



**HAL**  
open science

# Rôles clinico-biologiques du monoxyde d'azote produit par les voies aériennes

Jean Marc Tadie

► **To cite this version:**

Jean Marc Tadie. Rôles clinico-biologiques du monoxyde d'azote produit par les voies aériennes. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2010. Français. NNT : 2010PEST0053 . tel-00667281

**HAL Id: tel-00667281**

**<https://theses.hal.science/tel-00667281>**

Submitted on 7 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS EST-CRETEIL VAL DE MARNE**

**Faculté de Médecine**

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**THESE**

**Présentée pour obtenir le titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS EST**

**Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé**

**Par**

**Jean-Marc TADIE**

**ROLES CLINICO-BIOLOGIQUES DU MONOXYDE D'AZOTE**

**PRODUIT PAR LES VOIES AERIENNES**

**Thèse dirigée par : le Professeur Christophe DELCLAUX**

**Soutenue le : 02 DECEMBRE 2010**

**Devant un jury composé de :**

<b>Monsieur le Professeur Jean-Yves FAGON</b>	<b>Président</b>
<b>Monsieur le Professeur Christophe DELCLAUX</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Monsieur le Professeur Philippe DEVILLIER</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Monsieur le Professeur François STEPHAN</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Madame le Professeur Dominique ISRAEL-BIET</b>	<b>Examineur</b>
<b>Monsieur le Professeur Bernard MAITRE</b>	<b>Examineur</b>

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	1
REMERCIEMENTS.....	4
INTRODUCTION .....	7
PARTIE 1 : CONNAISSANCES ACTUELLES.....	13
I. Synthèse du NO: les substrats, les NOS, les arginases .....	14
A. Les NO synthases .....	14
B. La L-arginine .....	16
C. Réactions catalysées par les NO synthases.....	17
D. Les arginases .....	19
E. Régulation des NO synthases, inhibiteurs des NO synthases .....	20
II. Mécanismes d'action du NO .....	23
A. NO et voie GMPc .....	24
B. NO et S-nitrosylation.....	27
C. NO et peroxy-nitrite .....	28
III. Sources cellulaires du NO dans le système respiratoire.....	30
A. NOS-1.....	30
B. NOS-2 .....	30
C. NOS-3 .....	31
D. Les arginases .....	34
IV. Rôle du NO dans la régulation de la motricité bronchique.....	35
A. Généralités sur le système étudié .....	35
B. NO et bronchomotricité .....	36
C. NOS et bronchopathie chronique obstructive (BPCO).....	40
D. Arginases et bronchoréactivité .....	41
E. Arginases et pathologies pulmonaires .....	42
F. Balance NO synthase/arginase .....	44
V. NO et réactivité vasculaire pulmonaire .....	47
A. NO et artères pulmonaires .....	47
B. Dysfonction endothéliale: définition .....	47
C. NO et dysfonction endothéliale vasculaire pulmonaire.....	52
D. Dysfonction endothéliale et trouble de la relaxation bronchique: étude du BPCO, biais méthodologiques .....	53

VI. Autres fonctions du NO dans le poumon .....	57
VII. Mesure du NO produit par les voies aériennes: NO expiré et nasal .....	59
A. Méthodologie.....	59
B. Quelles sont les NOS et les cellules impliquées dans la production du NO expiré ?.....	63
C. Mesure du NO expiré chez le patient ventilé .....	64
D. NO nasal .....	67
VIII. Fonctions immunes du NO .....	69
A. Source de NO dans le système immunitaire.....	70
B. Fonctions immunes du NO .....	72
NO et contrôle du processus infectieux.....	72
Régulation des facteurs de l'inflammation par le NO.....	72
NO et polynucléaire neutrophile .....	74
C. Mesure du NO comme marqueur de fonctionnement du système immunitaire en réanimation.....	75
Immunité du patient en réanimation.....	75
NO et immunodépression acquise.....	76
<b>PARTIE 2: RESULTATS DES TRAVAUX.....</b>	<b>77</b>
Article 1 .....	78
Article 2.....	81
Article 3.....	83
<b>TRAVAUX ASSOCIES .....</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>86</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>92</b>

## REMERCIEMENTS

A Monsieur le Pr Christophe Delclaux, qui m'a dirigé durant plusieurs années avec patience, bienveillance, honnêteté et disponibilité. Sa finesse d'esprit et son humour ont contribué grandement au réel plaisir que j'ai eu à réaliser ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde considération. J'espère pouvoir un jour transmettre un peu de ce qu'il m'a enseigné.

A Monsieur le Pr Jean-Yves Fagon, qui a bien voulu m'offrir sa disponibilité pour examiner cette thèse. Pour sa présence et ses conseils toujours avisés, son encadrement tout au long de ma formation d'Interne et de Chef de Clinique en réanimation, et après... : mes remerciements et ma sincère considération.

A Messieurs les Pr Philippe Devillier et François Stéphan qui ont accepté de juger ce travail avec rigueur et professionnalisme. Leur expertise honore et renforce la qualité de cette thèse. Qu'ils soient assurés de mon profond respect.

A Madame le Pr Dominique Israël-Biet. Pour ses conseils, sa disponibilité, son expertise et ses encouragements. Pour tous les moments passés dans son laboratoire. Mes remerciements et ma respectueuse considération.

A Monsieur le Pr Bernard Maître qui a accepté d'examiner ce travail.

A Monsieur Christophe Faisy. Ses conseils avisés m'ont permis de progresser dans de nombreux domaines, y compris la météorologie. Qu'il soit assuré de mon amitié et de ma sincère admiration.

A Monsieur Emmanuel Naline. Pour son aide et sa disponibilité sans faille. Merci de ne pas avoir coupé la corde.

A Messieurs Guérot et Diehl. Leur présence quotidienne m'a permis d'apprendre avec rigueur mon métier : soigner, enseigner et chercher. Je leur en suis aujourd'hui sincèrement reconnaissant. Qu'ils soient assurés de mon profond respect.

A mes compagnons de réanimation qui m'ont aidé à trouver du temps pour « aller au labo » : Audrey Imbert, Nicolas Weiss et Nicolas Lerolle. Mon amitié fidèle.

Aux personnes qui ont participé à la réalisation du DEA et de la thèse : Bruno Mahut, Aurélie Cazes, Claire Danel, Ana Novara, Priscilla Henno et Rachid Zegdi.

A Paul-André et Stanislas et leur ami Iox. Sans vous le labo n'aurait pas été le labo. Je ne jouerai plus avec vous.

A mes parents, pour toutes ces années, pour leurs conseils et leur soutien sans faille.

A Sophie, Christophe et Matthieu Tadié.

Enfin, *last but not least* (lesson n°37), à Emilie. Par sa présence, indispensable, elle m'a permis de réaliser ce travail. A nos deux enfants, Clémence et Edouard. Chantons tous les quatre :

*Show me the way  
to the next...  
and don't ask why.  
Oh moon of Alabama,  
we now must say goodbye*

## **INTRODUCTION**

## Résumé de la stratégie de l'ensemble du travail de Thèse

La mesure de la concentration de monoxyde d'azote (NO) dans le gaz des voies aériennes (gaz nasal ou expiré) s'est progressivement imposée dans l'arsenal des explorations fonctionnelles respiratoires, notamment au cours de la maladie asthmatique. De façon étonnante, son exploration dans le domaine clinique se poursuit alors que bien des incertitudes persistent quant aux fonctions biologiques du NO dans le système respiratoire. Ainsi par exemple, la fraction de NO expiré est augmentée au cours de l'asthme atopique, cette augmentation serait un marqueur de mauvais contrôle de l'asthme, et enfin le NO diminue lors du traitement corticoïde inhalé alors que sur le plan biologique le NO est supposé être un médiateur entraînant la relaxation du muscle lisse bronchique dont l'augmentation pourrait paraître souhaitable ... Ces paradoxes ont d'ailleurs conduit au développement thérapeutique dans les maladies obstructives bronchiques aussi bien d'inhibiteurs des NO synthases (enzymes permettant la synthèse de NO) que de donneurs de NO !

Deux conclusions peuvent être tirées de ces constatations, la première est que la vision intégrée des fonctions biologiques du NO reste parcellaire, la seconde que la mesure de NO des voies aériennes résulte d'une production complexe (plusieurs NOS synthases, nombreuses sources cellulaires, multiples fonctions locales...) et que le NO retrouvé dans les voies aériennes ne peut être lié à une seule fonction biologique d'un médiateur aussi ubiquitaire et pléiotrope.

Mes objectifs au cours de ce travail de Thèse ont donc été 1) d'évaluer le rôle du NO dans la bronchomotricité ex vivo sur prélèvement d'origine humaine car des données discordantes existent dans la littérature et 2) d'aborder le transfert méthodologique

de la mesure de NO nasal et expiré chez le patient d'anesthésie ou réanimation ventilé artificiellement. En effet, ce souci de transfert clinique est une priorité pour moi, et le développement de l'exploration fonctionnelle du patient de réanimation est encore peu réalisé.

Dans cette seconde partie de mon travail, menée en parallèle d'une activité de Chef de Clinique Assistant en Réanimation Médicale, un premier projet méthodologique a consisté à mesurer le NO expiré chez les patients sous ventilation mécanique, tout en différenciant les origines bronchiques et alvéolaires de la production de NO, premier pas pour essayer de mieux cerner la relation mesure fonctionnelle / fonction biologique. Le second travail a consisté à appliquer la mesure précédemment validée en réanimation pour la détection du risque infectieux nosocomial, lié à la diminution des défenses immunitaires de ces patients. Ce projet est la poursuite d'un axe de recherches sur les fonctions immunes des patients de réanimation, initié sur le plan expérimental, et qui voit son prolongement actuel dans une étude prospective avec tirage au sort, en aveugle, que je coordonne, visant à évaluer l'effet de l'apport de L-arginine, précurseur du NO, guidé par la mesure de NO nasal, sur les fonctions immunitaires.

En résumé, ce travail de Thèse a conduit à la publication de trois articles, l'un sur la biologie du NO, le second sur la validation méthodologique de sa mesure et le troisième sur l'utilisation de cette mesure en réanimation, dans mon domaine d'exercice de la pratique médicale.

## Introduction aux différents travaux de Thèse

La capacité des cellules à synthétiser un facteur relaxant la cellule musculaire lisse vasculaire dépendant de la cellule endothéliale (EDRF) a été démontrée au début des années 1980. En 1987, il a été démontré que l'action de l'EDRF et du monoxyde d'azote (NO) était similaire. Depuis, les multiples rôles biologiques du NO ou oxyde nitrique ont fait de ce radical libre dérivé de l'oxygène une molécule essentielle dans l'homéostasie. Peu de temps après les travaux liant EDRF et NO, plusieurs études ont suggéré un rôle important du NO en physiologie respiratoire et sa potentielle utilisation en thérapeutique. En effet, le monoxyde d'azote est une molécule produite par l'ensemble des cellules des voies aériennes. Sa synthèse à partir de la L-arginine fait appel à un groupe d'enzymes: les NO synthases (NOS). Il existe trois isoformes de NOS exprimées par des cellules ayant des fonctions diverses, conférant ainsi au NO produit une spécificité d'action dépendante de la cellule et de la « situation » ayant entraîné sa synthèse. De plus, l'utilisation de la L-arginine est le résultat d'une véritable compétition entre les NOS et un autre système enzymatique : les arginases. L'utilisation de ce substrat commun par l'un ou l'autre aura des effets différents voire opposés. De plus, les effets du NO sur l'appareil respiratoire sont loin d'être univoques. Ceci résulte de la variété des cellules qui synthétisent le NO et de celles qui en sont la cible. Enfin, il faut souligner le rôle central du NO dans le fonctionnement du système immunitaire: régulation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes/macrophages, mais aussi régulation de la migration des polynucléaires neutrophiles entre autres.

La découverte et la mise au point de techniques de détection du NO d'origine broncho-pulmonaire dans l'air expiré des patients ont permis de développer de

nouvelles approches en physiologie respiratoire (exploration de l'inflammation voire de l'immunité) mais aussi dans l'étude des pathologies respiratoires comme la bronchopathie chronique obstructive (BPCO) ou l'asthme.

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse explorent des rôles différents (bronchoréactivité, immunitaires) du NO produit par les voies aériennes ainsi que la mesure du NO dans le contexte de l'anesthésie – réanimation.

L'objectif du premier travail était de « revisiter » la fonction régulatrice du tonus bronchique dans le cadre d'une pathologie respiratoire. L'étude de la réactivité bronchique, de la tension de base bronchique en présence d'inhibiteurs des NOS et des arginases nous a permis d'apprécier l'importance de la balance NOS/arginases dans la genèse de l'obstruction bronchique. Cette approche pharmacologique a été complétée par l'étude immunohistochimique des bronches humaines.

L'objectif du deuxième travail était méthodologique (étude des sources anatomiques du NO expiré chez le patient sous ventilation mécanique). Pour ce travail, nous avons choisi d'évaluer ses variations au cours de la chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle. Cette étude nous a permis d'évaluer l'origine des variations de NO expiré et d'étudier l'effet de la ventilation mécanique sur ces variations.

