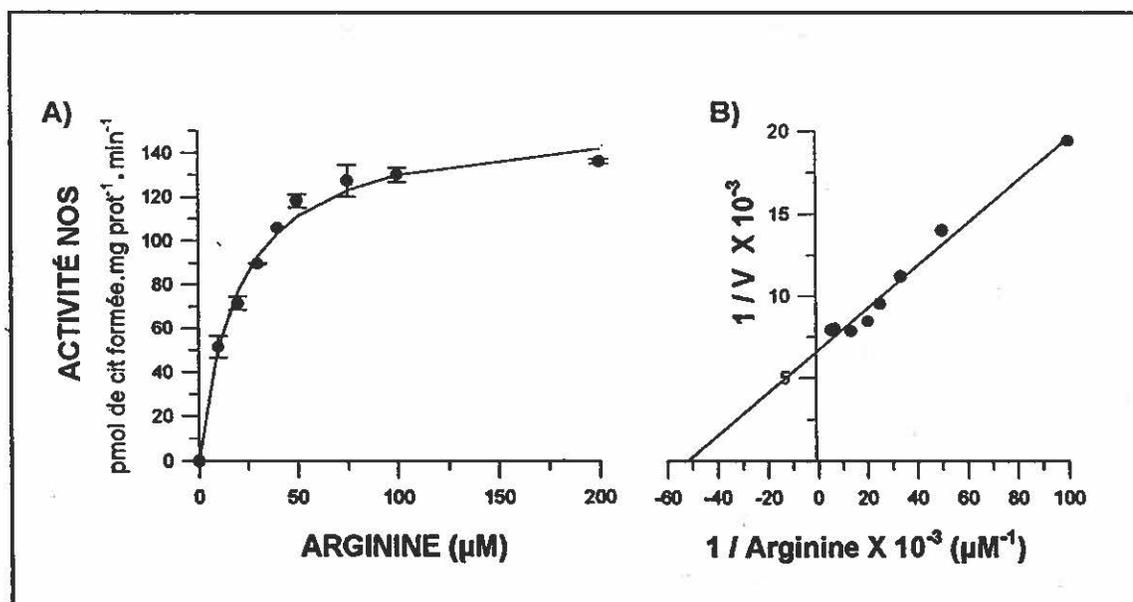
La figure 4.4 (a) décrit une expérience qui a été entreprise dans le but de démontrer le rôle essentiel du calcium dans la réaction enzymatique NOS. L'ajout de 2 mM EDTA au milieu d'incubation réduit l'activité NOS à 13% de l'activité témoin alors que 2 mM EGTA réduit l'activité à 15% du contrôle. Ces résultats illustrent bien l'effet inhibiteur des chélateurs du calcium sur la NOS. Pour tenter de freiner l'inhibition causée par 2 mM EDTA, des concentrations de NADPH allant de 0 à 3.2 mM ont été ajoutées au milieu d'incubation (résultats non-montrés), mais l'activité NOS était toujours près de 15% de l'activité témoin. La figure 4.4 (b), quant à elle permet de définir un rôle plus précis pour la CaM dans la réaction catalysée par la NOS. L'ajout de concentration croissante d'un antagoniste de la CaM, le W-7 (0 à 1.1 mM), au milieu d'incubation montre une inhibition progressive de l'activité NOS. À partir de 500  $\mu$ M de W-7, la NOS est complètement inhibée; le W-7 possède un  $IC_{50}$  apparent de 150  $\mu$ M sur la NOS de rat.



**FIGURE 4.4.** Effet a) des chélateurs du calcium EDTA et EGTA sur l'activité enzymatique NOS de rat et b) du W-7, un antagoniste de la CaM sur l'activité NOS de rat. Chaque point sur ces graphiques est exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM de trois essais.

#### 4.1.4 Détermination des paramètres cinétiques

La figure 4.5 (a) décrit l'effet de l'arginine dans le milieu d'incubation sur l'activité NOS. L'activité enzymatique augmente en fonction de la concentration d'arginine et un plateau est atteint à 200  $\mu\text{M}$  d'arginine. À partir de cette représentation de type Michaelis-Menten, la représentation graphique de Lineweaver-Burk est construite dans le but d'extraire les paramètres cinétiques de la NOS de rat, tel qu'illustré à la figure 4.5 (b). Le  $V_{\text{max}}$  est de 149 pmol de citrulline formée/mg prot/min et le  $K_m$  apparent est de 19.3  $\mu\text{M}$ . La concentration d'arginine utilisée pour toutes les autres expériences chez le rat est de 200  $\mu\text{M}$  pour s'assurer de mesurer une activité maximale dans tous les échantillons.

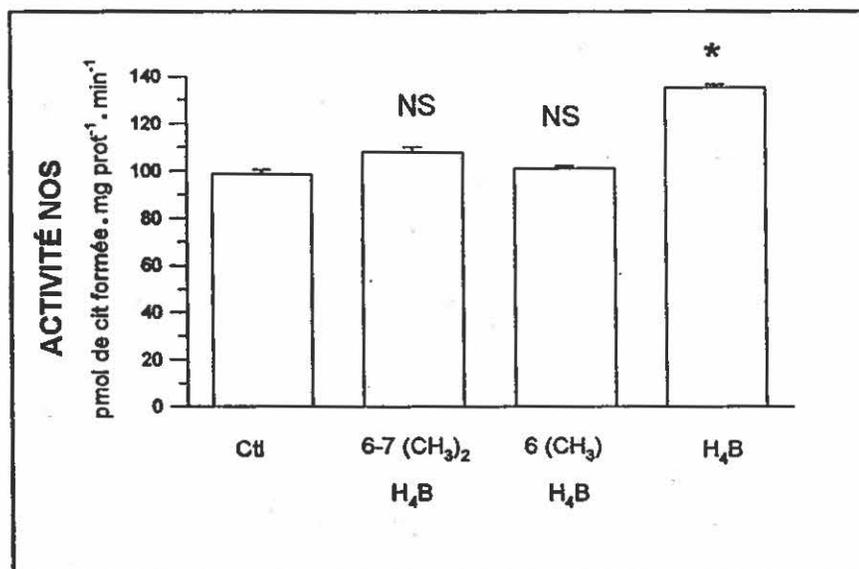


**FIGURE 4.5.** Détermination des paramètres cinétiques: a) effet de la concentration d'arginine sur l'activité NOS dans un surnageant de cerveau de rat ou chaque point sur le graphique est exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais et, b) représentation graphique de Lineweaver-Burk d'où sont calculés le  $V_{\text{max}}$  de 149 pmol de citrulline formée/mg prot/min et le  $K_m$  de 19.3  $\mu\text{M}$ .

## 4.2 Étude de l'effet de quelques cofacteurs sur la NOS de rat

### 4.2.1 Influence de la tétrahydrobioptérine et de ses métabolites

La figure 4.6 décrit le rôle de la H<sub>4</sub>B et deux de ses métabolites, la 6-méthyl- et la 6,7-diméthyl-H<sub>4</sub>B. Les deux métabolites de la H<sub>4</sub>B échouent à activer la NOS, et ce pour des concentrations allant de 0 à 100  $\mu$ M. Par contre, la H<sub>4</sub>B (10  $\mu$ M) active la NOS de 37% comparativement à la valeur témoin ( $P < 0.05$ ), c'est à dire de 99 à 135 pmol de citrulline formée/mg prot/min. L'effet de la H<sub>4</sub>B a été étudié pour des concentrations allant de 0.2 à 100  $\mu$ M et les résultats sont semblables à ceux obtenus à 10  $\mu$ M (aucune différence statistique,  $P > 0.05$ ).

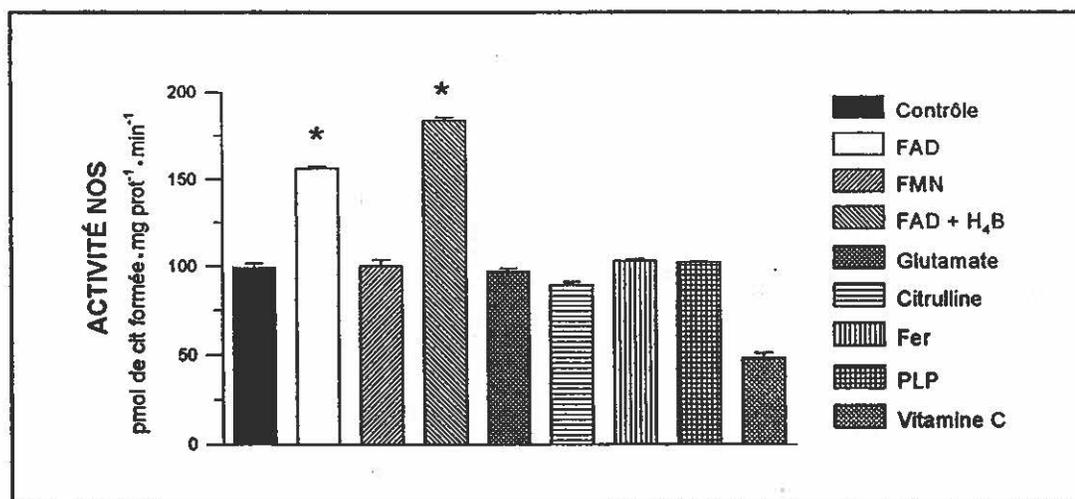


**FIGURE 4.6.** Effet de 10  $\mu$ M H<sub>4</sub>B et 100  $\mu$ M de 6-méthyl- et de 6,7-diméthyl-H<sub>4</sub>B sur l'activité NOS dans un surnageant de cerveau de rat. Chaque barre sur le graphique est exprimée comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais. NS= non significatif. \*=  $P < 0.05$ .

### 4.2.2 Influence du FAD, FMN et autres modulateurs

La figure 4.7 décrit l'influence de quelques molécules importantes du système nerveux central sur l'activité de la NOS. Le FAD (50  $\mu$ M) active de façon significative la NOS de

58% ( $P < 0.05$ ), c'est à dire de 99 à 156 pmol de citrulline formée/mg prot/min. L'ajout de FMN (50  $\mu\text{M}$ ) au milieu donne une activité NOS qui se compare à la valeur témoin et qui n'est pas statistiquement différente ( $P > 0.05$ ). Par contre, l'ajout de 50  $\mu\text{M}$  FAD et 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_4\text{B}$  cause une augmentation significative de l'activité NOS ( $P < 0.05$ ) de 86%, c'est-à-dire de 99 à 184 pmol de citrulline formée/mg prot/min. Les autres molécules testées (glutamate, citrulline, fer et PLP) donnent une activité spécifique NOS qui est voisine de la valeur témoin ne causant aucune différence statistique ( $P > 0.05$ ). On remarque une diminution de l'activité NOS en présence de 5 mM vitamine C, mais cette diminution est plutôt imputable à la précipitation d'une partie des protéines causée par la vitamine C.