Enfin, l'objectif du troisième travail était d'utiliser la mesure validée dans le deuxième travail pour évaluer les fonctions immunes du NO en réanimation. En effet, il existe une dysfonction immunitaire acquise en réanimation et le développement d'un marqueur biologique capable d'identifier cette dysfonction pourrait permettre de cibler les patients à risque de développer des infections nosocomiales, et ainsi de mettre en place des mesures préventives. Les conclusions de ce troisième travail

nous ont permis de débiter une étude sur l'efficacité de ces mesures préventives (immunonutrition).

Une partie des différents aspects du NO produit par les voies aériennes est ainsi abordée dans cette thèse. La principale difficulté résidant dans l'ébauche d'un schéma synthétique entre les effets bénéfiques et délétères de cette molécule que de nombreux auteurs comparent volontiers à l'ambivalence du légendaire Janus.

## **PARTIE 1 : CONNAISSANCES ACTUELLES**

## **I. Synthèse du NO: les substrats, les NOS, les arginases**

Chez les mammifères, la L-arginine, acide aminé semi essentiel, est utilisée par les cellules pour les synthèses protéiques. Cependant, elle est aussi utilisée comme substrat par un groupe d'enzymes pour la synthèse de monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO). Les enzymes permettant cette synthèse sont les NO synthases (NOS)<sup>1</sup>.

La L-arginine peut être métabolisée par les NOS en NO et L-citrulline, et par les arginases en urée et L-ornithine, précurseur des polyamines (spermines et spermidine), utilisées comme facteurs de croissance.

Le NO est formé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal chimiquement équivalents du groupe guanidine de la L-arginine. L'autre produit de synthèse, formé de manière stœchiométrique avec le NO est la L-citrulline. La L-citrulline provient également de la L-arginine, qui est d'abord hydroxylée en N<sup>G</sup>hydroxy-L-arginine. La réaction de biosynthèse du NO et de la L-citrulline à partir de la L-arginine et de l'oxygène est sous la dépendance d'une famille d'enzymes : les NO synthases.

### **A. Les NO synthases**

Le système enzymatique responsable de la production de NO à partir de la L-arginine a été identifié en 1990 par Bult et al<sup>2</sup>. Trois isoformes de NO synthases ont été identifiées : la NOS neuronale (ou NOS de type I ou NOS-1 ou nNOS) qui a été d'abord identifiée dans les cellules nerveuses, la NOS inductible (ou iNOS, NOS II ou NOS-2) dont la synthèse est induite par de nombreux stimuli et la NOS endothéliale (ou eNOS, NOS-3 ou NOS III), isoforme initialement retrouvée dans les cellules endothéliales<sup>3 1</sup>. Ces isoformes ont été aussi classées en constitutive

(NOS-1 et NOS-3) ou inductible (NOS-2); calcium dépendante (NOS-1 et NOS-3) ou indépendante (NOS-2).

Ainsi, il existe trois NOS, classiquement différenciées selon les critères suivants (ces différences s'estompent de plus en plus) <sup>1</sup>:

- NOS constitutives (NOS-1 et NOS-3) versus inductible (NOS-2). Cependant, il est désormais établi que l'expression des trois isoformes peut être induite par différents stimuli, et que la NOS dite inductible peut avoir une expression constitutive, notamment au niveau de l'épithélium respiratoire. En effet, les cellules épithéliales bronchiques et nasales expriment en permanence la NOS inductible, probablement du fait d'une exposition permanente à des aéro-contaminants ou différents stimuli pro-inflammatoires <sup>4</sup>;
- Calcium dépendante (NOS-1 et NOS-3) versus indépendante du calcium (NOS-2). Cependant, certaines études animales ont rendu cette distinction moins claire (calcium dépendance de la NOS-2);
- Cytosolique (NOS-1 et NOS-2) versus intra-particulaire (NOS-3). Cette distinction est désormais peu claire car des études immuno-histochimiques ont permis de mettre en évidence que les trois isoformes peuvent être cytosoliques ou localisées dans des particules ou liées à la membrane cytoplasmique.

La classification des NOS doit être faite en NOS-1, NOS-2, NOS-3 car cela évite la confusion dans les esprits car il est désormais établi que les cellules des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire peuvent exprimer les trois isoformes de NOS <sup>5</sup>. Enfin, du fait de son mode d'action, il semble évident que le NO, une fois synthétisé, peut avoir des actions extrêmement diverses voire opposées en fonction de la cellule et de l'isoforme de NOS qui le synthétisent.

Les trois NO synthases sont apparentées à la famille des cytochromes P450 et codées par trois gènes distincts (chromosomes 12, 17 et 7).

NO synthase	Structure du gène	Chromosome	Nombre d'acides aminés, masse moléculaire de la protéine	Référence bibliographique
nNOS (NOS-1)	29 exons, 28 introns	12q24.2-12q24.3 du chromosome 12	1434 aa, 161 kDa	<sup>6</sup>
iNOS (NOS-2)	26 exons, 25 introns	17cen-q11.2 du chromosome 17	1153 aa, 131 kDa	<sup>7</sup>
eNOS (NOS-3)	26 exons, 25 introns	7q35-7q36 du chromosome 7	1203 aa, 133 kDa	<sup>8</sup>

**Tableau 1:** Gènes codant pour les isoformes de NO syntases.

### B. La L-arginine

La L-arginine est un acide aminé semi-essentiel: indispensable en période de croissance, elle peut prendre les caractéristiques d'acide aminé essentiel dans certaines situations. Elle est synthétisée essentiellement au niveau rénal à partir de la citrulline <sup>9</sup>. La citrulline étant essentiellement issue du métabolisme intestinal de la glutamine, il a été démontré une relation directe entre la biodisponibilité de la glutamine, la capacité de l'intestin à produire de la citrulline et la synthèse rénale d'arginine <sup>9 10 11</sup>. Chez l'adulte sain, les apports journaliers d'arginine sont de l'ordre de 5 à 6 grammes par jour et la production endogène supérieure à 15 grammes. L'organisme tire l'arginine des aliments tels que les légumineuses, certaines céréales comme le riz brun, l'avoine et le sarrasin, ainsi que de la viande rouge, la volaille, le poisson, les produits laitiers, les noix.

L'arginine est le substrat des NOS mais aussi des arginases I et II. Ces deux voies métaboliques conduisent d'une part à la formation de NO et d'autre part à la formation de polyamines et de précurseurs de la matrice extra-cellulaire (proline).

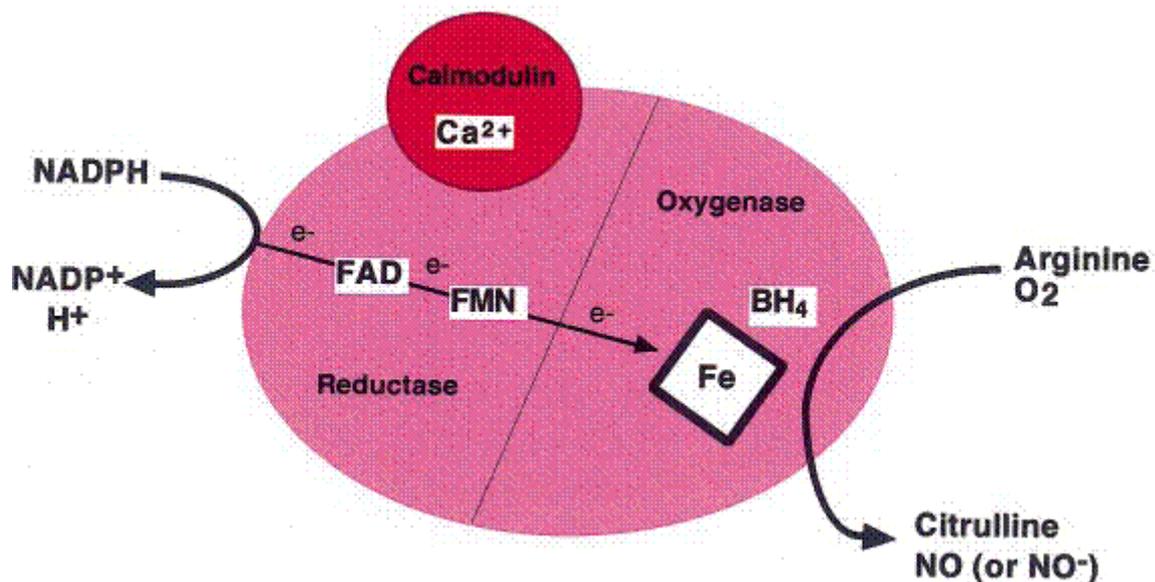
### C. Réactions catalysées par les NO synthases

La NO synthase est souvent décrite comme une structure dimérique. Cependant, sa forme active nécessite la présence de calmodulines (CaMs) lui conférant une structure tétramérique (deux monomères de NOS associés à deux CaMs). Les NOS sont étroitement liées à des cofacteurs : 6R-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH4), FAD, FMN et le fer de l'hème <sup>12 1</sup>.

Chaque monomère contient deux domaines, l'un N-terminal d'activité oxygénase, l'autre C-terminal portant une activité réductase, reliés par un site central qui lie la calmoduline et stabilisés par un pont qui contient un atome de zinc <sup>13</sup>. Après liaison de la calmoduline (et de calcium pour la NOS-1 et la NOS-3 mais pas pour la NOS-2), un transfert d'électrons intra-enzymatique est initié, depuis les cofacteurs NADPH, FMN et FAD du domaine réductase vers le groupement hème du domaine oxydase. Ensuite, en présence de tétrahydrobioptérine (BH4) et d'oxygène, l'enzyme NOS catalyse la conversion de la L-arginine en citrulline et la libération simultanée de NO, ou éventuellement de NO<sup>-</sup> (anion nitroxyl), d'autres espèces réactives de l'azote (ERN) comme le peroxydinitrite (ONOO<sup>-</sup>) ou des dérivés nitrosothiols <sup>14 3 15</sup>. Les ERN sont formées essentiellement du produit de réaction entre le NO et l'anion superoxyde. Le peroxydinitrite formé peut être transformé en dioxyde et trioxyde d'azote.

En fait, les NOS pourraient être appelées nitrogen oxide synthases (synthases d'oxydes d'azote) plutôt que nitric oxide synthases. Pour cette raison, les effets des

donneurs exclusifs de NO ne sont pas toujours l'inverse des effets des inhibiteurs de NOS (qui inhibent la synthèse du NO et d'autres espèces réactives de l'azote (ERN)).



**Figure 1:** Réaction catalysée par la NO synthase et ses cofacteurs. D'après Alderton et al. <sup>1</sup>

Ainsi, dans certaines circonstances, les NOS peuvent directement synthétiser du NO ou non. Ceci est fondamental dans la compréhension de phénomènes physiologiques et physiopathologiques dans lesquels les NOS sont impliquées.

Schmidt et al dans un article intitulé : « **No NO from NO synthase** » a montré qu'en utilisant de la NOS-1 purifiée, il ne pouvait pas être mis en évidence de NO par des techniques de détection avec des électrodes à NO ou par chimioluminescence sans l'adjonction de superoxyde dismutase (SOD) <sup>15</sup>. D'autres auteurs ont mis en évidence les mêmes résultats <sup>16 17</sup>. Leur conclusion était la suivante : un anion nitroxyl (NO<sup>-</sup>) a été formé et oxydé en NO grâce à la SOD. Les mécanismes qui privilégient la formation d'anion nitroxyl versus NO ne sont pas encore tous élucidés. Cependant, il semble qu'en présence de quantité importante de L-arginine et de BH4, la voie de formation du NO soit favorisée. Notons, que le nitroxyl formé à partir de la NOS peut former avec de l'oxygène un anion peroxyntirite <sup>18</sup>.

Les trois isoformes de NO synthases peuvent être à l'origine de la formation de ces ERN.

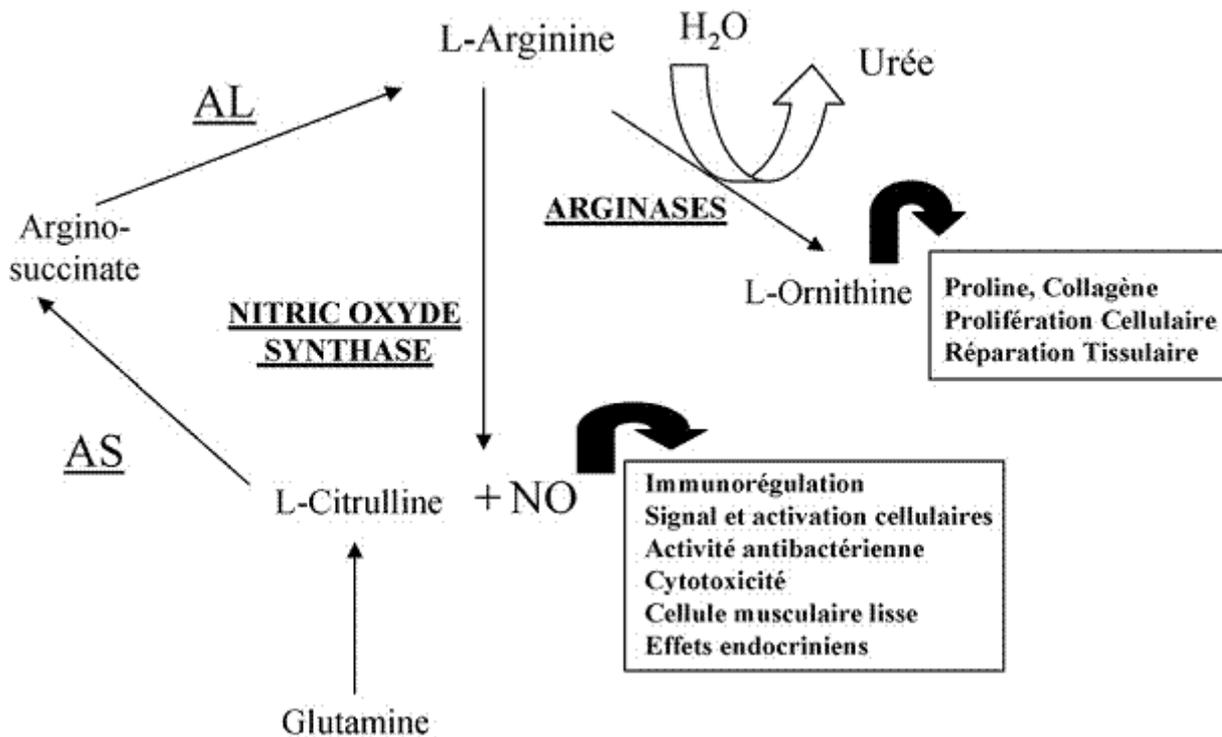
#### Du NO ou autre chose: est-ce important ?

Il est fondamental de connaître les molécules synthétisées par la NOS impliquée dans les phénomènes physiologiques ou physiopathologiques étudiés. En effet, l'utilisation de donneurs de NO ne reproduira pas les mêmes effets que la synthèse in-vivo d'ERN par la NOS. Ceci expliquerait, par exemple, la discordance de conclusion entre les effets anti-inflammatoires et cytoprotecteurs de donneurs de NO et les effets in-vivo de l'activation de la NOS-2 produisant des ions nitroxy et du peroxy nitrite <sup>19 20 21</sup>.

#### *D. Les arginases*

La L-arginine n'est pas seulement utilisée par les NOS. Un autre système enzymatique, les arginases, entre en compétition avec les NOS pour ce substrat commun. L'arginase catalyse la formation d'urée et d'ornithine par hydrolyse de l'arginine. Cette réaction intervient dans le cadre du cycle de l'urée, localisé dans le foie (il a été démontré que cette réaction avait lieu aussi de façon significative dans l'intestin grêle) <sup>22 23</sup>. Cette enzyme permet la libération d'une molécule d'urée et d'ornithine. L'ornithine est le précurseur des polyamines, de la proline et du glutamate <sup>24</sup>. Chez les mammifères, deux isoformes de l'arginase (arginase I et II) existent, produits de deux gènes différents. Ces deux isoformes diffèrent aussi par leurs propriétés fonctionnelles, par leurs localisations tissulaires et cellulaires ainsi que par la nature des mécanismes régulant leur expression. L'arginase I est une enzyme cytosolique retrouvée essentiellement dans le foie (hépatocytes), l'arginase II est une enzyme mitochondriale ubiquitaire. Le devenir métabolique de l'ornithine est lié à la

localisation intracellulaire des arginases. En effet, l'arginase I, colocalisée avec l'ornithine decarboxylase dans le cytosol, assure la synthèse des polyamines alors que l'arginase II, localisée avec l'ornithine aminotransférase, assure la synthèse de la proline et du glutamate.



**Figure 2:** Voie métabolique de la L-arginine. AS: argininosuccinate synthase, AL: arginosuccinate lyase.

### E. Régulation des NO synthases, inhibiteurs des NO synthases

#### Sites de régulation de l'activité des NO synthases

Plusieurs sites de régulation de l'activité des NO synthases existent <sup>25 26</sup>:

- La calmoduline (CaM) est nécessaire à l'activité des 3 isoformes <sup>27</sup>. On peut distinguer les isoformes en fonction de leur dépendance au calcium (surtout les NOS-1 et NOS-3, moins la NOS-2). La liaison avec CaM augmente le transfert d'électrons de NADPH au domaine réductase <sup>28</sup>.

- La phosphorylation de la NOS-1 et de la NOS-3 modifie leur activité. En effet, des études ont démontré que la phosphorylation de la NOS-3 permettait d'augmenter le transfert d'électrons vers le domaine réductase et ainsi d'augmenter la synthèse de NO <sup>29</sup>. Par contre, la phosphorylation de la NOS-1 entraînait une diminution de production de NO (autre site de phosphorylation) <sup>30</sup>.
- Le domaine N-terminal de la NOS-1 contient un site de liaison à une protéine inhibitrice des NOS (PIN) <sup>31</sup>.
- Heat-shock protein 90 joue un rôle régulateur de l'activité de la NOS-3 via un mécanisme direct <sup>32</sup>. Cette protéine chaperone aurait aussi un rôle indirect dans l'activité des NOS-1 et NOS-2 <sup>33 34</sup>.
- Le processus de palmitoylation peut aussi jouer un rôle de régulateur de la NOS-3, comme la liaison entre la NOS-3 et les caveolae <sup>35</sup>.

### Inhibiteurs des NO synthases

Il y a un nombre très important de publications concernant les inhibiteurs des NOS et leurs potentielles applications en pharmacologie. Il faut distinguer les inhibiteurs non sélectifs qui bloquent les trois NOS et les sélectifs.

Les inhibiteurs non sélectifs de NOS les plus utilisés sont : L-NMMA, L-NNA et le L-NAME. Ces trois inhibiteurs sont compétitifs avec la L-arginine pour le site de liaison de la NOS avec la L-arginine <sup>36</sup>.

Il existe désormais des inhibiteurs sélectifs des NOS-1 et NOS-2. Les inhibiteurs sélectifs de la NOS-2 les plus utilisés sont le 1400W et le L-NIL (iminoethyl-L-lysine). Ces deux inhibiteurs agissent eux aussi comme des analogues de la L-arginine. L'aminoguanidine, qui a été utilisée dans des essais cliniques chez le BPCO <sup>37</sup>, est

aussi un inhibiteur sélectif de la NOS-2 agissant en se fixant sur une partie du site de fixation de la L-arginine (partie guanidine du site de fixation).

Il faut noter enfin que d'autres inhibiteurs de NOS agissent en se liant à l'hème de la NOS entraînant une destruction de l'hème et donc une inhibition de la NOS, comme certains imidazolés<sup>38</sup>.

## II. Mécanismes d'action du NO

Une fois synthétisé le NO va réagir très rapidement (demi-vie très courte) avec des molécules intra-cellulaires et/ou sur des cellules voisines selon un mode paracrine. Le NO peut traverser la membrane cellulaire des cellules cibles, et interagir avec des molécules intracellulaires et, du fait de sa grande instabilité intrinsèque, ne nécessite donc pas de récepteur extracellulaire et de mécanisme spécifique de dégradation. En effet, le NO est une molécule très réactive qui a des effets extrêmement variés dépendant essentiellement de la concentration du NO et du milieu environnant son site de synthèse. Il existe deux effets directement liés à la molécule elle-même et un effet du NO, indirect, médié par les espèces réactives de l'azote (ERN) produites par l'interaction du NO avec l'anion superoxyde ou avec l'oxygène. Le GMPc, produit par l'interaction du NO avec la guanylate cyclase, est le mécanisme d'action principal des effets physiologiques du NO <sup>5</sup>. Cependant, on peut diviser les mécanismes d'action du NO en trois parties :

- Réactions avec des métaux comme le fer, le cuivre ou le zinc de groupements prosthétiques d'enzymes ou de protéines, permettant ainsi au NO de réguler l'activité de différentes enzymes (GMPc essentiellement);
- Formation de S-nitrosothiols à partir de la cystéine par S-nitrosylation. Ce mécanisme de nitrosylation permet de réguler l'activité de nombreuses enzymes;
- Le NO peut enfin réagir très rapidement avec l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) entraînant ainsi la formation de peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ), qui du fait de son fort pouvoir oxydant est à l'origine de modifications des protéines, lipides et acides nucléiques.

Il faut noter que le premier mécanisme est considéré comme un mécanisme direct, les deux autres étant qualifiés d'indirects. De plus, à de faibles concentrations (<1µM), l'effet direct est prédominant, alors qu'à des concentrations plus élevées (>1µM), les effets indirects deviennent plus importants <sup>39</sup>.

La majorité des effets biologiques du NO produit par les voies aériennes semblent utiliser les deux mécanismes. En effet, le NO entraîne une relaxation du muscle lisse bronchique en utilisant la voie GMPc ainsi que la voie non-GMPc dépendante.

### A. NO et voie GMPc

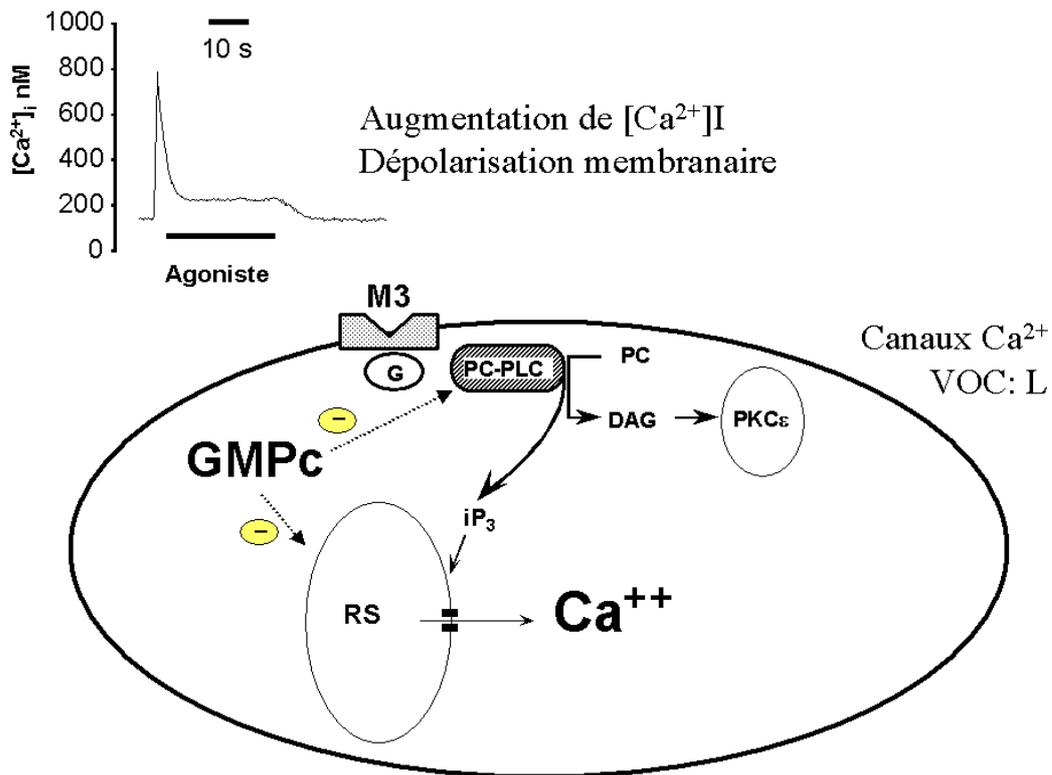
Le mécanisme d'action GMPc dépendant du NO sur la cellule musculaire lisse est représenté sur la figure 3.

Le NO, du fait de sa structure peut agir comme un donneur d'électron et peut ainsi réagir avec des métaux de transition comme le fer, le cuivre et le zinc.

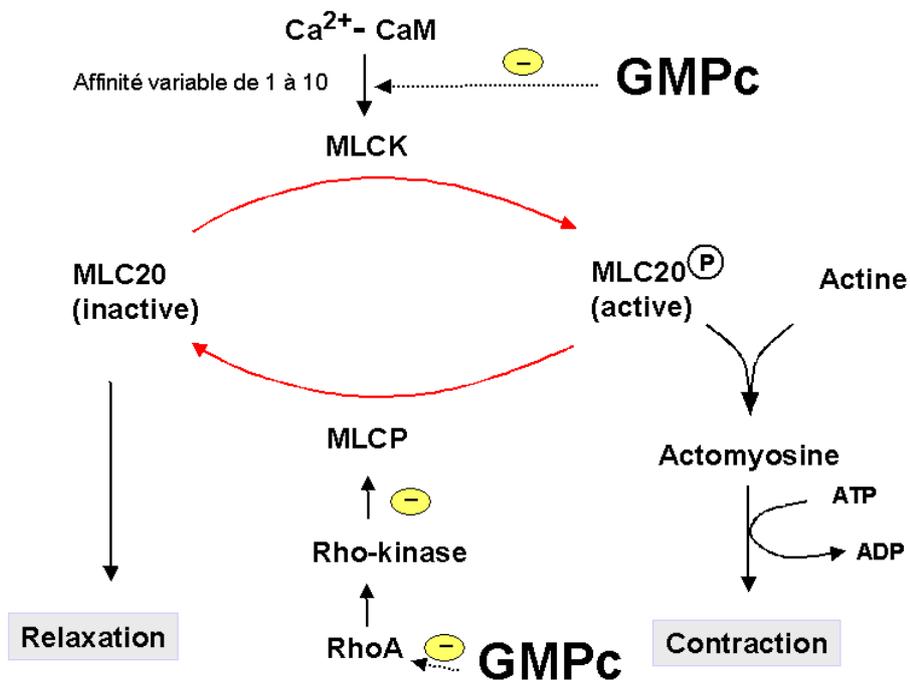
Une des cibles principales du NO est la guanylate cyclase soluble (GCs). Celle-ci contient une structure hème avec du fer ( $Fe^{2+}$ ) et peut convertir le GTP en une molécule messager intracellulaire: le GMPc. A l'état de base, l'activité GCs est faible, mais elle peut être très rapidement augmentée par de faibles concentrations de NO (10-100nM). Le NO se lie directement à l'hème entraînant ainsi un changement de la structure porphyrique permettant ainsi l'activation de la GCs. Cette activation entraîne une augmentation de la synthèse de GMPc (400 à 500 fois) <sup>39 40</sup>. Le principal médiateur de la voie GMPc est la protéine kinase GMPc dépendante (PKG). La PKG est une serine/thréonine kinase activée par la liaison avec le GMPc. Il existe deux types de PKG. La PKG I est une enzyme cytosolique exprimée de façon ubiquitaire. La PKG II est une protéine membranaire présente dans de nombreux tissus ayant un rôle important dans l'activité sécrétrice de l'épithélium intestinal <sup>41</sup>.