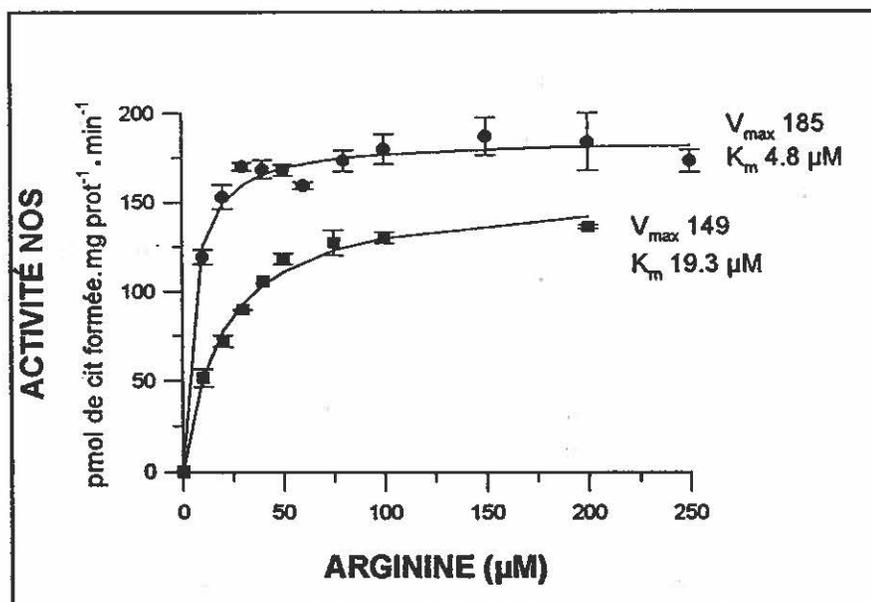


**FIGURE 4.7.** Effet du FAD et du FMN (50  $\mu\text{M}$ ), du glutamate (200  $\mu\text{M}$ ), de la citrulline (200  $\mu\text{M}$ ), du fer (10  $\mu\text{M}$ ), du PLP (60  $\mu\text{M}$ ) et de la vitamine C (5 mM). Chaque barre sur le graphique est exprimée comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais. \* =  $P < 0.05$ .

### 4.3 Détermination des paramètres cinétiques de la NOS de rat en présence de FAD et $\text{H}_4\text{B}$

Les paramètres cinétiques ont été mesurés à nouveau suite aux expériences sur l'effet du FAD et de la  $\text{H}_4\text{B}$  sur l'activité de la NOS. À la figure 4.8, on voit que l'activité NOS augmente en fonction de la quantité d'arginine présente dans le milieu d'incubation, et ce jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint vers 50  $\mu\text{M}$  d'arginine (en présence de FAD et de  $\text{H}_4\text{B}$ ), et le plateau est maintenu jusqu'à 250  $\mu\text{M}$ . À partir de la construction graphique de

Lineweaver-Burk (non-montrée), les paramètres cinétiques calculés sont: un  $V_{\max}$  de 185 pmol de citrulline formée/ mg prot/ min et un  $K_m$  de 4.8  $\mu\text{M}$ . Sur le même graphique est montrée la courbe de Michaelis-Menten en absence de FAD et de la  $\text{H}_4\text{B}$  (la même courbe qu'à la figure 4.5 a) pour accentuer le fait que le  $V_{\max}$  est supérieur en présence de ces molécules, soit 185 vs 149 pmol de citrulline formée/mg prot/min. Il est intéressant de noter que le  $K_m$ , quant à lui, est plus faible en présence de FAD et de  $\text{H}_4\text{B}$  suggérant ainsi que ces molécules modulent l'interaction entre l'arginine et la NOS.



**FIGURE 4.8.** Détermination des paramètres cinétiques  $V_{\max}$  et  $K_m$  en conditions expérimentales optimisées (i.e. en présence de 10  $\mu\text{M}$  de FAD et  $\text{H}_4\text{B}$ , ●) et non-optimisées (■). Chaque point sur le graphique est exprimé comme la moyenne  $\pm$  SEM pour trois essais.

#### 4.4 Caractérisation de deux inhibiteurs de la NOS analogue à l'arginine

À la figure 4.9 (a), la courbe de type dose-réponse de la L- $\text{N}^{\omega}$ -monométhylarginine (L-NMMA) est montrée sur l'activité de la NOS. L'inhibition de la NOS est progressive en fonction de la concentration de L-NMMA (0 à 500  $\mu\text{M}$ ), et à 500  $\mu\text{M}$  l'activité est de moins de 10% de la valeur témoin. La figure 4.9 (b) montre deux droites où la concentration d'arginine variait entre 5 et 100  $\mu\text{M}$  en présence de 50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  L-NMMA. À partir

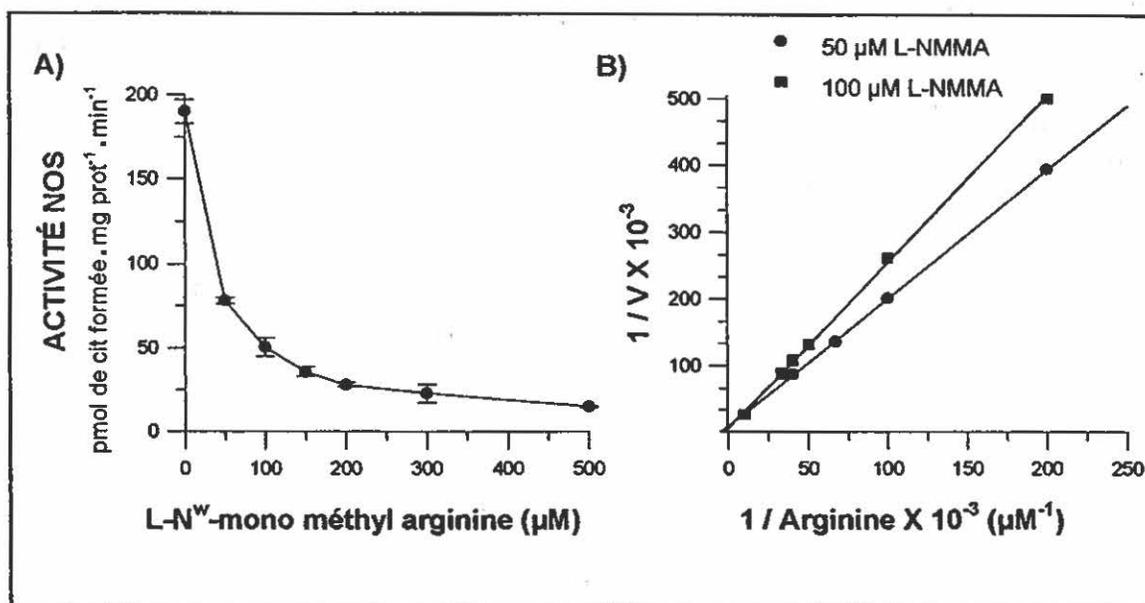
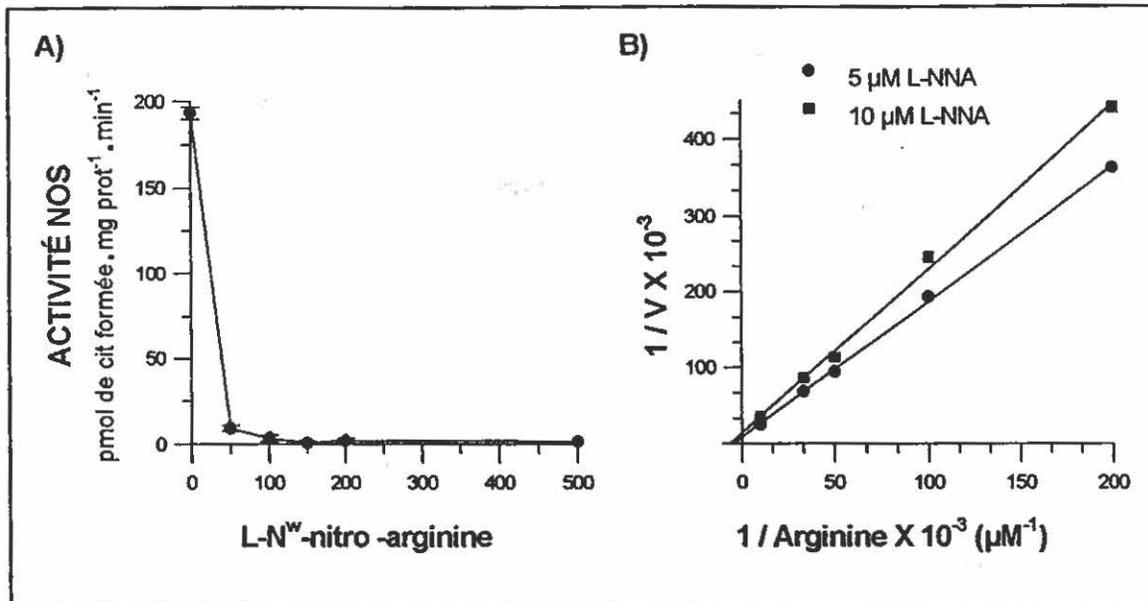


FIGURE 4.9. Caractérisation de la L-NMMA comme inhibiteur de la NOS de rat. En a) courbe dose-réponse de la L-NMMA et b) cinétique enzymatique (présenté sous la forme graphique de Lineweaver-Burk) en présence de 50 et 100  $\mu\text{M}$  de L-NMMA; un  $K_i$  de  $1.19 \pm 0.05 \mu\text{M}$  a été calculé. Chaque point sur les graphiques est le résultat de trois essais.

de ces deux droites, un  $K_i$  de  $1.19 \pm 0.05 \mu\text{M}$  a été calculé. La figure 4.10 (a) montre la courbe dose-réponse de la L-N<sup>ω</sup>-nitroarginine (L-NNA) sur l'activité NOS. Les concentrations de L-NNA étudiées allaient de 0 à 500  $\mu\text{M}$ . L'inhibition de l'activité NOS par la L-NNA est très rapide et on peut entre autre noter qu'il n'y a pratiquement plus d'activité à partir de 50  $\mu\text{M}$  jusqu'à 500  $\mu\text{M}$ . À la figure 4.10 (b), l'activité de la NOS a été mesurée pour des concentrations d'arginine allant de 5 à 100  $\mu\text{M}$  en présence de 5  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  de L-NNA, telle que montré par la représentation de type Lineweaver-Burk. À partir de ces deux droites, un  $K_i$  de  $0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$  a été calculé.

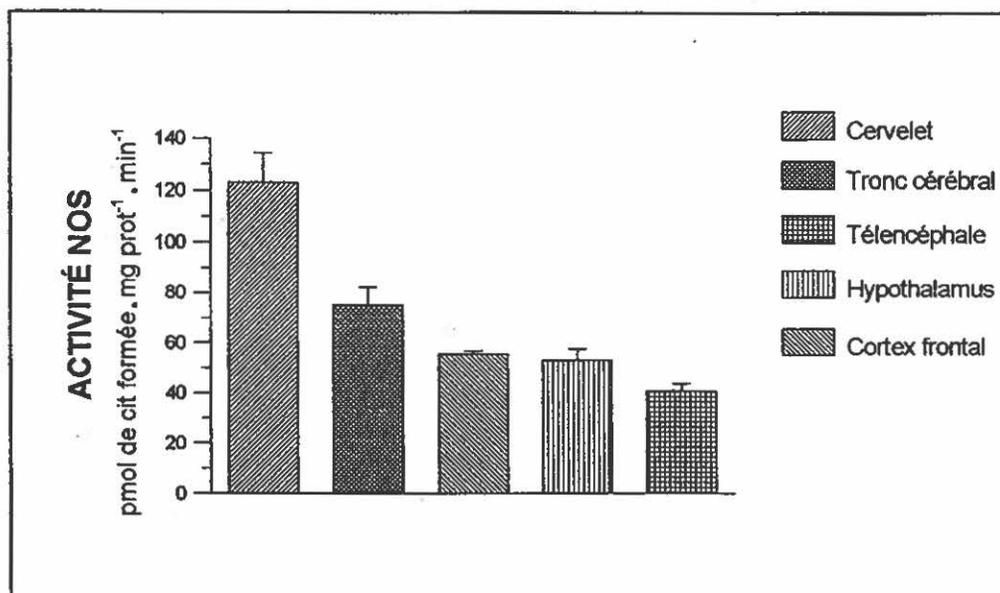
#### 4.5 Distribution de l'activité spécifique NOS dans différentes structures du cerveau de rat

L'activité spécifique de la NOS a été mesurée dans cinq structures du cerveau de rat: le cervelet, le tronc cérébral, le télencéphale, l'hypothalamus et le cortex frontal. Le



**FIGURE 4.10.** Caractérisation de la L-NNA comme inhibiteur de la NOS de rat. En a) courbe dose-réponse de la L-NNA sur l'activité NOS et b) cinétique enzymatique (présentée sous la forme graphique de Lineweaver-Burk) en présence de 5 et 10 μM de L-NNA; un  $K_i$  de  $0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$  a été calculé. Chaque point sur les graphiques est le résultat de trois essais.

téleencéphale contient entre autres le striatum, le thalamus et l'hippocampe; et le tronc cérébral contient le mésencéphale, la protubérance et le bulbe rachidien. L'activité maximale se retrouve dans le cervelet ( $123 \pm 11$  pmol de citrulline formée/mg prot/min) suivi par le tronc cérébral ( $75 \pm 7$  pmol de citrulline formée/mg prot/min), le téleencéphale ( $55 \pm 2$  pmol de citrulline formée/mg prot/min) et l'hypothalamus ( $53 \pm 5$  pmol de citrulline formée/mg prot/min), et l'activité la plus faible se retrouve dans le cortex frontal ( $41 \pm 3$  pmol de citrulline formée/mg prot/min). L'activité NOS est largement distribuée dans le cerveau de rat.



**FIGURE 4.11.** Distribution de l'activité NOS dans 5 structures neuroanatomiques du cerveau de rat. Pour chaque structure les résultats sont exprimés comme la moyenne  $\pm$  SEM (n=12).

#### 4.6 Caractérisation préliminaire de la NOS surrénalienne de rat

Les caractéristiques biochimiques de la NOSs sont décrites dans le tableau 4.1. Au niveau de l'essai enzymatique même, on peut noter qu'un surnageant des surrénales possède une activité NOS. Pour les quantités de protéines cytosoliques testées (1 à 390  $\mu$ g), la formation de citrulline était linéaire (coefficient de corrélation de 0.990). On doit aussi mentionner que la présence de 1 mM de magnésium est essentielle dans le milieu d'incubation sinon l'activité enzymatique n'est pas stable (triplicata très variable).

Paramètre étudié	Effets
1.2 mM NADPH	activité maximale (sans NADPH l'activité est 30% de la valeur optimale)
1 mM Calcium	à cette concentration, l'activité NOS est maximale
1 mM Magnésium	absolument nécessaire pour optimiser et stabiliser l'activité NOSs
$K_m$ (Arginine)	28 $\mu$ M
$V_{max}$ (Arginine)	84 pmol de citrulline formée/mg prot/min
sans 10 $\mu$ M $H_4B$	81% de l'activité NOS du témoin
sans 10 $\mu$ M FAD	78% de l'activité NOS du témoin
sans 10 $\mu$ M $H_4B$ et FAD	49% de l'activité NOS du témoin
500 $\mu$ M L-NMMA	40% de l'activité NOS du témoin
1 mM W-7	0% de l'activité NOS du témoin

**TABLEAU 4.1.** Caractéristiques de l'activité NOSs dans un surnageant de surrénales de rat.

#### 4.7 Caractérisation préliminaire de la NOS hépatique

Dans un homogénat de foie contrôle, une forte activité NOS semblait détectable dans les premières expériences (de la glycine à 50 mM était aussi présente dans le milieu d'incubation pour inhiber l'arginase). Par contre, la formation de produit marqué n'était pas proportionnelle à la quantité de protéines de foie présente dans le milieu d'incubation (300 à 1500  $\mu$ g de protéines). De plus, l'omission de NADPH, FAD et  $H_4B$  dans le milieu d'incubation ne cause aucune diminution de l'activité enzymatique. La présence de 1 mM de W-7 n'a eu aucun effet, alors que la présence de 2 mM d'EDTA a réduit l'activité à 40% du contrôle. La L-NMMA, à une concentration de 100  $\mu$ M, n'a causé aucune diminution de l'activité NOS.

Une portion du milieu d'incubation a été séparée par chromatographie sur couche mince en utilisant comme solvant un mélange butanol:propanol:hydroxide d'ammonium

(4:4:1). La révélation des acides aminés étudiés (arginine  $R_f=0.27$ , citrulline  $R_f=0.42$  et ornithine  $R_f=0.28$ ) a été faite à la ninhydrine. 4000 dpm correspondaient à la citrulline, 2000 dpm à l'arginine et 2500 à l'ornithine.

#### 4.8 Exposition de rat à des champs électromagnétiques (CEM) de 9.3 GHz

Le tableau 4.2 donne les valeurs de l'activité NOS mesurée dans les cerveaux des rats témoins et exposés aux CEM d'une fréquence de 9.3 GHz et aucune différence statistique n'est notable ( $P>0.05$ ). Le groupe témoin contient des rats qui sont de vrais témoins ainsi que des rats manipulés de façon similaire aux exposés.

STRUCTURE	EXPOSITION	ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE NOS	
		TÉMOIN	EXPOSÉ
Cortex frontal	Aiguë AM	32.8 ± 3.7 (9)	33.5 ± 3.8 (6)
Télocéphale	Aiguë AM	31.9 ± 1.8 (9)	31.2 ± 3.1 (6)

**TABLEAU 4.2.** Mesure de l'activité spécifique de la NOS chez les rats témoins et ceux ayant subi une exposition à des CEM d'une fréquence de 9.3 GHz. L'activité NOS est exprimée en pmol de citrulline formée/mg prot/min, sous la forme moyenne ± SEM, et l'analyse statistique utilisée est le test de t de Student,  $P<0.05$ .

Le tableau 4.3 donne les valeurs de l'activité NOS mesurée dans trois structures du cerveau chez des rats témoins et exposés aux CEM d'une fréquence de 9.3 GHz selon deux types d'exposition (aiguë ou chronique). Le groupe témoin est composé de trois vrais témoins et trois rats manipulés de façon similaire aux exposés. Pour les résultats obtenus dans le cervelet, aucune différence statistique n'est notable ( $P<0.05$ ) entre les activités NOS des animaux témoins ou exposés. On peut noter qu'à l'exception de l'exposition aiguë AM, l'activité NOS est plus élevée chez les exposés que chez les témoins. Les résultats d'activité NOS obtenus dans le cervelet, pour l'expérience aiguë PM sont beaucoup plus faibles que les autres. Ces résultats sont difficiles à expliquer puisque les standards internes et externes (qui permettent de vérifier la qualité des manipulations) de cette expérience donnaient des valeurs

typiques comparables aux autres expériences. Pour les résultats obtenus dans le cortex frontal, on peut noter que pour le groupe aigu AM, le groupe exposé possède une activité NOS significativement plus élevée que celle du groupe témoin,  $P < 0.05$ . Egalement, dans le groupe cortex chronique PM l'activité NOS du groupe exposé est significativement plus élevée que le groupe témoin,  $P < 0.05$ . Dans le tronc cérébral, les activités NOS mesurées chez les groupes témoins et les exposés aux CEM ne sont pas différentes statistiquement,  $P > 0.05$ .

STRUCTURE	EXPOSITION	ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE NOS	
		TÉMOIN	EXPOSÉ
Cervelet	Aiguë (AM)	174 ± 14 (5)	140 ± 31 (6)
	Aiguë (PM)	69 ± 7 (6)	90 ± 8 (6)
	Chronique (AM)	166 ± 8 (6)	202 ± 19 (5)
	Chronique (PM)	103 ± 18 (6)	127 ± 4 (6)
Cortex frontal	Aiguë (AM)	44.1 ± 0.4 (6)	58 ± 3 (6) *
	Aiguë (PM)	50 ± 6 (6)	43 ± 3 (6)
	Chronique (AM)	45 ± 3 (6)	45 ± 4 (6)
	Chronique (PM)	49 ± 2 (6)	56 ± 2 (5) *
Tronc cérébral	Aiguë (AM)	54 ± 4 (6)	51 ± 4 (4)
	Aiguë (PM)	56 ± 3 (6)	58 ± 3 (6)
	Chronique (AM)	156 ± 13 (6)	153 ± 3 (6)
	Chronique (PM)	130 ± 7 (6)	137 ± 8 (6)

**TABLEAU 4.3.** Mesure de l'activité NOS dans trois structures du cerveau de rat chez des individus témoins et exposés aux CEM d'une fréquence de 9.3 GHz. L'activité de la NOS est exprimée en pmol de citrulline formée/mg prot/min, et les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM. Le test de t de Student a été utilisé pour comparer les groupes témoins et exposés, en utilisant une valeur de alpha de 0.05. \* $P < 0.05$ .

Le tableau 4.4 donne les valeurs de l'activité NOS mesurée dans trois structures du cerveau de rat chez des animaux témoins et exposés aux CEM d'une fréquence de 0.915 GHz. Seulement le groupe cortex chronique PM possède une différence statistique avec le

groupe témoin,  $P < 0.05$ . On peut aussi remarquer que, comme au tableau 4.3, l'activité NOS est plus élevée dans le cervelet des rats exposés que dans ceux des témoins.