Le GMPc agit aussi via les canaux ioniques activés par les nucléotides cycliques (CNG, *cyclic nucleotide gated channels*), la protéine kinase AMPc dépendante (PKA) et les phosphodiésterases (PDE). Il faut noter qu'il existe de nombreuses analogies structurales entre la PKG et la PKA. Cependant, l'affinité de la PKA pour le GMPc est 50 fois moindre que pour l'AMPc <sup>41</sup>. Enfin, le GMPc peut se lier aux phosphodiésterases. Les phosphodiésterases catalysent la conversion/inactivation de l'AMPc et du GMPc en respectivement 5'AMP et 5'GMP. La phosphodiésterase de type 5 (PDE 5) est spécifique du GMPc; des inhibiteurs des PDE 5, comme le sildénafil, sont utilisés en thérapeutique <sup>42</sup>.

Notons qu'il a été décrit un autre mécanisme direct du NO sur la cytochrome c oxydase (CcO), enzyme terminale permettant la synthèse d'ATP par la mitochondrie. Le NO peut inhiber de manière réversible la CcO, entravant ainsi la respiration mitochondriale <sup>43</sup>. De plus, le NO peut inhiber la catalase en réagissant avec le fer (ferrique, Fe<sup>3+</sup>) de l'hème de cette enzyme. La catalase est responsable du métabolisme du peroxyde d'hydrogène. Son inhibition par le NO entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire du peroxyde d'hydrogène pouvant contribuer à la cytotoxicité du NO <sup>44</sup>.



### Sensibilisation de l'appareil contractile au $Ca^{++}$



**Figure 3:** Action du NO sur la relaxation de la cellule musculaire lisse. Action GMPc dépendante : l'effet relaxant musculaire se fait grâce à l'augmentation de la

concentration intracellulaire d'un second messenger nucléotidique, le guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Cette augmentation de GMPc dans le muscle lisse active une série de protéines kinases, notamment les protéines kinases G (PKG) de type I qui, en déclenchant une série de phosphorylation sur les protéines cibles, contrôlent directement ou indirectement la contractilité du muscle lisse bronchique. L'augmentation du GMPc est liée à l'activation par le NO du noyau fer de l'hème composant la guanylate cyclase soluble, stimulant la conversion du GTP en GMPc. Cette relaxation de la cellule musculaire lisse repose sur deux mécanismes : réduction de la concentration intra-cytoplasmique de calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) et diminution de la sensibilité au calcium de l'appareil contractile. Le premier mécanisme d'action est lié à la capacité de la PKG activée à phosphoryler des protéines cibles dont l'effet terminal est de diminuer la  $[Ca^{2+}]_i$  : stimulation du canal  $Ca^{2+}$ -K<sup>+</sup>, inhibition du canal membranaire  $Ca^{2+}$ , activation de la pompe  $Ca^{2+}$ -ATPase de la membrane cytoplasmique mais aussi de la membrane du reticulum sarcoplasmique, enfin inhibition du récepteur et de la synthèse de l'inositol triphosphate. Le mécanisme du GMPc entraînant une diminution de la sensibilité au calcium a été décrite et l'impute à une stimulation de l'activité phosphorylase de la chaîne légère via une inhibition de la voie RhoA.

### B. NO et S-nitrosylation

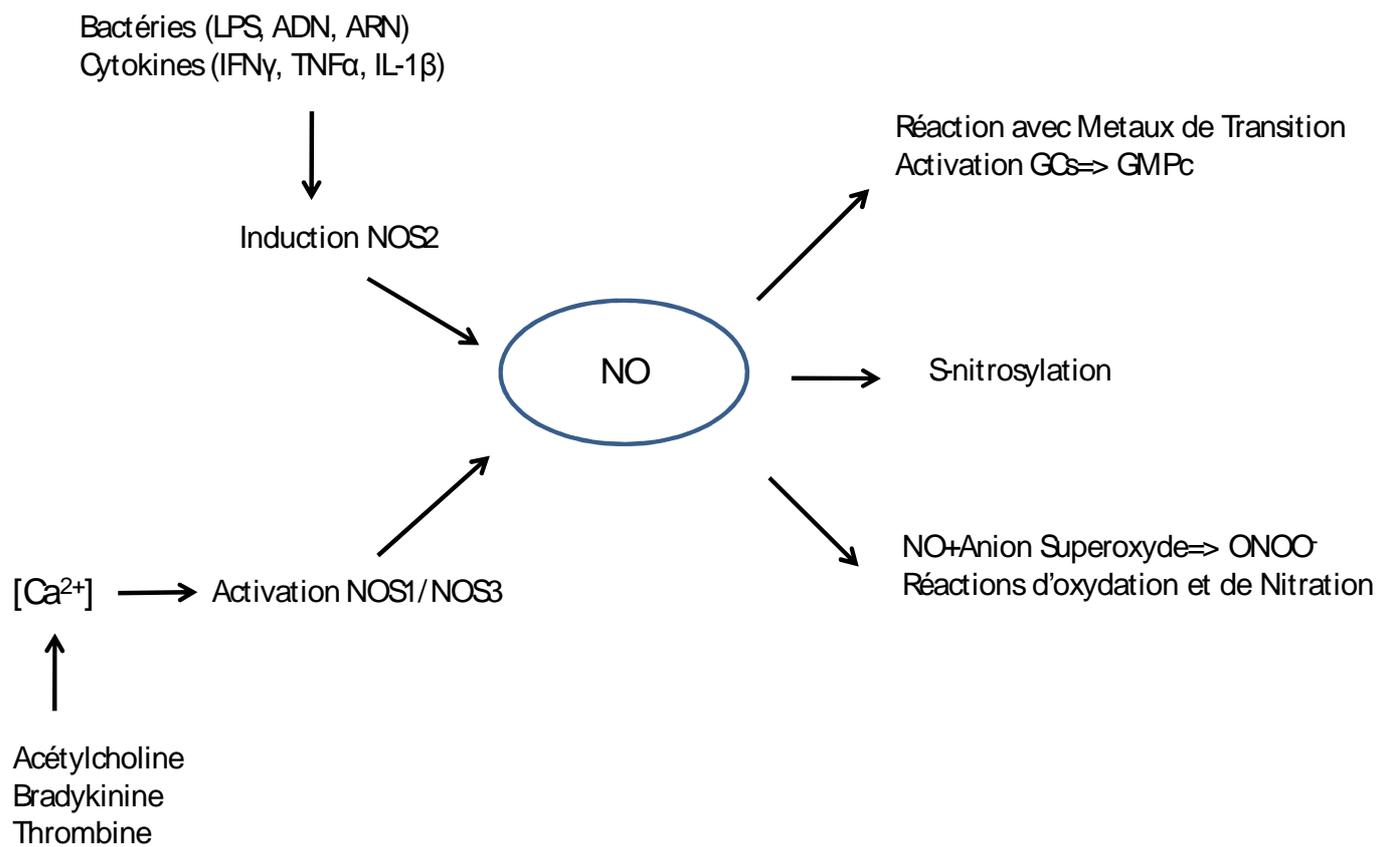
La S-nitrosylation des protéines est un mécanisme important de régulation de l'activité protéique. En solution aqueuse, le NO réagit rapidement avec l'oxygène formant le trioxyde d'azote ( $N_2O_3$ ), rapidement décomposé en ion nitrosonium ( $NO^+$ ) et nitrite.  $NO^+$  est à l'origine de la nitrosylation de thiols, amines secondaires et composés phénoliques <sup>45</sup>. L'importance de ces mécanismes d'autoxydation est dépendante de la concentration de NO et d'oxygène, entraînant une formation importante de  $N_2O_3$  au site de synthèse de NO. Ceci permet de souligner l'importance de la distance entre le site de synthèse du NO dans la voie de signalisation choisie. Le groupe de protéines cellulaires cibles de la régulation par S-nitrosylation est extrêmement varié et important : facteurs de transcription, kinases impliquées dans les voies de signalisation, caspases, canaux ioniques. En effet, le NO peut réagir avec des protéines contenant des groupements thiols comme l'albumine et l'activateur du plasminogène tissulaire, formant ainsi des groupements

S-nitrosothiols pouvant jouer un rôle de stockage ou de transport du NO. Les mécanismes directs de défense antimicrobienne du NO sont en grande partie dus à la S-nitrosylation de la cystéine des protéases qui sont importantes pour la réplication et la virulence des virus, bactéries et des parasites <sup>46 47</sup>.

### C. NO et peroxynitrite

La réaction entre le NO et l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) forme  $ONOO^-$ , molécule réactive pouvant être à l'origine de nitration et d'oxydation des protéines, lipides et nucléotides. La réaction entre le NO et l'anion superoxyde est extrêmement rapide, favorisée par la présence en concentration suffisante et équivalente de NO et d'oxygène. Les sources de superoxyde sont essentiellement la mitochondrie et les cellules immunitaires (macrophages et lignées granuleuses) <sup>39</sup>. Une formation accrue de peroxynitrite entraîne une nitration des protéines, une inhibition de la respiration mitochondriale, une altération de l'ADN, une apoptose et une nécrose cellulaire, entraînant des lésions cellulaires et tissulaires <sup>48</sup>. La nitrotyrosine est utilisée comme un marqueur de formation de peroxynitrite, de lésions tissulaires ainsi qu'un marqueur de survenue de modifications fonctionnelles des protéines. En effet, la nitration des protéines et des enzymes entraîne une modification de leur activité catalytique, de leur capacité d'agir comme signal cellulaire ainsi qu'une modification structurelle du cytosquelette <sup>48 49</sup>. Il faut souligner que l'activité de la NOS-2 est médiée par une nitration induite par le  $ONOO^-$  (entraînant une diminution de l'activité catalytique de la NOS-2) <sup>50</sup>. Enfin, il faut noter que le NO peut être à l'origine de nitration de protéines sans formation de  $ONOO^-$ , comme les cyclooxygénases I et II

<sup>51 52</sup>.



**Figure 4:** représentation schématique des trois modes d'action du NO.

### **III. Sources cellulaires du NO dans le système respiratoire**

La plupart des cellules du parenchyme pulmonaire peuvent exprimer les trois isoformes de NOS.

#### **A. NOS-1**

La NOS-1 a été localisée dans les cellules nerveuses permettant l'innervation et la régulation du calibre des voies aériennes, chez l'animal mais aussi chez l'homme, par des études immunohistochimiques et histochemiques (NADPH diaphorase) <sup>53 54</sup>. L'innervation des voies aériennes, plus particulièrement des cellules musculaires lisses, permet au NO de jouer un rôle essentiellement, mais pas exclusivement, de relaxation du muscle lisse bronchique <sup>56</sup>. Il faut d'ailleurs noter que la densité de l'innervation diminue de la trachée aux petites bronches, cette diminution est associée à une diminution de l'intensité de la bronchodilatation régulée par le système non cholinergique non adrénergique (NANC) <sup>57</sup>. De plus, des fibres nerveuses responsables de l'innervation des cellules glandulaires muqueuses contiennent de la NOS-1, conférant au NO un rôle de régulateur de la sécrétion glandulaire <sup>53</sup>. Enfin, en plus de son rôle dilatateur, le NO a des effets sur la régulation de l'extravasation. La NOS-1 est aussi retrouvée dans des cellules non nerveuses, comme les cellules épithéliales et les cellules endothéliales.

#### **B. NOS-2**

La NOS-2 était à l'origine « limitée » à son expression macrophagique, mais il est désormais clairement établi qu'elle est synthétisée par de nombreux types cellulaires

dans le poumon et les voies aériennes <sup>58</sup>. En effet, différents types cellulaires peuvent exprimer la NOS-2:

- pneumocytes II <sup>59</sup>
- cellules musculaires lisses bronchiques et vasculaires <sup>60</sup>
- fibroblastes <sup>61</sup>
- cellules épithéliales <sup>62</sup>
- polynucléaires neutrophiles <sup>63</sup>
- chondrocytes <sup>55</sup>

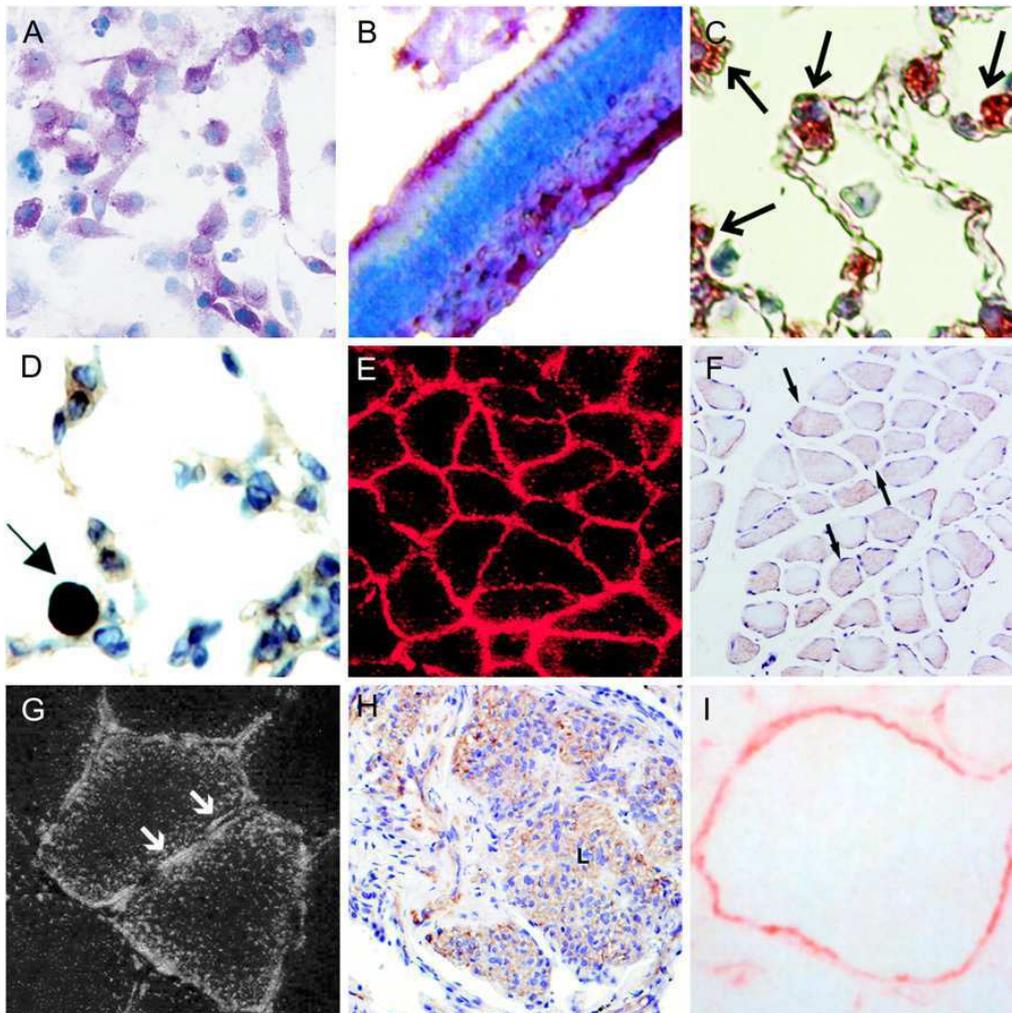
De plus, les stimuli à l'origine de l'activation de la transcription de la NOS-2 peuvent être extrêmement variés: facteurs endogènes, exogènes (bactériologiques), pollution environnementale <sup>64</sup>, etc.

Il faut souligner le rôle des corticoïdes qui peuvent diminuer l'expression pulmonaire de la NOS-2 <sup>65</sup>.

### C. NOS-3

Peu de temps après l'identification du NO comme molécule produite par les cellules endothéliales, des études immunohistochimiques ont retrouvé un marquage important de NOS-3 dans les cellules endothéliales des vaisseaux pulmonaires <sup>66</sup>. Celle-ci est localisée dans les caveolae endothéliales grâce à un mécanisme de palmytoylation <sup>67</sup>. De plus, la NOS-3 est constitutivement synthétisée par les cellules de l'épithélium bronchique <sup>68</sup>, les pneumocytes de type II <sup>69</sup>. Un marquage positif pour la NOS-3 des cellules épithéliales de la muqueuse nasale a été décrit <sup>70</sup>. Une étude a permis de retrouver la NOS-3 à la partie basale du microtubule des cellules ciliaires, jouant un rôle dans la régulation de sa mobilité et de sa fréquence de

mouvement <sup>71</sup>. Ainsi, la NOS endothéliale ne joue pas exclusivement un rôle de régulation « vasculaire » mais à des fonctions multiples.



**Figure 5:** immunolocalisation de différentes NO synthases dans le poumon. A: marquage NOS-2 de cellules mésothéliales pleurales (rat); B: épithélium nasal marquage NOS-2; C: marquage NOS-2 alvéolaire après hyperoxie; D: nitrityrosie après exposition à l'ozone chez la souris; E: Tyrosine nitration de protéines de diaphragme de rats; F: marquage NOS-2 cellules musculaires intercostales après exposition au LPS; G: marquage NOS-1 diaphragme de rat; H: marquage NOS-3 de cellules musculaires lisses de lymphangiomyomatose; I: marquage NOS-3 sur un poumon exposé à la fumée de cigarette. D'après Kobzik<sup>72</sup>

#### D. Les arginases

Dans les voies aériennes, les arginases I et II sont toutes les deux exprimées de façon constitutive par les cellules des voies aériennes, particulièrement par les cellules de l'épithélium bronchique et les (myo)fibroblastes, par les cellules endothéliales et les macrophages alvéolaires. De plus, l'arginase II est exprimée par les cellules épithéliales du parenchyme pulmonaire <sup>73</sup>.

## **IV. Rôle du NO dans la régulation de la motricité bronchique**

### **A. Généralités sur le système étudié**

La réactivité bronchique est la capacité des voies aériennes (de la trachée aux bronchioles terminales) à réduire leur diamètre lors d'une stimulation donnée. Cette stimulation peut être due à un agent chimique, physique ou pharmacologique<sup>74 75</sup>.

Cette réactivité bronchique repose sur la présence le long des voies aériennes de muscle lisse. L'innervation des cellules musculaires lisses est essentiellement assurée par le système nerveux autonome.

Trois systèmes distincts contrôlent le muscle lisse bronchique :

- un système adrénergique
- un système cholinergique
- un système non adrénergique non cholinergique (NANC)

L'innervation adrénergique (système sympathique) est essentiellement localisée au niveau des grosses bronches. Cette innervation n'a probablement pas de rôle direct et pourrait moduler l'activité du système cholinergique (système parasympathique) par le biais des catécholamines circulantes (adrénaline et noradrénaline). La stimulation du récepteur  $\beta$ -adrénergique ( $\beta_2$ ) du muscle lisse bronchique entraîne une bronchodilatation.

Les voies aériennes sont richement innervées par le système cholinergique (système parasympathique). Le médiateur de ce système est l'acétylcholine. Les récepteurs cholinergiques du muscle lisse bronchique sont de type muscarinique. L'acétylcholine entraîne une contraction du muscle lisse bronchique en activant la phospholipase C, permettant ainsi la formation d'inositol diphosphate et de diacylglycérol à l'origine de mouvements d'ions calcium dans la cellule. Les

variations de concentrations calciques permettent l'activation d'une protéine kinase à l'origine de l'interaction actine-myosine. Cinq types de récepteurs muscariniques ont été identifiés (M1 à M5), la stimulation du muscle lisse bronchique est liée essentiellement au récepteur M3.

Fonctionnellement, le système NANC est divisé en deux composantes :

- NANC<sub>i</sub> ou NANC inhibiteur, bronchodilatatrice.
- NANC<sub>e</sub> ou NANC excitateur, bronchoconstrictrice.

Les neuromédiateurs du système NANC<sub>i</sub> sont le *vasoactive intestinal peptide* (VIP) et ses dérivés et le NO.

Les médiateurs du système NANC<sub>e</sub> sont les tachykinines et le *calcitonin gene related peptide*. Les tachykinines appartiennent à la famille des neurokinines et regroupent la substance P, la neurokinine A et la neurokinine B. Les neurokinines entraînent une contraction du muscle lisse bronchique.

### B. NO et bronchomotricité

Il faut bien différencier deux systèmes :

- le NO, médiateur du système NANC<sub>i</sub>, très étudié et dont l'ensemble des résultats sont concordants.
- Le NO intervenant dans la réponse de la cellule musculaire lisse à des agonistes spécifiques (acétylcholine, histamine).

#### *Le NO et le système NANC<sub>i</sub>*

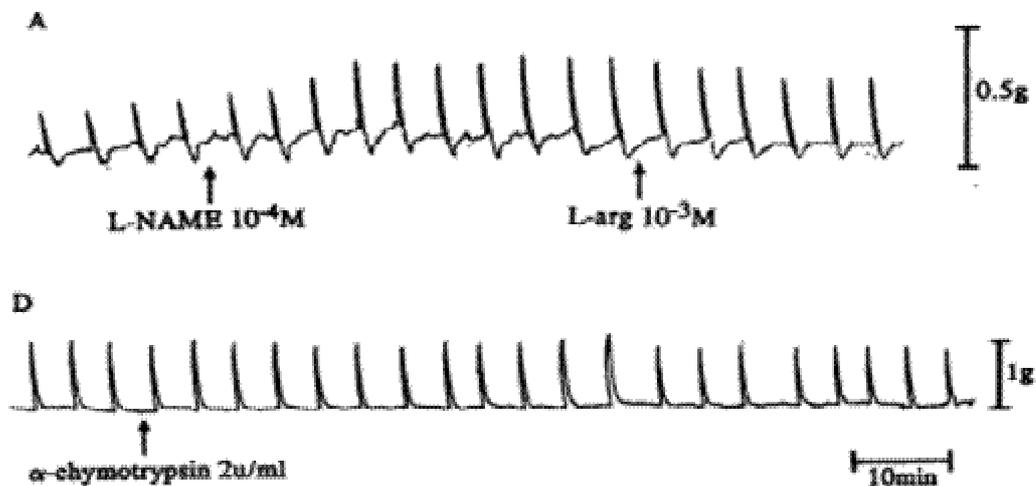
Le rôle du NO dans la régulation du tonus bronchomoteur est une donnée établie depuis de nombreuses années<sup>76 77 78</sup>. Le NO et le VIP (vaso-intestinal peptide) sont

les médiateurs du système non adrénérgique non cholinérgique inhibiteur (NANCI) de la bronchoconstriction du système cholinérgique. Il semble que chez l'homme le NO soit le principal (voire quasi exclusif) médiateur du système NANCI. Dans l'espèce humaine, la place du NO dans la relaxation médiée par le système NANCI a été établie grâce à une série de travaux expérimentaux récents. En effet, à partir de bronches isolées plusieurs observations ont été faites. La stimulation électrique du muscle lisse bronchique entraîne une relaxation qui était insensible à l'action protéolytique de l' $\alpha$ -chymotrypsine, à l'action de propanolol ni de l'atropine <sup>76</sup>. Cette composante bronchodilatatrice neuronale impliquant un neuromédiateur n'était donc ni un neuropeptide (comme le VIP), ni un dérivé cholinérgique, ni un dérivé adrénérgique. Sa nature a été mise en évidence en utilisant des inhibiteurs des NOS: lors de l'utilisation de ces techniques d'électrostimulation sur des bronches isolées humaines, la relaxation du muscle lisse observée était inhibée par la présence d'inhibiteurs compétitifs des NOS (L-NAME et L-NMMA) et était insensible à l'action de l' $\alpha$ -chymotrypsine (inhibiteur du VIP) (voir figure 6) <sup>78</sup>. De plus, il a été démontré que la stimulation du système NANCI augmentait le taux de GMPc dans les cellules musculaires lisses <sup>79</sup>.

Le NO est donc responsable de la relaxation bronchique induite par la stimulation des fibres nerveuses du système NANCI (fibres « nitroxidérgiques »). Le VIP semble jouer un rôle modeste voire aucun rôle dans la régulation du tonus bronchique chez l'homme, à la différence des premières études chez l'animal où la contribution du VIP semble être proche de 50% (cochon d'Inde). Des études immunohistochimiques ont montré la présence de NOS-1 dans les neurones innervant l'arbre bronchique chez l'homme <sup>55</sup>. De plus, ces mêmes techniques et des études fonctionnelles ont

retrouvé un système NANCi plus important sur les bronches proximales que distales

80



**Figure 6:** tracés d'électrostimulation de bronches humaines isolées. A: effets d'un inhibiteur des NO synthases qui augmentent la contractilité du muscle bronchique, cet effet est inhibé par la L-arginine. D: on observe l'absence d'effet de l' $\alpha$ -chymotrypsine, suggérant l'absence d'effet du VIP. D'après Ward et al.<sup>78</sup>

Enfin, l'inhibition du NANCi potentialise la réponse à la stimulation du système parasympathique (augmentation du tonus de base et réactivité)<sup>81</sup>. Il faut noter que les fibres nerveuses du système NANCi sont les seules fibres nerveuses à jouer un rôle bronchodilatateur, et leur atteinte, par des processus inflammatoires par exemple, pourrait altérer leur fonction de bronchodilatation et de bronchoprotection.

#### *Le NO en dehors du système NANCi*

Réponse à l'histamine, à la bradykinine et à l'endothéline: la réalisation de courbes dose-réponse à l'histamine en présence ou non d'inhibiteurs compétitifs des NOS (L-NAME) a montré que le NO endogène diminuait la réactivité bronchique<sup>82</sup>. De même, la relaxation engendrée par les bradykinines est probablement médiée par le

NO endogène (potentialisation de la constriction engendrée par les bradykinines en présence de L-NAME)<sup>83</sup>. Enfin, l'inhibition des NOS module les effets de l'endothéline sur la cellule musculaire lisse<sup>84</sup>. Ces mécanismes d'action du NO endogène sur la cellule musculaire lisse semblent être dépendants de l'épithélium bronchique. En effet, des études ont démontré que la réactivité des bronches sans épithélium était identique à celle des bronches avec épithélium mais en présence de L-NAME<sup>82</sup>.