STRUCTURE	TYPE D'EXPOSITION	ACTIVITÉ NOS	
		TÉMOIN	EXPOSÉ
Cervelet	Chronique AM	262 ± 29 (6)	275 ± 22 (5)
	Chronique PM	272 ± 19 (6)	280 ± 11 (6)
Cortex frontal	Chronique AM	72 ± 7 (5)	66 ± 3 (6)
	Chronique PM	68 ± 3 (6)	79 ± 3 (6) *
Tronc cérébral	Chronique AM	98 ± 8 (4)	117 ± 15 (6)
	Chronique PM	81 ± 6 (6)	79 ± 6 (6)

**TABLEAU 4.4.** Mesure de l'activité NOS dans trois structures du cerveau de rat chez des animaux témoins et exposés aux CEM d'une fréquence de 0.915 GHz. L'activité NOS est exprimée en pmol de citrulline formée/mg prot/min, et les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM. Le test de t de Student a été utilisé pour comparer statistiquement les groupes témoins et exposés avec une valeur de alpha de 0.05. \*,  $P < 0.05$ .

## CHAPITRE 5

### DISCUSSION

#### 5.1 Caractérisation de la NOS du cerveau de chat

Nous nous sommes assurés, dès le départ de nos études biochimiques, que la formation de citrulline était linéaire en fonction de la quantité de protéines cytosoliques de cerveau de chat ajoutées au milieu d'incubation. Ce résultat a permis de s'assurer que l'activité spécifique de la NOS, exprimée en pmol de citrulline formée/min/mg prot, n'était pas influencée par la quantité de protéines ajoutées au milieu d'incubation lorsque celle-ci se situait entre 0.05 et 0.8 mg lors des diverses séries de mesures. Aucune expérience de ce genre n'est rapportée dans la littérature, mais il est permis de croire que la majorité des équipes travaillant sur la NOS ont réalisé ce type d'expérience avant de publier leurs résultats. Un des produits de la réaction, la citrulline, n'a pas le potentiel d'inhiber la NOS de rat à une concentration de 200  $\mu$ M. Cette observation est importante puisqu'elle permet de conclure que lorsqu'on mesure l'activité NOS *in vitro*, la formation de citrulline n'entraîne pas de complication.

Les études de l'effet du pH sur l'activité de la NOS ont montré un pic d'activité à un pH de 7.5. L'activité de la NOS n'est pas statistiquement différente pour des valeurs de pH allant de 6.6 à 8.0. Des résultats chez le rat avec une enzyme semi-purifiée montrent que le pH optimum se situe entre 7.8 et 8.0 et qu'à l'extérieur de ces valeurs, l'activité de la NOS diminue significativement (Stuehr et Griffith, 1992). Des études plus poussées à l'aide d'une NOS purifiée seront donc nécessaires pour bien caractériser la stabilité et l'activité de l'enzyme vis-à-vis le pH.

L'activité de la NOS du cerveau de chat s'est aussi avérée dépendante de la présence de NADPH puisqu'en absence de ce cofacteur, l'activité de la NOS n'était que de 7% de la valeur témoin (1 mM de NADPH), ce qui est en accord avec la littérature (Gorsky *et al.*, 1990). Toutes les isoformes de la NOS mesurées chez les espèces animales étudiées se sont avérées être une enzyme dépendante du NADPH et les résultats sur la NOS de chat ne font pas exception.

L'activité de la NOS de chat s'avère aussi dépendante de la présence de calcium puisque l'ajout de ce dernier au milieu d'incubation augmente l'activité de la NOS. L'ajout d'un chélateur du calcium, l'EDTA, inhibe significativement l'activité de la NOS, ce qui est aussi rapporté pour la NOS du cerveau de rat (Bredt et Snyder, 1990); ce résultat montre bien l'importance du calcium dans la réaction catalysée par la NOS du cerveau de chat. L'ajout de calmoduline exogène au milieu d'incubation n'empêche pas l'inhibition causée par l'EDTA suggérant ainsi que le calcium doit interagir de concert avec la calmoduline pour activer la NOS.

Même si la dépendance de la NOS envers la calmoduline n'a pas été démontrée en ajoutant de la CaM au milieu d'incubation, l'ajout de W-7, un antagoniste de la CaM, au milieu d'incubation cause une inhibition presque complète de l'activité enzymatique. Des résultats semblables ont été obtenus dans le cerveau de rat en utilisant les composés W-5 et W-13 (Bredt et Snyder, 1990) et de même que le W-7 (Hiki *et al.* 1991). La NOS de cerveau de chat est donc elle aussi une enzyme dépendante du tandem calcium/CaM à l'instar des NOS constitutives caractérisées jusqu'à maintenant. Il est logique de suggérer que l'entrée de calcium à l'intérieur des neurones soit *in vivo* la principale régulation de l'activité de la NOS, via une interaction avec la CaM.

La tétrahydrobioptérine ( $H_4B$ ) est un cofacteur qui se lie de manière non-covalente à la NOS, et qui peut donc se dissocier de l'enzyme lors de la purification ou bien de la préparation du surnageant NOS qui est utilisé comme source de NOS. L'ajout de  $H_4B$  au

milieu d'incubation permet donc de saturer à nouveau la NOS présente dans le surnageant NOS. La "recharge" de la protéine en H<sub>4</sub>B augmente son activité enzymatique, tel que démontré à la figure 3.8. À partir de ce résultat, on peut conclure qu'il est important d'ajouter de la H<sub>4</sub>B lorsqu'on utilise un surnageant NOS de façon à mesurer l'activité optimale de la NOS. Ceci contredit la position de Bredt *et al.* (1991) qui ont suggéré que la H<sub>4</sub>B était un cofacteur exclusif à la NOS inductible et que la NOS neuronale n'en avait pas besoin. Les travaux sur le rôle de la H<sub>4</sub>B dans l'activité de la NOS de chat entrepris dans le cadre de ce mémoire ont montré que la H<sub>4</sub>B est un cofacteur de l'enzyme neuronale de chat et, tout récemment d'autres groupes sont arrivés à la même conclusion pour les NOS constitutives chez d'autres espèces (Scott-Burden, 1995).

Il est rapporté que la 6-méthyl- et la 6,7-diméthyl-H<sub>4</sub>B peuvent stimuler l'activité de la NOS des macrophages (Kwon *et al.*, 1989). Ces deux métabolites de la H<sub>4</sub>B sont reconnus comme des cofacteurs des hydroxylases des acides aminés aromatiques, lesquelles sont des enzymes qui se retrouvent dans le cerveau. Notre étude de l'effet de ces deux métabolites sur la NOS de chat, à des concentrations comparables à celles utilisées par Kwon *et al.* (1989), n'a révélé aucun potentiel activateur pour ces molécules. La NOS de chat semble donc sélective à la tétrahydrobioptérine et insensible à ces métabolites méthylés.

Les études sur l'ajout de flavines au milieu d'incubation ont montré que le FAD augmente significativement l'activité de la NOS de chat, alors que le FMN n'a aucun effet. La combinaison de FAD et de FMN n'active pas d'avantage l'activité enzymatique. La NOS est une flavoprotéine liant d'une manière non-covalente le FMN et le FAD (Bredt *et al.*, 1991). Mais lors de la préparation du surnageant ou de la purification de la NOS, le cofacteur FAD est en partie séparé de la NOS. C'est pour cette raison que dans les expériences entreprises dans ce mémoire, l'activité de la NOS s'est révélée être significativement augmentée par l'ajout de FAD. Par contre, le FMN est sans effet sur l'activité de l'enzyme probablement parce qu'il est lié plus fortement à la NOS. Pour la cytochrome P-450 réductase, le FMN se lie très faiblement et le FAD plus fortement (Strubel et Dignam, 1977).

À partir de ces résultats, on peut conclure qu'il est important d'ajouter du FAD au milieu d'incubation lorsqu'on mesure l'activité de la NOS en utilisant un surnageant NOS afin de mesurer une activité enzymatique optimale.

Le glutamate, lorsqu'il se lie aux récepteurs du glutamate dans le cerveau, cause une augmentation du calcium intracellulaire qui active la NOS (Bredt et Snyder, 1989). Des travaux ont été entrepris pour vérifier si le glutamate pouvait exercer un effet modulateur directement sur la NOS. Les résultats obtenus montrent que le glutamate n'a aucun effet sur la NOS dans le cerveau de chat

La possibilité d'un rôle modulateur pour le pyridoxal 5'-phosphate, un cofacteur des décarboxylases, a été vérifiée sur la NOS et aucun effet significatif n'a été observé. La possibilité que la citrulline le produit de la réaction vienne rétroinhiber l'activité de la NOS a aussi été vérifiée. En présence de 200  $\mu$ M de citrulline ajoutée au milieu d'incubation complet, l'activité de la NOS n'était pas affectée lorsque comparée à la valeur témoin. Donc, à des concentrations comparables à celles de l'arginine, la citrulline n'inhibe pas l'activité de la NOS. Plusieurs études s'attardant au rôle inhibiteur du produit de la réaction, le NO, ont été relevées dans la revue de la littérature, mais aucune ne portait sur l'étude de l'effet de la citrulline.

Aucun autre donneur d'électrons que le NADPH n'a été démontré être un substrat de la NOS. La vitamine C, un donneur d'électrons n'active pas la NOS de chat à des concentrations inférieures à 1 mM. Lorsque la concentration de vitamine C était supérieure à 1 mM, une précipitation des protéines était observée, empêchant ainsi des études d'activité à ces concentrations. Tout récemment, Hofmann et Schmidt (1995) ont montré que lors d'une incubation de 60 min, la vit C à 1 mM active la NOS purifiée de cerveau de porc. Ils suggèrent que la vitamine C agit en recyclant la  $H_4B$ , ce qui causerait une augmentation de l'activité NOS. Les résultats obtenus dans ce mémoire ne démontrent aucun effet de 1 mM de vitamine C sur la NOS semi-purifiée de cerveau de chat, et ce pendant la même période.

Il a d'abord été rapporté que la NOS pourrait possiblement contenir du fer non hémique (Stuehr et Griffith, 1992). Aujourd'hui, il est connu que la NOS est une hémoprotéine (Marletta, 1994). Nous avons vérifié l'effet du fer ferrique sur l'activité de la NOS et aucun effet n'a été observé à une concentration de 10  $\mu\text{M}$ . À une concentration de 1 mM, une précipitation des protéines était observable et empêchait ainsi les mesures. Il a été rapporté dans la littérature que le fer ferrique inhibait la NOS pour des concentrations allant de 10 à 100  $\mu\text{M}$  (Weiss *et al.*, 1994) dans un milieu semi-purifié. Ceci est en accord avec nos observations s'appuyant sur un milieu semblable et qui ne montrent aucune inhibition à 10  $\mu\text{M}$  de fer ferrique.

Les paramètres cinétiques ont été déterminés pour la NOS semi-purifiée : le  $V_{\text{max}}$  était de 59 pmol de citrulline/mg prot/min et le  $K_m$  de 41  $\mu\text{M}$ . On retrouve dans la littérature, pour la NOS de rat neuronale de rat présente dans le cortex frontal un  $V_{\text{max}}$  de 42 pmol de citrulline/mg prot/min et un  $K_m$  de 8.4  $\mu\text{M}$  (Moncada *et al.*, 1989), et dans le cervelet, un  $V_{\text{max}}$  de 160 pmol de citrulline formée/mg prot/min et un  $K_m$  de 6  $\mu\text{M}$  (Bredt et Snyder, 1989). Les constantes cinétiques obtenues dans le cerveau de chat sont donc du même ordre de grandeur que celles rapportées pour le cerveau de rat. Il est bon de rappeler que le surnageant NOS avait été épuré de son arginine, par une chromatographie échangeuse d'ions, et que par conséquent, les concentrations d'arginine présentes dans les milieux d'incubation étaient connues avec exactitude. Aussi, les constantes cinétiques déterminées sont valables en regard de leur nature quantitative, mais il est bon de rappeler qu'elles proviennent d'une étude sur un milieu semi-purifié.

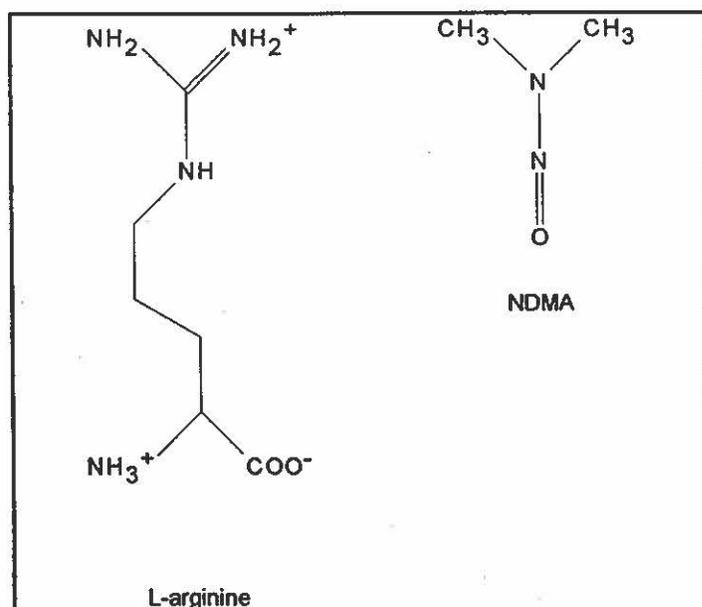
Les résultats obtenus sur le rôle activateur de la  $\text{H}_4\text{B}$  et du FAD laissaient croire qu'en présence de ces molécules le  $V_{\text{max}}$  serait plus élevé. Les résultats obtenus ont confirmé ceci, à savoir que le  $V_{\text{max}}$  passe de 59 à 118 pmol de citrulline/mg prot/min lors de l'addition du FAD et de la  $\text{H}_4\text{B}$ . Ce résultat s'explique par le fait que dans ces conditions expérimentales la NOS est complètement chargée en  $\text{H}_4\text{B}$  et FAD, ce qui optimiserait le transfert d'électrons

du NADPH vers l'arginine et la réaction d'hydroxylation de l'arginine rendant ainsi optimale la réaction globale catalysée par la NOS. Les résultats concernant l'effet du FAD et de la H<sub>4</sub>B sur le K<sub>m</sub> sont très intéressants : la constante d'affinité passe de 41 à 11 µM lorsque du FAD et de la H<sub>4</sub>B sont ajoutés au milieu d'incubation. Ainsi en présence de ces cofacteurs, la NOS du cerveau de chat a plus d'affinité pour son substrat, la L-arginine, qu'en absence de ces cofacteurs. On peut donc suggérer que le FAD et la H<sub>4</sub>B stabilisent les interactions enzyme-substrat, probablement en stabilisant la structure de la protéine. Il est aussi possible de supposer que le FAD n'a peu de rôle à jouer dans la stabilisation des interactions enzyme-substrat puisque, physiquement, ils est lié à l'extrémité C-terminale de la NOS alors que le site catalytique est à l'extrémité N-terminale ou la H<sub>4</sub>B est probablement liée (voir figure 1.6). Les résultats obtenus sont en accord avec le modèle de modulateur allostérique proposé comme rôle pour la H<sub>4</sub>B dans la réaction enzymatique, soit qu'une molécule de H<sub>4</sub>B permet la formation de plusieurs molécules de produit et qu'elle ne joue pas nécessairement un rôle redox.

Deux inhibiteurs de la NOS, la L-N<sup>ω</sup>-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) et la L-N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA), ont été étudiés sur la NOS de chat. Pour la L-NMMA, un K<sub>i</sub> de 0.35 µM a été déterminé et alors que L-NNA démontrait un K<sub>i</sub> de 0.041 µM. Ces deux inhibiteurs sont de nature compétitive puisque les courbes d'inhibition se recoupent sur l'ordonné (figure 3.12). Les valeurs de K<sub>i</sub> rapportées pour la L-NMMA sont : 2.7 µM (Olken *et al.*, 1994), 1.5 µM (Bredt et Snyder, 1989), 0.94 µM (Pollock *et al.*, 1991) et 1.4 µM (Bredt et Snyder, 1990). Le K<sub>i</sub> calculé pour la NOS de chat est donc du même ordre de grandeur que ceux retrouvés pour les autres NOS. Pour la L-NNA, des valeurs de K<sub>i</sub> ont aussi été rapportées dans la littérature : 0.16 µM (Pollock *et al.*, 1991) et 0.9 µM (Stuehr et Griffith, 1992). Le K<sub>i</sub> que nous avons déterminé pour la NOS de chat est donc plus petit que ceux rapportés dans la littérature, mais quand même d'un ordre de grandeur comparable. De ces observations, on peut conclure que la L-NNA est un inhibiteur approximativement dix fois plus puissant pour inhiber la NOS de chat que la L-NMMA. Aussi, pour la poursuite

d'études futures où l'on voudrait injecter un inhibiteur de la NOS *in vivo*, un ester de la L-NNA serait probablement le composé le plus intéressant puisqu'il est très puissant.

Une autre molécule, la nitrosodiméthylamine (NDMA), a été étudiée comme un inhibiteur potentiel de la NOS. La NDMA est connue pour désaminer l'ADN et ainsi créer des mutations. À la figure 3.13, on remarque clairement que la NDMA possède un potentiel à inhiber la NOS, avec un  $IC_{50}$  de 75 mM. La puissance de cet inhibiteur est très faible lorsque comparée à celle de la L-NMMA ou de la L-NNA.



**FIGURE 5.1** Structure de la L-arginine et de la nitrosodiméthylamine (NDMA).

L'étude de la distribution de l'activité de la NOS dans onze structures du cerveau de chat a montré que l'activité maximale se retrouve dans le cervelet, ce qui est en accord avec les études d'immunohistochimie où le cervelet est la structure la plus réactive pour la NOS (Bredt et Snyder, 1991). Le cervelet est le tissu le plus riche en GMPc et il est probable que ce messager secondaire soit très important dans les fonctions physiologiques du cervelet, et en particulier dans la motricité. La NOS du cervelet pourrait donc fonctionner comme un

activateur de la guanylyl cyclase par l'intermédiaire du NO, ce qui résulterait en une augmentation de GMPc. Dans les autres structures, les activités de la NOS sont plus faibles mais on peut aussi supposer que le NO jouerait encore une fois un rôle d'activateur de la guanylyl cyclase ainsi que de régulateur de la microcirculation cérébrale (Iadecola, 1993). En somme, l'activité NOS est largement distribuée dans le cerveau de chat suggérant ainsi que le NO joue un rôle important dans le cerveau. L'étude de la distribution de l'activité NADPH-diaphorase, qui est parallèle à la distribution de la NOS (Dawson *et al.*, 1991), révélait une distribution très large dans le cerveau de chat (Mizukawa *et al.*, 1988 a)b); Mizukawa *et al.*, 1989). Les résultats obtenus sur la mesure de l'activité NOS dans le cerveau de chat sont donc en accord avec ceux obtenus par la réactivité de l'activité de la NADPH-diaphorase. De plus, en regard de la distribution des catécholamines dans le cerveau de chat, la distribution de la NOS correspond à celle de la dopamine- $\beta$ -hydroxylase où une activité appréciable est retrouvée dans l'hypothalamus et les régions des noyaux de raphé, et une activité faible est retrouvée dans les structures appartenant au système moteur, entre autres le cortex frontal (Blais, 1991). Une exception est dans le cervelet où l'activité de la NOS est la plus élevée alors qu'elle est faible pour la dopamine- $\beta$ -hydroxylase. La dopamine- $\beta$ -hydroxylase et la NOS sont colocalisées dans les cellules du ganglion cervical supérieur bovin (Sheng *et al.*, 1993).

## 5.2 Caractérisation de la NOS du cerveau de rat

Suite à la mise au point d'une technique optimisée pour la mesure de l'activité de la NOS neuronale de chat, nous avons poursuivi nos études biochimiques pour la NOS neuronale de cerveau de rat de façon à obtenir une activité optimisée et une comparaison interspèces qualitative pour cette NOS constitutive. Néanmoins, il faut souligner que la littérature est nettement plus abondante sur la caractérisation de la NOS neuronale de rat. De fait, les résultats ont montré une grande similarité de l'enzyme chez les deux espèces. Les paragraphes qui suivent discuteront du détail des résultats chez le rat.

La NOS de cerveau de rat s'est avérée dépendante du NADPH comme proposé par Bredt et Snyder (1990). Ils ont exploité cette caractéristique de la NOS pour réussir la première purification. Ils ont utilisé une résine de 2'5'-ADP-agarose sur laquelle la NOS adhère par sa région qui lie le NADPH (le 2'5'-ADP a une homologie avec le NADPH).

Le calcium s'est avéré un ion important dans l'activité de la NOS de chat puisqu'en présence d'EGTA et d'EDTA à une concentration de 2 mM, l'activité de la NOS était à 10% de la valeur du témoin. La calmoduline exogène n'activait pas la NOS, mais l'ajout d'un antagoniste de la CaM, le W-7, inhibait complètement l'activité de la NOS à une concentration de 500  $\mu$ M. Les résultats confirment la NOS de cerveau de rat comme une enzyme dépendante du tandem calcium/CaM. Une  $IC_{50}$  de 150  $\mu$ M a été déterminée pour le W-7 alors que pour un composé semblable, le W-13, Bredt et Snyder (1990) ont montré une  $IC_{50}$  de 70  $\mu$ M.