Réponse à l'acétylcholine ou à la métacholine: peu d'études ont étudié l'action de l'acétylcholine (Ach) sur le muscle lisse bronchique (M3) en présence d'inhibiteurs des NOS. Des études chez l'animal retrouvent une réactivité bronchique à l'acétylcholine augmentée par le L-NAME<sup>85 82</sup>, d'autres études ne retrouvent pas d'effet<sup>86 87 88</sup>. Une étude n'a pas retrouvé d'effet du L-NAME sur la réponse maximale à l'Ach ou sur l'EC<sub>50</sub> chez l'homme<sup>78</sup>.

Mais on ne peut pas conclure que l'inhibition des NOS ne modifie pas la réactivité bronchique à l'Ach. En effet, il faut tenir compte des différentes méthodologies employées<sup>82 86</sup>. L'inhibition de NOS sur la contraction musculaire lisse de trachées de lapin à l'Ach a été étudiée et les auteurs ont démontré que l'activité NOS pouvait dépendre du niveau de tension initiale exercée sur la cellule musculaire<sup>89</sup>. De plus, l'inhibition des NOS dans toutes ces études est une inhibition compétitive, non spécifique des 3 NOS. Les trois isoformes de NOS ont des localisations et des fonctions extrêmement différentes et l'étude des effets des NOS ne doit pas se résumer probablement à l'utilisation de L-NAME ou L-NMMA, inhibiteurs non spécifiques des NOS. Ainsi, à côté de ce rôle bien établi du NO en relation avec

l'activité d'une NO synthase neuronale (NOS-1), il est bien difficile d'avoir une image claire du rôle plus général du NO dans la bronchomotricité.

L'abord expérimental assez radical, consistant en la réalisation de souris invalidées pour les différentes formes de NOS, a quelque peu compliqué l'image simplifiée du NO bronchodilatateur et bronchoprotecteur. Des auteurs ont démontré l'existence d'une hyperréactivité bronchique (HRB) chez des souris KO pour le gène codant pour la NOS-3 (pléthysmographie d'impédance, concentration croissante de métacholine) suggérant un rôle protecteur de la NOS-3, endothéliale <sup>90</sup>. D'autres retrouvent un rôle important de la NOS-1 dans l'induction d'une HRB <sup>91</sup>. Cependant, les explications potentielles du fait que les NOS puissent induire une HRB ne sont pas clairement fournies <sup>88</sup>.

Cette vision complexe des rôles du NO est aussi donnée par les approches thérapeutiques apparemment opposées qui sont proposées dans la maladie asthmatique: utilisation d'inhibiteur spécifique de la NOS-2 (inductible) pour certains ou utilisation de médicaments donneurs de NO pour d'autres <sup>37</sup>.

### C. NOS et bronchopathie chronique obstructive (BPCO)

Alors que le rôle de la NOS-1 semblait assez bien défini (effet bronchoprotecteur via le système NANC inhibiteur), l'effet bronchodilatateur du NO produit par d'autres NOS ou par d'autres cellules reste débattu du fait d'études utilisant des souris déficientes pour certaines NOS, comme décrit précédemment. Ces constatations ont ainsi débouché sur des études évaluant des inhibiteurs de NOS-2, permettant ainsi de restaurer une activité constitutive des NOS en inhibant la NOS inductible. Prado a lui démontré sur un modèle animal d'hyperréactivité bronchique, que le blocage spécifique de la NOS-2 par du 1400W diminuait la bronchoconstriction et les

processus de remodelage. Ceci permettait de supposer qu'une activité NOS-2 augmentée avait des effets sur la réactivité bronchique <sup>92</sup>. Les corticoïdes entraînent une diminution du NO expiré parallèlement à une diminution de l'expression NOS-2. L'étude du NO expiré chez le BPCO, et surtout l'étude d'inhibiteurs sélectifs de la NOS-2, n'a pas permis d'apporter de réponses aussi claires <sup>37</sup>.

Enfin, certains auteurs ont supposé que les rôles différents des NOS et donc du NO, pouvaient être liés à une absence de NOS-1 sur les voies aériennes les plus distales. Cependant, une étude récente a permis de mettre en évidence un rôle accru de la NOS-1 dans le développement des BPCO sévères. En effet, l'étude de l'expression des NOS sur du parenchyme pulmonaire (voies aériennes distales), retrouvée une augmentation de l'expression NOS-1, corrélée avec la sévérité de la maladie <sup>93</sup>.

#### *D. Arginases et bronchoréactivité*

Chez l'homme, la mise en évidence d'une activité arginase pulmonaire a été bien caractérisée dans le travail de Zimmerman et al. En effet, la réalisation de lavage bronchoalvéolaire chez des patients asthmatiques a permis de retrouver une augmentation de l'expression protéique arginase I. De plus, la réalisation de biopsies bronchiques chez ces patients permettait de retrouver une augmentation de l'ARNm arginase I dans les cellules inflammatoires et l'épithélium bronchique <sup>94</sup>.

Les rôles des arginases extra-hépatiques ne sont pas clairement établis. Cependant, il a été démontré que l'arginase de type II joue un rôle de régulateur de l'activité des NOS en contrôlant la biodisponibilité de la L-arginine pour les NOS <sup>73</sup>. Meurs et al. ont démontré en utilisant des préparations de trachées animales que l'activité arginase était importante dans la régulation de l'hyperréactivité bronchique en

diminuant la production de NO bronchodilatateur synthétisé par les cellules épithéliales et par le système NANCi (NOS-1), du fait d'une compétition entre les arginase et les NOS constitutives<sup>95 96</sup>. En effet, le principal rôle fonctionnel respiratoire des arginases a été établi sur des modèles animaux de trachée en utilisant un inhibiteur spécifique des arginases: la N<sup>ω</sup>-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA)<sup>97 98</sup>. L'utilisation de cet inhibiteur a permis de diminuer la bronchoconstriction induite par la métacholine en augmentant la synthèse de NO probablement par les cellules épithéliales. De plus, il a été démontré que la nor-NOHA potentialisait les effets du NO sur la relaxation du muscle lisse bronchique via le système NANCi. Dans ces deux études, les effets de la nor-NOHA étaient reproduits par l'apport exogène de L-arginine, permettant d'apporter la conclusion suivante: les effets des arginases sur le muscle lisse bronchique sont secondaires à une diminution de L-arginine disponible pour les NOS<sup>98 96</sup>.

### *E. Arginases et pathologies pulmonaires*

Cependant, comme les effets des NOS, l'activité des arginases ne se résume pas à la bronchoréactivité et à la cellule musculaire lisse. Lors de l'activation des macrophages, l'activité arginase entraîne une diminution de L-arginine disponible pour la NOS inductible et entraîne ainsi une diminution de la réponse cytotoxique de ces cellules<sup>99</sup>. L'arginase extra-hépatique joue aussi un rôle très important dans les phénomènes de réparation tissulaire via la production de L-ornithine, précurseur des polyamines et de L-proline, essentiels dans la prolifération tissulaire et la synthèse de collagène<sup>100 101</sup>. En effet, une exagération de la réparation tissulaire via les arginases est retrouvée dans les pathologies pulmonaires inflammatoires chroniques,

associant altération des fonctions pulmonaires et remodelage des voies aériennes, comme dans l'asthme, la BPCO, la mucoviscidose. Dans le même sens, une diminution de la production de NO a été retrouvée chez les patients présentant une hypertension artérielle pulmonaire, et chez les patients avec atteinte pulmonaire interstitielle associée à une fibrose excessive et un remodelage anarchique.

L'activité arginase a été étudiée dans la plupart des pathologies pulmonaires. Dans la mucoviscidose, il a été démontré qu'une diminution de production de NO (NO expiré, activité des trois isoformes de NOS) était liée en partie à une augmentation de l'activité arginase et à une diminution de la biodisponibilité en substrat pour la synthèse de NO <sup>102 103</sup>. En effet, l'activité arginase mesurée dans les expectorations des patients était augmentée par rapport aux sujets contrôles. Une mesure de l'activité plasmatique des arginases allait dans le même sens avec une concentration plasmatique de L-arginine diminuée. Cette activité arginase était corrélée aux paramètres de fonctionnement pulmonaire (VEMS) <sup>103</sup>

Chez les patients présentant une hypertension artérielle pulmonaire (primaire ou secondaire), la biodisponibilité de la L-arginine pour les NOS est diminuée par une activité arginase accrue <sup>104 105</sup>. Des études sur l'endothélium artériel pulmonaire de patients présentant une HTAP ont trouvé une augmentation de l'activité arginase II <sup>105</sup>.

Des modèles animaux d'exposition à la fumée de cigarette ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité arginase I. Ceci expliquerait en partie la diminution du NO expiré chez les patients BPCO, impliquant trois mécanismes:

- Stress oxydatif induit par la fumée de cigarette: formation de peroxy-nitrite à partir du NO <sup>5</sup>.
- Diminution de l'expression des NOS <sup>106 5</sup>.

- Augmentation de l'expression arginase I <sup>107</sup>.

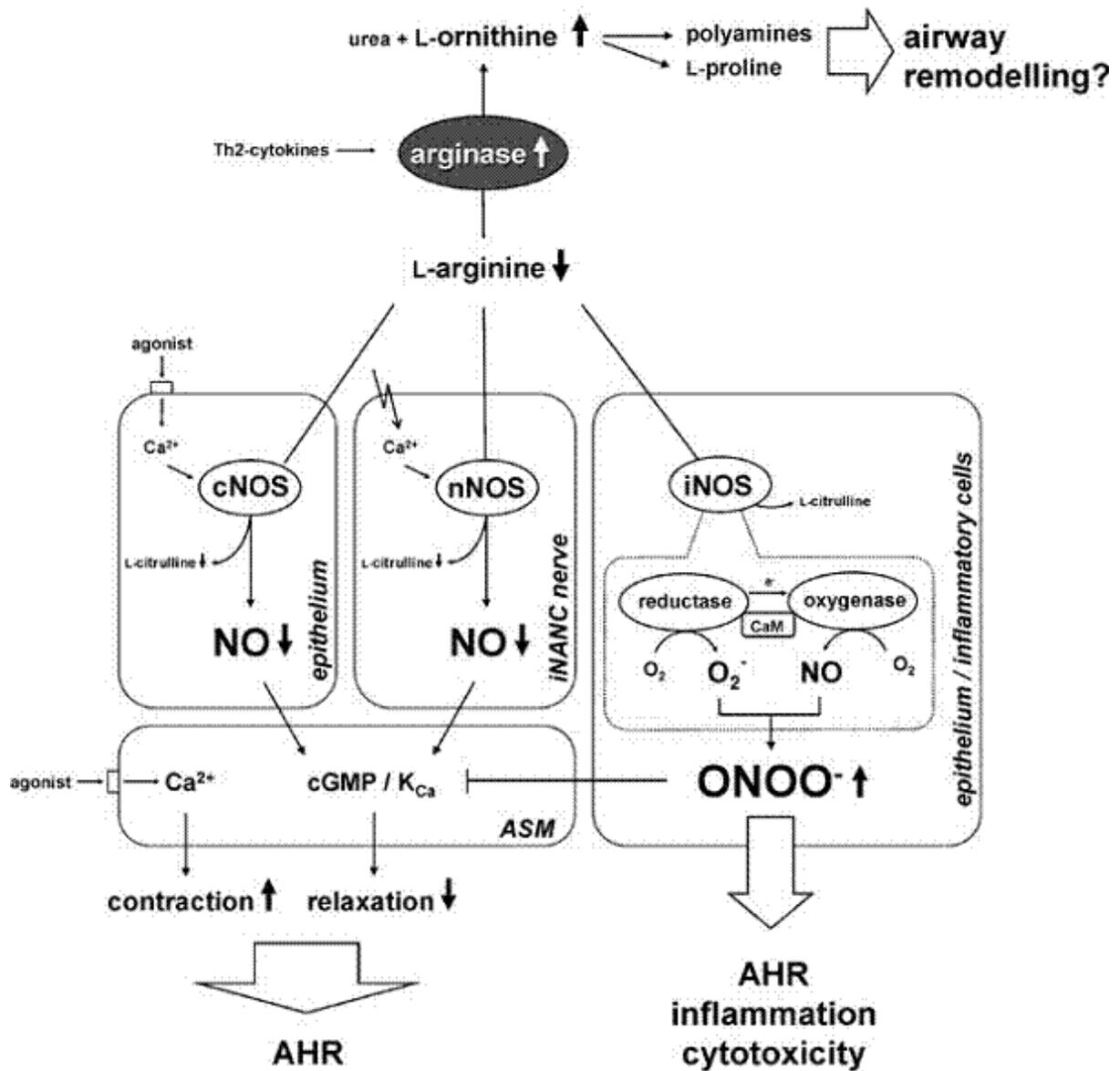
Enfin, dans plusieurs pathologies associées à une fibrose et un remodelage bronchique, comme l'asthme et la BPCO, l'augmentation de l'activité des arginases est probablement à l'origine de ces processus de remodelage. En effet, la transfection de l'arginase I sur de cellules musculaires lisses entraînait une augmentation de synthèse de polyamines et une prolifération cellulaire <sup>108</sup>. De plus, il a été démontré que la stimulation de fibroblastes par différentes interleukines entraînait une augmentation de l'expression arginase I et II, ainsi qu'une augmentation d'activité des arginases <sup>109</sup>. Chez les patients souffrant d'asthme, une stimulation par l'IL-4 entraînait une augmentation de l'expression arginase II des cellules musculaires lisses <sup>73</sup>. De plus, des concentrations plasmatiques de polyamines ont été observées dans le sérum de patients asthmatiques et lors d'exposition de souris à des allergènes <sup>110 94</sup>. Les arginases sont impliquées dans la voie de synthèse des polyamines, impliquées dans la synthèse de la matrice extracellulaire ainsi que dans l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire <sup>111</sup>.