Bredt *et al.* (1991) ont proposé que la  $H_4B$  ne soit pas un cofacteur de la NOS du cerveau de rat. Ce résultat semblait surprenant puisque la NOS des macrophages utilisait la  $H_4B$  comme cofacteur et que Mayer *et al.* (1991) ont montré que ce cofacteur était liée à la NOS de porc. Les présents travaux ont démontré que la NOS de rat est activée par la  $H_4B$  alors que deux de ses métabolites méthylés n'ont aucun effet. La  $H_4B$  est probablement séparée de la NOS lors de la préparation du surnageant NOS utilisé pour mesurer l'activité de la NOS et un apport exogène de  $H_4B$  recharge la NOS en  $H_4B$  et permet de mesurer une activité maximale. Donc, il s'avère important d'ajouter de la  $H_4B$  lorsqu'on mesure l'activité de la NOS à partir d'un surnageant semblable à celui utilisé dans les présents travaux. Kwon *et al.* (1989) ont montré que la 6-méthyl- et la 6,7-diméthyl- $H_4B$  pouvaient activer la NOS des macrophages, mais dans les présents travaux sur la NOS du cerveau de rat, ces métabolites de la  $H_4B$  n'ont eu aucun effet suggérant ainsi que l'enzyme du cerveau est sélective pour la  $H_4B$ .

La NOS étant une flavoprotéine, la perte d'une partie des flavines FAD et FMN est prévisible lors de la préparation du surnageant NOS ou la purification de l'enzyme. L'ajout de FAD au milieu d'incubation active l'activité de la NOS de rat, probablement en rechargeant les molécules de NOS qui ont été dissociées du cofacteur. L'ajout de FMN n'a aucun effet sur l'activité de la NOS lorsqu'elle est comparée à une valeur témoin. Le FMN est probablement lié plus fortement à la NOS que le FAD, un phénomène qui est contraire à celui observé pour la cytochrome P-450 réductase (Strubel et Dignam, 1977). Il faut donc conclure que pour mesurer une activité optimale, il est essentiel d'ajouter du FAD au milieu d'incubation lorsqu'on utilise un surnageant NOS ou toute autre préparation semi-purifiée.

L'observation que l'ajout de FAD et H<sub>4</sub>B causait une augmentation très importante de l'activité de l'enzyme suggérait que le  $V_{max}$  de la NOS serait modifié par l'ajout de ces molécules. Les paramètres cinétiques de la NOS de rat ont donc été mesurés en présence et en absence de FAD et de la H<sub>4</sub>B. Comme attendu, le  $V_{max}$  qui était de 149 pmol de citrulline/mg prot/min en absence de FAD et H<sub>4</sub>B a augmenté à 185 pmol de citrulline/mg prot/min suite à l'ajout de ces molécules. Un  $K_m$  de 19.3  $\mu$ M a été déterminé en absence des cofacteurs, et leur ajout a porté le  $K_m$  à 4.8  $\mu$ M. Ce résultat est très intéressant puisqu'il suggère que la NOS de rat possède quatre fois plus d'affinité pour son substrat, l'arginine, lorsqu'elle est saturée en FAD et H<sub>4</sub>B. Aussi les cofacteurs FAD et FMN permettent une stabilisation des interactions enzyme-substrat probablement en stabilisant la structure de la protéine. Ce résultat est en accord avec le modèle de modulateur allostérique qui est proposé pour la H<sub>4</sub>B dans la réaction catalysée par la NOS (section 1.6, p.15).

Deux inhibiteurs, compétitifs vis-à-vis l'arginine, de la NOS de rat ont été étudiés. Pour la L-N<sup>o</sup>-monométhyl-L-arginine, une IC<sub>50</sub> de 40  $\mu$ M a été déterminée (en présence de 200  $\mu$ M d'arginine) et un K<sub>i</sub> de 1.19  $\mu$ M. La nature compétitive des deux inhibiteurs a été confirmée puisque les droites de Lineweaver-Burk se recoupent sur l'ordonnée (voir figure 4.9 et 4.10). Dans la littérature, quelques IC<sub>50</sub> ont été rapportées pour la L-NMMA mais les valeurs ne sont pas comparables avec celles obtenues dans le présent travail puisque la

concentration d'arginine présente dans le milieu d'incubation était beaucoup plus faible. Le  $K_i$  de 1.19  $\mu\text{M}$  est plus élevé que celui mesuré pour la NOS de chat ( $K_i$  de 0.35  $\mu\text{M}$ ) mais se compare bien à ceux rapportés dans la littérature, soit : 2.7  $\mu\text{M}$  (Olken *et al.*, 1994), 1.5  $\mu\text{M}$  (Bredt et Snyder, 1989), 0.94  $\mu\text{M}$  (Pollock *et al.*, 1991) et 1.4  $\mu\text{M}$  (Bredt et Snyder, 1990). Pour la L-N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA), un  $\text{IC}_{50}$  d'environ 25  $\mu\text{M}$  a été observé et un  $K_i$  de 0.22  $\mu\text{M}$  a été calculé. Les valeurs de  $K_i$  pour la L-NNA retrouvées dans la littérature sont du même ordre de grandeur : 0.16  $\mu\text{M}$  (Pollock *et al.*, 1991) et 0.9  $\mu\text{M}$  (Stuehr et Griffith, 1992). Tout comme observé chez le chat et rapporté pour le rat dans la littérature, la L-NNA est un inhibiteur plus puissant que la L-NMMA pour inhiber la NOS de rat.

La distribution de l'activité NOS dans cinq structures du cerveau de rat montre que la NOS est largement distribuée dans le système nerveux central de rat et que le NO qu'elle produit joue des rôles importants dans l'activation de la guanylyl cyclase et de la régulation de la micro-circulation cérébrale. L'activité maximale de la NOS de rat se retrouvait dans le cervelet, plus faible dans le cortex frontal, et une activité intermédiaire se retrouve dans le tronc cérébral, le télencéphale et l'hypothalamus. Des résultats identiques pour une activité enzymatique NOS, mesurée à partir de la formation de GMPC, ont été rapportés pour le cervelet, l'hypothalamus et le cortex frontal (Förstermann *et al.*, 1990).

### **5.3 Caractérisation préliminaire de l'activité NOS dans les glandes surrénales de rat**

L'activité de la NOSs a été étudiée biochimiquement pour la première fois dans le présent mémoire. L'activité enzymatique s'est avérée dépendante du NADPH, comme les autres NOS constitutives caractérisées jusqu'à maintenant. L'ajout de calcium permettait d'obtenir une activité optimale, montrant que cette NOS est aussi dépendante du calcium. L'ajout de l'antagoniste de la CaM W-7 inhibe complètement l'activité de la NOS des surrénales montrant que c'est une enzyme qui est dépendante du tandem calcium/CaM tout comme les autres NOS constitutives caractérisées jusqu'à maintenant. L'omission du FAD

et de la H<sub>4</sub>B au milieu d'incubation cause une diminution importante de l'activité NOS des surrénales. Il est donc important d'ajouter ces cofacteurs dans le milieu d'incubation pour mesurer une activité maximale. L'activité était aussi inhibée par la monométhyl-arginine, un inhibiteur compétitif de la NOS. Les paramètres cinétiques ont indiqué un  $V_{max}$  de 84 pmol de citrulline/mg prot/min et un  $K_m$  de 28  $\mu$ M ont été observés. La présence de magnésium était aussi requise pour stabiliser l'activité enzymatique. Un résultat semblable a été rapporté pour la NOS des macrophages de rat, bien qu'une fois purifiée la NOS n'avait plus besoin de  $Mg^{++}$  (Hevel et Marletta, 1994). En somme, l'activité enzymatique présente dans les surrénales est très similaire à celle qui est présente dans le cerveau. Palacios *et al.* (1989) ont rapporté que la présence de calcium et d'arginine était nécessaire pour avoir une activité de synthèse de NO. Des études futures visant à purifier la NOS surrénalienne seront nécessaires pour confirmer que le fonctionnement de la NOS des surrénales est comparable aux NOS constitutives déjà caractérisées et pour mieux comprendre le rôle que peut jouer le NO dans ces glandes.

#### 5.4 Étude de la NOS hépatique

L'activité de la NOS mesurée dans un surnageant NOS de foie semblait être un artefact puisque même en absence de NADPH ajouté, un produit radioactif était détecté. La présence de W-7 et L-NMMA n'empêchait pas la formation du produit radioactif. Il est donc clair que ce qui est mesuré n'est pas une activité NOS. Un soin particulier avait été apporté pour inhiber l'activité de l'arginase, qui est présente en bonne quantité dans le foie, en ajoutant 50 mM de glycine qui est un inhibiteur de l'arginase.

Stuehr et Griffith (1992) ont rapporté l'existence d'une NOS inductible dans le foie, et les résultats obtenus de ce mémoire ne démontrent pas d'activité constitutive de la NOS dans le foie. Pour aller un peu plus loin, une portion du milieu d'incubation a été séparée par chromatographie sur couche mince. Des fractions radioactives correspondant à l'arginine, la citrulline et l'ornithine ont été séparées. On peut suggérer que ce sont les enzymes du cycle

de l'urée qui sont responsables d'un métabolisme de l'arginine puisqu'on retrouve de l'ornithine radioactive dans le milieu d'incubation. L'ajout de glycine ne semble donc pas suffisant pour stopper le métabolisme de l'arginine. Aussi, dans le foie, il n'a pas été possible de détecter une activité constitutive de la NOS et il est probable que cette forme de NOS ne soit pas présente dans ce tissu.

### **5.5 Effet des champs électromagnétiques (CEM) sur l'activité de la NOS**

Le Dr. Roberge a émis l'hypothèse que l'activité de la NOS pourrait être modulée par les CEM en raison de l'effet stressant de ces derniers. En effet, une augmentation de la concentration des catécholamines ainsi que de l'activité de la dopamine- $\beta$ -hydroxylase dans le sérum de rat suite à une exposition aux CEM reflètent la nature stressante de ces derniers (A. G.Roberge, résultats non-publiés). Aussi, il a été proposé d'utiliser la technique mise au point dans ce mémoire pour étudier l'effet des CEM sur la NOS.

L'exposition de rat à des radiofréquences de type aigu de 9.3 GHz a été conduite à deux reprises, la première occasion a révélé aucune différence significative dans l'activité de la NOS mesurée dans le cortex frontal et le télencéphale, alors que la deuxième occasion, une différence statistique a été observée uniquement pour une exposition aiguë conduite le matin. Donc ces deux expériences conduites dans les mêmes conditions n'ont pas systématiquement démontré les mêmes effets, et de plus, il faut noter que l'écart d'activité entre les témoins et les exposés est très faible.

Des expositions chroniques réalisées en après-midi ont révélé une différence statistiquement significative dans l'activité de la NOS dans le cortex frontal des rats exposés à 9.3 et 0.915 GHz. Aussi, l'ensemble de ces observations ne révèle aucune modulation de la NOS par les CEM qui correspondrait à un effet significatif au point de vue biologique susceptible de se traduire par un changement physiologique.

Il est bien de garder en mémoire que l'effet des micro-ondes sur l'activité de la NOS, si il y en a un, est peut être transitoire de sorte que le protocole expérimental utilisé dans la présente étude ne permet pas de le détecter. Une réflexion *à posteriori* nous indique que l'utilisation d'animaux pour ce genre d'étude engendre l'introduction de plusieurs paramètres non-contrôlés. Entre autre, on peut se demander si les micro-ondes induisent la même perméabilité membranaire au calcium dans le cerveau d'animaux vivants que dans un système *in vitro* de neurones en cultures? Il est clair que, dans le futur, d'autres paramètres physiologiques devront être étudiés chez des rats suivant une exposition à des champs électromagnétiques. La présente étude représente un pas en avant dans l'étude de l'effet biologique des micro-ondes. Les conditions d'exposition très bien définies par une équipe d'ingénieurs ainsi que la mesure de l'activité de la NOSn de rat qui a été faite avec une technique très rigoureuse le démontre. La mesure de l'activité NOSn est toutefois un paramètre physiologique sur lequel les champs électromagnétiques n'ont apparamment pas d'effet particulier.

## CONCLUSION

Le présent travail constitue la première étude de l'activité de la NOS neuronale dans le cerveau de chat. Cette enzyme qui, tel que nous l'avons montré, est tout à fait similaire à celle du cerveau de rat, s'avère dépendante de la présence de NADPH et du couple calcium/calmoduline. De plus, l'activité enzymatique est significativement augmentée par l'addition de FAD et de tétrahydrobioptérine au milieu d'incubation. La NOS neuronale de chat a une affinité spécifique pour la H<sub>4</sub>B puisque deux métabolites méthylés de cette dernière ont failli à activer l'enzyme. Nos études cinétiques en présence et en absence des cofacteurs FAD et H<sub>4</sub>B ont permis de confirmer un rôle de modulateur de type allostérique de la H<sub>4</sub>B dans la réaction NOS, une hypothèse présente dans la littérature. De plus, notre analyse de la distribution de l'activité de la NOS dans onze structures neuroanatomiques du cerveau de chat a révélé que l'activité la plus grande est présente dans le cervelet et que la plus faible se situe dans le mésencéphale.

La caractérisation préliminaire de l'activité NOS présente dans les glandes surrénales est une première dans la littérature. Ces travaux ont permis de montrer que la NOS surrénalienne est une enzyme qui est dépendante du tandem calcium/calmoduline et qui a besoin de NADPH comme source d'électrons. La cinétique a aussi été décrite au moyen de nos études

L'exposition de rats à des champs électromagnétiques n'a pas eu d'effet appréciable sur la NOS neuronale sauf pour trois comparaisons particulières entre les témoins et les exposés qui ont révélé une différence statistiquement significative. Néanmoins, ces différences étant très faibles, aucune conclusion de nature biologique ne peut être rendue quant à la signification de ces différences.

## RÉFÉRENCES

- ABU-SOUD H.M. et Stuehr D.J. "Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; vol 90: p. 10769-10772.
- ABU-SOUD H.M., Yoho L. L. et Stuehr D. J. "Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism". J. Biol. Chem. 1994 a); vol 269 (51): p.32047-32050.
- ABU-SOUD H.M., Feldman P. L. , Clark P. et Stuehr D. J. "Electron transfer in the nitric oxide synthases." J. Biol. Chem. 1994 b); vol 269 (51): p.32318-32326.
- BERNARDT J.H. "Non-ionizing radiation safety: radiofrequency radiation, electric and magnetic fields." Phys.Med.Biol. 1992; vol 37 (4): p.807-844.
- BLAIS E. 1991 "Mesure de l'activité spécifique de la choline acétyltransférase du cerveau de chat suite à une supplémentation en lécithine et en vitamine B12: potentialisation de la transmission cholinergique." Mémoire de maîtrise, Université Laval : p.1-215.
- BRADFORD M.M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochem. 1976; vol 72: p.248-254.
- BREDDT D. S. et Snyder S. H. "Nitric oxide mediates glutamate- linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1989; vol 86: p.9030-9033.
- BREDDT D.S., Hwang P. M. et Snyder S. H. "Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide." Nature. 1990; vol 347: p.768-770.
- BREDDT D.S. et Snyder S.H. "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1990; vol 87: p.682-685.
- BREDDT D.S., Hwang P. M. , Glatt C. E. , Lowenstein C. , Reed R. R. et Snyder S. H. "Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase." Nature. 1991; vol 351: p.714-718.
- BREDDT D.S. et Snyder S.H. "Nitric oxide as a neuronal messenger." TIPS. 1991; vol 12: p125-128.

BUSSE R. et Mülsh A. "Calmodulin-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin." FEBS Lett. 1990; vol 265: p.133-136.

CHAYEN J., Bitensky L. et Mehdizadeh S. "Histo- and cytochemistry of guanylate cyclase and nitric oxide synthase: a critical appraisal." Cell Biochem. Funct. 1994; vol 12: p.179-183.

CHEN P.F., Tsai A. L. et Wu K. K. "Cysteine 184 of endothelial nitric oxide synthase is involved in heme coordination and catalytic activity." J. Biol. Chem. 1994; vol 269 (40): p.25062-25066.

CHO H.J., Xie Q. W. , Calaycay J. , Mumford R. A. , Swiderek K. M. , Lee T. D. et Nathan C. "Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages." J. Exp. Med. 1992; vol 176: p.599-604.

DAWSON T.M., Bredt D. S. , Fotuhi M. , Hwang P. M. et Snyder S. H. "Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissues." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1991; vol 88: p.7797-7801.

DINERMAN J.L., Dawson T. M. , Schell M. J. , Snowman A. et Snyder S. H. "Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1994; vol 91: p.4214-4218.

DUN N.J., Dun S. L. et Forsermann U. "Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat pontine medullary neurons." Neuroscience. 1994; vol 59 (2): 429-445.

EGBERONGE Y.I., Gentleman S. M. , Falkai P. , Bogerts B. , Polak J. M. et Roberts G. W. "The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain." Neuroscience. 1994; vol 359 (3): p.561-578.

EVANS T., Carpenter A. et Cohen J. "Purification of a distinctive form of endotoxin-induced nitric oxide synthase from rat liver." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1992; vol 89: p.5361-5365.

FINLEY K.D., Kakuda D. K. , Barrioux A. , Kleeman J. , Huynh P. D. et MacLeod C. L. "A mammalian arginine/lysine transporter uses multiple promoters." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1995; vol 92: p.9378-9382.

FORSTERMANN U., Gorsky L. D. , Pollock J. S. , Schmidt H. H. H. W. , Heller M. et Murad F. "Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain." Biochem.Biophys.Res.Comm. 1990; vol 168 (2): p.727-732.

FREEMAN B. "Free radical chemistry of nitric oxide." CHEST. 1994; vol 105 (3): p.79 S-82 S.

FREY C., Narayanan K., McMillan K., Spack L., Gross S. S., Masters B. S. et Griffith O. W. "L-Thiocitrulline." J.Biol.Chem. 1994; vol 269 (42): p.26083-26091.

GARTHWAITE J., Charles S. L. et Chess-Williams R. "Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain." Nature. 1988; vol 336: p.385-388.

GARTHWAITE J., Garthwaite G., Palmer R. M. J. et Moncada S. "NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices." European J.Pharmacol. 1989; vol 172: p.413-416.

GLOWINSKI J. et Iversen L.L. "Regional studies of catecholamines in the rat brain-I." J. Neurochem. 1966; vol 13: p.665-669.

GORSKY L.D., Forstermann U., Ishii K. et Murad F. "Production of an EDRF-like activity in the cytosol of N1E-115 neuroblastoma cells." Faseb.J. 1990; vol 4: p.1494-1500.

GRISCAVAGE J.M., Fukuto J. M., Komori Y. et Ignarro L. J. "Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1994; vol 269(34): p.21644-21649.

HAYASHI T., Ishikawa T., Yamada K., Kuzuya M., Naito M., Hidaka H. et Iguchi A. "Biphasic effect of estrogen on neuronal nitric oxide synthase via  $Ca^{++}$  - calmodulin dependent mechanism." Biochem. Biophys. Res. Comm. 1994; vol 203 (2): p.1013-1019.

HECKER M., Sessa W. C., Harris H. J., Anggard E. E. et Vane J. R. "The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: Cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1990; vol 87: p.8612-8616.

HECKER M., Mulsh A. et Busse R. "Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase." J.Neurochem. 1994; vol 62 (4): p.1524-1529.

HEVEL M.J. et Marletta M.A. "Macrophage nitric oxide synthase: relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity." Biochemistry. 1992; vol 31 (31): p.7160-7165.

HEVEL M.J. et Marletta M.A. "Nitric oxide synthase assays." Methods in enzymology 1994, vol 233: p.250-258.

HIBBS J.B., Vavrin Z. et Taintor R. R. "L-Arginine is required for the expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective inhibition in target cells." J.Imunol. 1987; vol 138: p.550-565.

HIKI K., Yui Y. , Hattori R. , Eizawa H. , Kosuga K. et Kawai K. "Three regulation mechanisms of nitric oxide synthase." European J.Pharmacol. 1991; vol 206: p.163-164.

HOFMANN H. et Schmidt H.H.W. "Thiol dependence of nitric oxide synthase." Biochemistry 1995, vol 34: p.13443-13452.

IADECOLA C. "Regulation of the cerebral microcirculation during neuronal activity: is nitric oxide the missing link?" TINS. 1993; vol 16 (6): p.206-214.

INGNARRO J., Buga G.M. , Wood K.S. , Byrns R.E. et Chaudhuri G. "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1987; vol 84: p.9265-9269.

INGNARRO J. "Biosynthesis and metabolism of endothelium derived-relaxing factor." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1990; vol 30: p.535-560.

JAMES P., Vorherr T. et Ernesto Carafoli. "Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted?" TIBS. 1995; vol 20: p.38-42.

KLATT P., Schmid M. , Leopold E. , Schmidt K. , Werner E. R. et Mayer B. "The pteridin binding site of brain nitric oxide synthase." J.Biol.Chem. 1994; vol 269 (19): p.13861-13866.

KNOWLES R. G. , Palacios M. , Palmer R. M. J. et Moncada S. "Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1989; vol 86: p.5159-5164.

KOBZIK L., Reid M. B. , Bredt D. S. et Stamler J. S. "Nitric oxide in skeletal muscle." Nature. 1994; vol 372: p.546-548.

KORTH H.G., Sustmann R. , Thater C. , Butler A. R. et Ingold K. U. "On the mechanism of the nitric oxide synthase- catalysed conversion of N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine to citrulline and nitric oxide." J.Biol.Chem. 1994; vol 269 (27): p.17776-17779.

KWON N.S., Nathan C. F. et Stuehr D. J. "Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages." J.Biol.Chem. 1989; vol 264 (34): p.20496-20501.

LEVI G. et Raiteri M. "Carrier-mediated release of neurotransmitters." TINS. 1993; vol 16 (10): p.415-419.

LINEWEAVER H. et Burk D. "The determination of enzyme dissociation constant." J. Am. Chem. Soc. 1934; vol 56: p.658-667.