#### F. Balance NO synthase/arginase

L'étude du NO et de la balance NOS/arginase représente une voie d'exploration importante dans la compréhension de certaines pathologies pulmonaires marquées par une obstruction bronchique, comme l'asthme ou la BPCO. En effet, les effets opposés de ces deux systèmes enzymatiques ayant un substrat commun pourraient être à l'origine d'une augmentation de l'inflammation bronchique, d'un remodelage bronchique trop important. Il a été démontré que la présence d'une hyperréactivité

bronchique (HRB) était prédictive d'un remodelage des voies aériennes chez le patient BPCO.

Il existe plusieurs niveaux où les NOS et les arginases sont en compétition. Alors que le  $K_m$  pour la L-arginine varie entre 2 et 20 mM pour les arginases, il se situe entre 2 et 20  $\mu$ M pour les différentes NOS. Il faut noter que la  $V_{max}$  des arginases est 1000 fois plus élevée que celle des NOS<sup>112 24</sup>. Ainsi, arginase et NOS sont en compétition et peuvent dès lors réguler négativement l'activité de l'autre. Par exemple, l'induction par l'IL-4 et IL-13 de l'arginase macrophagique entraîne une déplétion en substrat et donc une diminution de production de NO par le macrophage<sup>113</sup>. De plus, l'hydroxyarginine, produit par les NOS, agit comme un inhibiteur des arginases<sup>24</sup>. Inversement, les polyamines, synthétisées par les arginases, inhibent l'activité des NOS<sup>114</sup>. Ces effets inhibiteurs peuvent avoir des conséquences fonctionnelles importantes. Dans l'hyperréactivité bronchique de l'asthme, Meurs a démontré que l'inhibition des arginases par un inhibiteur spécifique ( $N^{\omega}$ -hydroxy-nor-L-arginine) atténuait la bronchoconstriction induite par la métacholine en augmentant la production de NO du fait d'une plus grande biodisponibilité de substrat<sup>95 96</sup>. Ainsi, les cellules des voies aériennes expriment les trois isoformes de NOS et les arginases. Ces deux systèmes enzymatiques, utilisant le même substrat ont des effets opposés et l'utilisation de la L-arginine aura des effets différents en fonction de l'enzyme qui catalysera la réaction: une augmentation de l'activité arginase aura essentiellement des effets pro-remodelant et pourra contribuer au remodelage bronchique et vasculaire de pathologies pulmonaires inflammatoires chroniques comme la BPCO. L'effet des NOS serait inverse en diminuant la prolifération cellulaire musculaire lisse.



**Figure 7:** schéma représentant la balance NO synthase/arginase d'après Maarsingh et al.<sup>73</sup>

## **V. NO et réactivité vasculaire pulmonaire**

### **A. NO et artères pulmonaires**

Le NO a une activité biologique semblable à l'EDRF et joue un rôle fondamental dans la régulation du tonus vasculaire. La libération de NO de la cellule endothéliale dans la circulation pulmonaire permet la régulation du tonus vasculaire de base et permet de lutter contre la vasoconstriction hypoxique <sup>115</sup>.

### **B. Dysfonction endothéliale: définition**

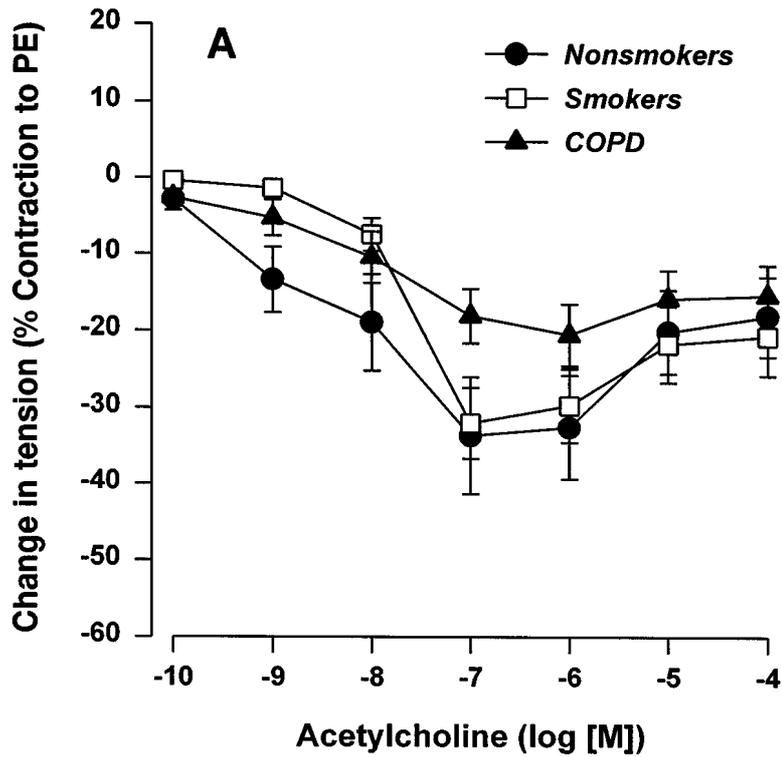
La notion de dysfonction endothéliale au cours des BPCO est établie de longue date, elle semble même apparaître avant l'obstruction bronchique fonctionnelle (stade GOLD 0 de la BPCO). Cette dysfonction atteint les artères pulmonaires et pourrait constituer le lit de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) des affections respiratoires chroniques. Cette dysfonction endothéliale vasculaire pulmonaire se caractérise sur le plan pharmacologique par l'absence de réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine <sup>116 117</sup>. L'endothélium est une couche monocellulaire couvrant toute la surface interne des vaisseaux sanguins. En réponse à différentes substances (cytokines, hormones, drogues...) et stimuli physiques ou chimiques (variations de pression, forces de cisaillement, pH...), les cellules endothéliales synthétisent et sécrètent des facteurs modulant l'angiogénèse, la réponse inflammatoire, l'homéostasie, ainsi que le tonus vasculaire. Elles agissent de façon autocrine, paracrine et endocrine <sup>118</sup>. Les substances vasoactives incluent des facteurs relaxants (adénosine, prostacycline, monoxyde d'azote) et des facteurs contractants (thromboxane A<sub>2</sub>, endothéline-1, angiotensine II, peroxyde d'hydrogène, anion superoxyde...). Les cellules endothéliales communiquent avec les cellules

musculaires lisses (CML) de façon étroite via des jonctions myo-endothéliales, permettant le passage du flux électrique et le transfert d'ions ou de petites molécules comme le calcium et les nucléotides <sup>119</sup>. L'endothélium maintient la balance entre vasodilatation et vasoconstriction, inhibition et promotion de la prolifération et la migration des CML, prévention et stimulation de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire, et enfin thrombogénèse et fibrinolyse <sup>120</sup>. Toute altération de cette balance finement régulée aboutit à une dysfonction endothéliale.

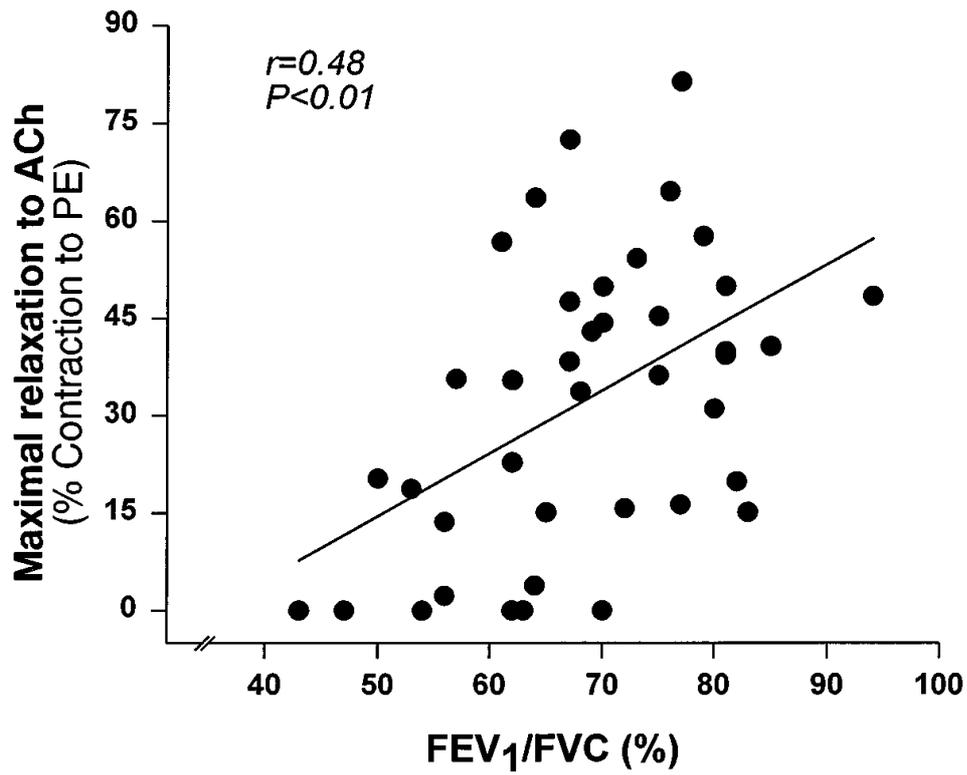
Ce terme a été inventé au milieu des années 80, peu de temps après que Furchgott et al ont découvert que l'acétylcholine (ACh) nécessite la présence de cellules endothéliales pour relaxer les CML <sup>121</sup>. Depuis, le terme de dysfonction endothéliale a été associé à bien d'autres pathologies, comme l'insuffisance coronarienne, l'insuffisance rénale, le diabète, le sepsis, l'inflammation, la thrombose, la transplantation, le tabagisme... <sup>122</sup>

Il existe différents moyens d'évaluer la fonction endothéliale, essentiellement biochimiques par dosage sérique de différents marqueurs (cytokines, molécules d'adhésion, prostanoïdes...) et mécaniques par la mesure de la relaxation dépendant de l'endothélium, *in vivo* en réponse à des agonistes ou des variations de pression dans l'avant-bras, et *in vitro* sur des artères isolées. Pour celles-ci, la dysfonction endothéliale se caractérise par une réponse vasoactive anormale, caractérisée par une abolition plus ou moins complète de la réponse vasodilatatrice voire une réponse constrictrice à l'acétylcholine. L'altération de la relaxation dépendant de l'endothélium d'artères systémiques de sujets fumeurs et de sujets exposés à un tabagisme passif a été démontrée de longue date <sup>117 116</sup>. L'altération de la relaxation dépendant de l'endothélium d'artères pulmonaires a été démontrée chez des patients transplantés pour une BPCO stade IV (emphysème ou dilatation des bronches) <sup>123</sup>. Peinado et al

ont montré une altération significative de la relaxation à l'Ach chez les patients fumeurs atteints de BPCO stade I, mais seulement une tendance à une moindre relaxation chez des fumeurs sans anomalie de la fonction respiratoire (BPCO stade 0) <sup>124</sup>.



**Figure 8** : représentation graphique des changements de tensions observées sur des artères pulmonaires de sujet sains, fumeurs et BPCO en réponse à des concentrations croissantes d'acétylcholine (Ach). Ces variations de tensions sont exprimées en pourcent après contraction maximale à la phényléphrine (PE). D'après Peinado et al <sup>124</sup>



**Figure 9** : relation entre relaxation maximale à l'acétylcholine exprimée en pourcent de contraction maximale à la PE, et le degré d'obstruction bronchique. <sup>124</sup>

### C. NO et dysfonction endothéliale vasculaire pulmonaire

Cette libération de NO est clairement diminuée chez les patients présentant une hypoxie chronique <sup>125</sup>. De plus, l'expression de la NOS endothéliale par les cellules de l'endothélium vasculaire pulmonaire est diminuée chez les patients présentant une hypertension artérielle pulmonaire primitive par rapport aux sujets sains <sup>126</sup>. Ceci suggère que la vasoconstriction artérielle pulmonaire et l'augmentation de la couche musculaire lisse vasculaire qui sont deux phénomènes constants dans cette pathologie sont dus à une diminution de l'expression de la NOS endothéliale. De plus, il a été démontré que l'augmentation de production de NO par la NOS endothéliale permettait de diminuer la pression télésystolique du ventricule droit associée à l'hypertension artérielle pulmonaire mais aussi de diminuer le remodelage vasculaire pulmonaire et l'hypertrophie ventriculaire droite induits par l'hypoxie chronique <sup>127</sup>. Ces données, confirmées par d'autres travaux ont permis de mettre en évidence le potentiel rôle thérapeutique du NO dérivé de la NOS endothéliale ou de donneurs de NO.