MARLETTA M.A., Yoon P. S. , Iyengar R. , Leaf C. D. et Wishnok J. S. "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate:nitric oxide is an intermediate." Biochemistry 1988; vol 27: p.8706- 8711.

MARLETTA M. A. "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis." Cell. 1994; vol 78: p.927-930.

MAYER B. et Bohme E. "Ca-dependant formation of an L- arginine-derived activator of the soluble guanylate cyclase in bovine lungs." FEBS Lett. 1989; vol 256: p.211-214.

MAYER B., Schmidt K. , Humbert P. et Bohme E. "Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells calcium dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylate cyclase." Biochem.Biophys.Res.Comm. 1989; vol 164: p.678-685.

MAYER B., John M. et Bohme E. "Purification of a Ca<sup>++</sup>/calmodulin nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactors-role of tetrahydrobiopterin." FEBS Lett. 1990;vol 277: 215-219.

MAYER B., John M. , Heizel B. , Werner E. R. , Wachter H. , Schultz G. et Bohme E. "Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-fonctional oxidoreductase." FEBS Lett. 1991; vol 288 (1,2): p.187-191.

MAYER B. "Regulation of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase." Cell Biochem. Func. 1994; vol 12: p.167-177.

MAYER B., Klatt P. , Werner E. R. , et Schmidt K. "Kinetics and mechanism of tetrahydrobiopterin-induced oxidation of nitric oxide." J. Biol. Chem. 1995; vol 270 (2): p.655-659.

McCALL T. et Vallance P. "Nitric oxide takes center stage with newly defined roles." TINS. 1992; vol 13: p.1-6.

McMILLAN K., Bredt D. S. , Hirsch D. J. , Snyder S. H. , Clark J. E. et Masters B. S. S. "Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amount of heme wich binds carbon monoxide". Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1992; vol 89: p.11141-11145.

McNAUGHTON B.L., Shen J. , Rao G. , Foster T. C. et Barnes C. A. "Persistent increase of hippocampal presynaptic axon excitability after repetitive electrical stimulation: dependence on N-methyl-D-aspartate receptor activity, nitric oxide synthase, and temperature." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1994; vol 91: p.4830-4834.

MITCHELL H.H., Schnole H.A. et Grindly H.S. "The origin of the nitrates in the urine." J.Biol.Chem. 1916, vol 24: p.461-490.

MITTAL C.K. et Jadhav A.L. "Calcium-dependent inhibition of constitutive nitric oxide synthase." Biochem. Biophys. Res. Comm. 1994; vol 203 (1): p.8-15.

MIZUKAWA K., McGeer P. L. , Vincent S. R. et McGeer E. G. "Ultrastructure of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) diaphorase-positive neurons in the cat cerebral cortex, amygdala and caudate nucleus". Brain Res. 1988 a); vol 452: p.286- 292.

MIZUKAWA K., Vincent S. R. , McGeer P. L. et McGeer E. G. "Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)- diaphorase-positive neurons in cat cerebral white matter." Brain Res. 1988 b); vol 461: p.274-281.

MIZUKAWA K., Vincent S. R. , McGeer P. L. et McGeer E. G. "Distribution of reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide- phosphate diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system." J. Comp. Neurology. 1989; vol 279: p.281-311.

MONCADA S., Palmer R. J. M. et Higgs E. A. "Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine." Biochemical Pharmacology. 1989; vol 38 (11): p.1709-1715.

MORTEK Camil. 1995 "Calculs numériques des interactions entre les champs électromagnétiques et les tissus biologiques." Thèse de doctorat, Université Laval. 1995.

MUHL H. et Pfeilschifter J. "Tetrahydrobiopterin is a limiting factor of nitric oxide generation in interleukin 1B- stimulated rat glomerular mesengial cells." Kidney International. 1994; vol 46: p.1302-1306.

MULSH A., Bassenge E. et Busse R. "Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium dependent and a calcium-independent mechanism." Arch. Pharmacol. 1989; vol 340: p.767- 770.

MURPHY S., Simmons M. L. , Agullo L. , Garcia A. , Feinstein D. L. , Galea E. , Reis D. J. , Minc-Golomb D. et Schwartz J. P. "Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells." TINS. 1993; vol 16 (8): p.320-326.

NARAYANAN K., Spack L. , McMillan K. , Kilbourn R.G. , Hayward M.A. , Masters B. S.S. et Griffith O.W. "S-alkyl-L-thiocitrulline." J.Biol.Chem. 1995; vol 270 (19): p.11103-11110.

NATHAN C. "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells". Faseb.J. 1992; vol 6: p.3051-3064.

NATHAN C. et Xie Q. W. "Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls." Cell. 1994; vol 78: p.915-918.

O'DELL T.J., Hawkins R. D. , Kandel E. R. et Arancio O. "The roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1991; vol 88: p.11285-11289.

OKAMURA T. et Toda N. "Inhibition by calmodulin antagonist of the neurogenic relaxation in cerebral arteries." European journal of pharmacology. 1994; vol 256: p.79-83.

OLKEN N.M. et Marletta M.A. " $N^G$ -methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase." Biochemistry. 1993; vol 32: p.9677-9685.

OLKEN N.M., Osawa Y. et Marletta M. A. "Characterization of the inactivation of nitric oxide synthase by  $N^G$ -methyl-L- arginine: evidence for heme loss." Biochemistry. 1994; vol 33: p.14784- 14791.

PALACIOS M., Knowles R. G. , Palmer R. M. J. et Moncada S. "Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenals gland." Biochem.Biophys.Res.Comm. 1989; vol 165 (2): p.802-809.

POLLOCK J.S., Forstermann U. , Mitchell J. A. , Warner T. D. , Schmidt H. H. H. W. , Nakane M. et Murad F. "Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1991; vol 88: p.10480-10484.

SAKUMA, I. Stuehr D. J. , Gross S. S. , Nathan C. F. et Levi R. "Identification of arginine as a precursor of endothelium- derived relaxing factor." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1988; vol 85: p.8664- 8667.

SCHMIDT H.H.H.W., Pollock J. S. , NakaneM , Gorsky L. D. , Forstermann U. et Murad F. "Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1991; vol 88: p.365-369.

SCHMIDT H.H.H.W. et Murad F. "Purification and characterisation of a human NO synthase." Biochem.Biophys.Res.Comm.; vol 181: p.1372-1377.

SCHUMAN E.M. et Madison D. V. "A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation." Science. 1991; vol 254: p.1503-1506.

SCOTT-BURDEN T. "Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin." Circulation. 1995; vol 91 (1): p.248-250.

SESSA W.C., Hecker M., Mitchell J. A. et Vane J. R. "The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-Glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1990; vol 87: p.8607-8611.

SHENG H., Gagne G. D., Matsumoto T., Miller M. F., Forstermann U. et Murad F. "Nitric oxide synthase in bovine superior cervical ganglion." J.Neurochem. 1993; vol 61 (3): p.1120-1126.

SNYDER S. H. "More jobs for that molecule." Nature. 1994; vol 372: p.504-505.

SNYDER S.H. et BREDT D.S. "Nitric oxide as a neuronal messenger." TIPS. 1991; vol 12: p125-128.

STROBEL H.W. et Dignam J.D. "Studies on native and reconstituted FMN-depleted NADPH-cytochrome P-450 reductase." Biochemisrtry 1977, vol 16: p1116-1121.

STUEHR D.J. et Marletta M.A. "Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrate and nitrite in response to Escherichia coli lipopolysaccharide." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1985; vol 82: p.7738-7742.

STUEHR D.J., Kwon N. S. et Nathan C. F. "FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide." Biochem.Biophys.Res.Comm. 1990; vol 168 (2): p.558-565.

STUEHR D.J., Kwon N. S., Nathan C. F. et Griffith O. W. "N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine." J.Biol.Chem. 1991; vol 266 (10): p.6259- 6263.

STUEHR D.J. et Griffith O.W. "Mammalian nitric oxide synthases." Adv.Enzymol. 1992; vol 65: p.287-346.

STUEHR D.J. et Saito M. I. "Spectral characterization of brain and macrophage nitric oxide synthases." J. Biol. Chem. 1992; vol 267 (29): p.20547-20550.

TAYEH M.A. et Marletta M.A. "Macrophage oxidation of L- arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate." J.Biol.Chem. 1989; vol 264 (33): p.19654-19658.

UVAROV V.U. et Lyashenko A.A. "The identification of the pteridine-binding domain in the nitric oxide synthase's sequence." Biochem. Biophys. Res. Comm. 1995; vol 206 (2): p.736-741.

WALLACE M.N. et Bisland S.K. "NADPH-Diaphorase activity in activated astrocytes represents inducible nitric oxide synthase." Neuroscience. 1994; vol 59 (4): p.905-919.

WANG J., Rousseau D. L. , Abu-Soud H. M. et Stuehr D. J. "Heme coordination of NO in NO synthase." Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1994; vol 91: p.10512-10516.

WANG Z.Z., Stensaas L. J. , Bredt D. S. , Dinger B. et Fidone S. J. "Localization and actions of nitric oxide in the cat carotid body." Neuroscience. 1994; vol 60 (1): p.275-286.

WEISS B.G., Werner-Felmayer G. , Werner E. R. , Grunewald K. , Wachter H. et Hentze M. W. "Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription." J.Exp.Med. 1994; vol 180: p.969-976.

WERNER E.R., Schmid M. , Werner-Felmayer G. , Mayer B. et Wachter H. "Synthesis and characterization of <sup>3</sup>H-labelled tetrahydrobiopterin." Biochem. J. 1994; vol 304: p.189-193.

WHITE K.A. et Marletta M.A. "Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein." Biochem. 1992; vol 31 (29): p.6627- 6631.

WINK D.A., Kasprzak K. S. , Maragos C. , Eluspuru R. K. , Misra M. , Dunams T. M. , Cebula T. A. , Koch W. H. , Andrews A. W. , Allen J. S. et Keefer L. K. "DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors." Science. 1991; vol 254: p.1001-1003.

WOLFF D.J., Datto G. A. , Samatovicz R. A. et Tempick R. A. "Calmodulin-dependent nitric oxide synthase." J.Biol.Chem. 1993 a); vol 268 (13): p.9425-9429.

WOLFF D.J., Datto G. A. et Samatovicz R. A. "The dual mode of inhibition of calmodulin-dependent nitric-oxide synthase by antifungal imidazole agents." J.Biol.Chem. 1993 b); vol 268 (13): p.9430- 9436.

YUI Y., Hattori R. , Kosuga K. , Eizawa H. , Hiki K. , Ohkawa S. , Ohnishi K. , Terao S. et Kawai C. "Calmodulin- independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils." J.Biol.Chem. 1990; vol 266 (6): p.3369-3371.

YUI Y., Hattori R. , Kosuga K. , Eizawa H. , Hiki K. et Kawai C. "Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages." J.Biol.Chem. 1991; vol 266 (19): p.12544-12547.