Cependant le NO ne se limite pas au tonus vasculaire pulmonaire. En effet, il pourrait jouer un rôle important dans la perméabilité vasculaire. L'utilisation d'inhibiteurs des NOS a permis de mettre en évidence une diminution de la perméabilité microvasculaire induite par la substance P et les leucotriènes (LTD4). Ceci a confirmé le rôle du NO dans la genèse d'une augmentation de la perméabilité microvasculaire induite par des médiateurs de l'inflammation: l'inhibition des NOS par les médiateurs de l'inflammation serait à l'origine d'une diminution de la microvascularisation et ainsi une diminution de la vascularisation des vaisseaux et une augmentation de leur perméabilité <sup>128</sup>.

D. Dysfonction endothéliale et trouble de la relaxation bronchique: étude du BPCO, biais méthodologiques

*Contexte clinique*

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une pathologie des voies aériennes fréquente, généralement secondaire à une consommation tabagique importante (>15 PA). Elle est caractérisée par un trouble ventilatoire obstructif incomplètement réversible après administration de bronchodilatateurs. Les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) permettent de déterminer le degré d'obstruction, définissant ainsi un stade de la classification internationale GOLD <sup>129</sup>. La physiopathologie de l'obstruction bronchique, l'augmentation de la résistance à l'écoulement des gaz est multifactorielle et complexe. Il existe une réduction de calibre des bronches, conséquence des phénomènes inflammatoires, d'hypersécrétion de mucus et de modifications structurales de la paroi des petites bronches, aggravée éventuellement par la diminution des forces de rétraction élastique du parenchyme pulmonaire sur les voies aériennes (perte d'attachements alvéolaires). La diminution extra-luminale, pariétale du calibre des voies aériennes distales est en relation avec un processus de remodelage de la paroi bronchique mais aussi de constriction du muscle lisse bronchique. Ainsi, Hogg et al. ont clairement montré qu'aux stades initiaux de la BPCO, le remodelage bronchique est peu significatif, suggérant l'importance des modifications des propriétés contractiles des cellules musculaires lisses bronchiques (la masse musculaire lisse n'est pas augmentée) <sup>130</sup>. Ces modifications des propriétés contractiles restent le sujet de controverses ; cependant on peut considérer qu'il existe un tonus bronchoconstricteur élevé au cours de la BPCO mis en évidence sur le plan clinique

<sup>131</sup>.

Une association clinique a été mise en évidence entre l'existence d'une dysfonction endothéliale et une obstruction bronchique <sup>132 133 134</sup>. Cette association clinique n'a malheureusement pas été étudiée sur le plan expérimental. Cependant, l'existence d'un trouble de relaxation des cellules musculaires lisses bronchiques et vasculaires pourrait être liée à un mécanisme GMPc dépendant.

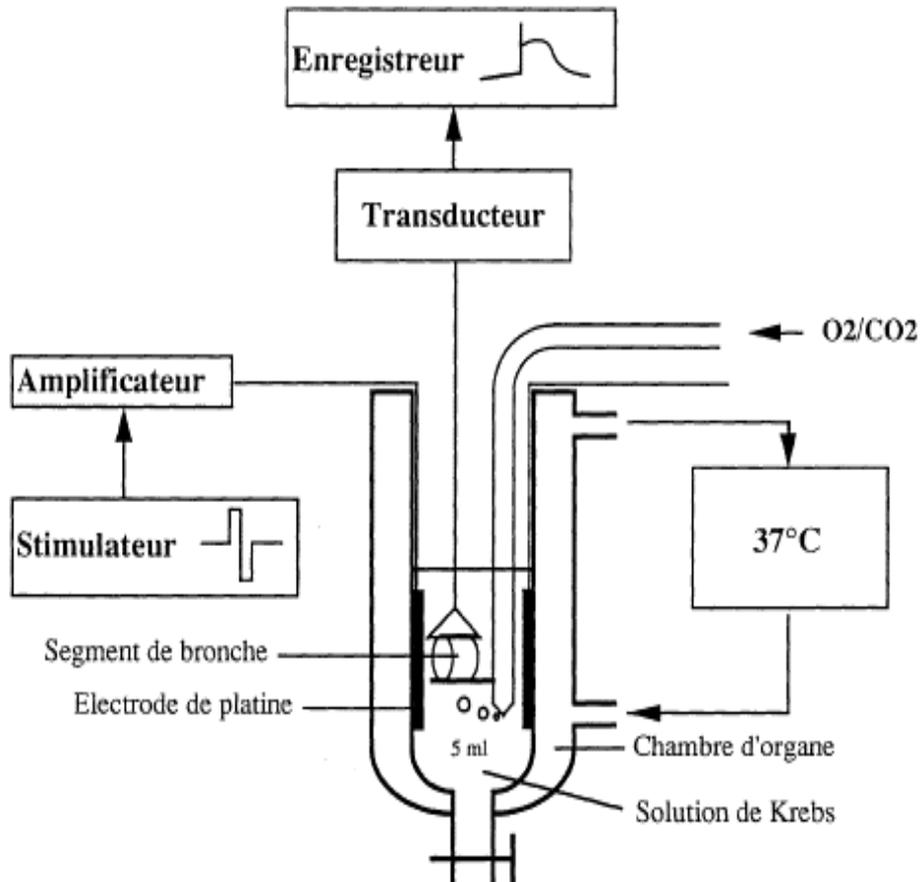
#### *Tonus de base : définition et biais méthodologiques*

De façon étonnante, relativement peu de données existent dans la littérature quant aux médiateurs impliqués dans l'établissement du tonus basal. Ce tonus de base correspond à la tension initiale de la bronche mesurée avant application d'agents pharmacologiques, lors d'études ex-vivo en chambre à organe isolée (figure du dispositif) <sup>135</sup>. Dès lors, ce tonus de base semble dépendre du niveau de tension appliqué expérimentalement et de l'origine de la bronche. Selon le degré du niveau de mise en tension seront mis en jeu des médiateurs locaux régionaux ou intracellulaires relaxants ou constricteurs différents. Le rôle de la voie GMPc et du NO dans l'établissement du tonus de base n'a pas été exploré. Seules quelques études pharmacologiques ont retrouvé un rôle important des leucotriènes dans la régulation de la tension de base <sup>136 135</sup>.

Les études portant sur la tension de base (modèle humain ou animal) utilisent toute une méthodologie similaire correspondant à l'étude ex-vivo en chambre à organe isolé, avec ou sans utilisation d'électrostimulation. Cette méthodologie peut présenter plusieurs biais et le niveau de tension de base initial des anneaux bronchiques (ou segments d'artères) est un paramètre majeur de ces conditions expérimentales. Des expériences préliminaires ont permis de définir qu'une tension initiale située entre 2000 et 2500 mg était optimale (nous utiliserons par convention l'unité de masse, le g

même si l'utilisation du Newton est plus rigoureuse)<sup>78</sup>. Ce niveau de tension de base est d'autant plus important que les médiateurs biologiques impliqués dans la réponse à l'étirement varient selon le niveau de tension. Une étude a d'ailleurs montré que la voie du NO pouvait être impliquée dans la régulation du tonus de base pour des niveaux d'étirement de base assez élevés (2000 mg sur de la trachée de lapin alors que cette voie n'était pas impliquée pour des niveaux de tension de base plus faibles (500 mg))<sup>89</sup>.

De plus, la question est de savoir si la bronchomotricité observée in vitro est pertinente pour l'étude de la bronchomotricité in vivo. Quelques investigateurs ont pu à la fois explorer in vivo puis ex vivo les bronches de patients. Les résultats sont relativement décevants dans la mesure où il n'existe pas de parallélisme strict entre les réponses bronchomotrices in vivo et in vitro à l'histamine ou à l'acétylcholine<sup>137</sup><sup>138</sup>. Cet élément doit être gardé en mémoire lorsque l'on veut étudier les conséquences fonctionnelles ex vivo de différents phénotypes in vivo (fumeurs versus non fumeurs ou hyper-réactifs versus absence d'hyper-réactivité).



**Figure 10:** représentation d'une cuve à organe isolée permettant l'étude de la réactivité bronchique et vasculaire. Le segment étudié est relié par un crochet à un transducteur permettant l'enregistrement des variations de tension en fonction des conditions expérimentales.

## VI. Autres fonctions du NO dans le poumon

Alors que le NO et ses dérivés jouent un rôle dans la physiologie de la contraction ou la relaxation de la cellule musculaire lisse bronchique ou vasculaire pulmonaire, son rôle ne se limite pas à la « simple » régulation de la contraction musculaire lisse. En effet, cette molécule entre dans toutes les grandes « étapes » de la physiologie et la physiopathologie des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire:

- Lors du développement intra-fœtal du poumon, l'expression de certaines isoformes de NO synthases (NOS-1 et NOS-3) augmentent tout au long du développement pulmonaire <sup>139</sup>. L'étude du développement pulmonaire chez le fœtus du mouton a permis de mettre en évidence une expression de la NOS-3 dans les bronches proximales et non sur celles terminales par l'utilisation de différentes techniques de mise en évidence des NOS (immunohistochimie, ARNm spécifique, NADPH diaphorase, RT-PCR) <sup>140 141 142 143</sup>. Enfin, des études chez le primate ont retrouvé une augmentation de l'expression de ces deux isoformes lors du dernier trimestre, période de développement parenchymateux avec angiogenèse <sup>144</sup>.

- Le NO, via ses capacités de S-nitrosylation joue un rôle dans l'expression de gènes par les différentes cellules du parenchyme pulmonaire <sup>145</sup>. En effet, il permet la stabilisation et l'augmentation des capacités à lier l'ADN de l'Hypoxia-inductible-factor (HIF), joue un rôle dans l'expression du CFTR et inhibe l'inactivation du NFκB <sup>146</sup>.

- L'utilisation d'inhibiteurs des NOS ne semble pas influencer la sécrétion de mucus, cependant, des études ont retrouvé un effet de ces inhibiteurs sur la

sécrétions de mucus induite par la métacholine ou la bradykinine <sup>147</sup>. Dans le même sens, l'utilisation de donneurs de NO stimulaient la sécrétion de mucus par les glandes sous-muqueuses. Le NO endogène stimulerait ainsi la sécrétion des glandes sous-muqueuses des voies aériennes.

- La mobilité ciliaire est fondamentale dans les mécanismes de défense immunitaire. Certaines cytokines comme le TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  permettent la synthèse de NO par induction de la NOS-2 macrophagique et entraîne une augmentation de la motilité ciliaire <sup>148</sup>. Leur action est inhibée par un inhibiteur non spécifique des NOS, le L-NMMA, et restaurée par l'apport de L-arginine, suggérant ainsi un rôle important de la NOS inductible macrophagique. De plus, les patients présentant une dyskinésie ciliaire primitive présentent de faible niveau de NO expiré et nasal. Le traitement de ces patients par de la L-arginine présente une amélioration de leur transport mucociliaire <sup>149</sup>.

- Le NO est aussi un régulateur physiologique des mouvements d'ions transépithéliaux. En effet, le NO permet d'activer les canaux potassiques apicaux mais aussi baso-latéraux via un mécanisme GMPc dépendant <sup>150</sup>. Le transport d'électrolytes à travers la membrane cellulaire joue un rôle fondamental dans la composition du surfactant et du mucus, dans la clairance muco-ciliaire et ainsi sur la survenue d'infections pulmonaires ou de pathologies respiratoires chroniques.

- Enfin, la réalisation de lavages bronchoalvéolaires chez des patients mucoviscidosiques (mutation $\Delta$ F508), a retrouvé des concentrations de S-nitrosothiols (SNO, forme bioactive du NO) diminuées par rapport aux sujets sains <sup>102</sup>. Le métabolisme des SNO apparait augmenté chez ces patients, et l'augmentation des concentrations de SNO par l'apport de S-nitrosoglutathion permet d'améliorer la fonction respiratoire de ces patients <sup>151</sup>.

## **VII. Mesure du NO produit par les voies aériennes: NO expiré et nasal**

### *A. Méthodologie*

Chez l'homme, le gaz expiré contient du NO qui est mesurable. La détection du NO d'origine broncho-pulmonaire dans le gaz expiré des patients est possible depuis les années 1990 <sup>152</sup>. L'avantage technique majeur de cette méthode est de pouvoir mesurer des fractions de NO sous sa forme gazeuse, de distinguer sa production bronchique et alvéolaire, dans des conditions physiologiques, lors de pathologies pulmonaires ou pour explorer les fonctions biologiques du NO.

#### *Mesure du NO expiré et nasal*

La plupart des appareils de mesure utilisent le principe de la chimioluminescence qui consiste à compter le nombre de photons émis lors du retour à l'état stable des molécules de NO<sub>2</sub> produites par la réaction du NO en présence d'excès d'ozone: le signal lumineux mesuré est proportionnel à la concentration de NO dans le milieu étudié et l'appareil indique une concentration en ppb ( $10^{-9}$  l/l : part par milliard ou milliard en terminologie anglo-saxonne). Le temps de réponse est inférieur à 0,5 s et la sensibilité de détection est inférieure à 1 pbb. La très grande majorité des études cliniques ont été effectuées avec ce type de matériel. Cependant, ces machines sont coûteuses (~50 000 €), ce qui limite le développement de la mesure.

Une technique utilisant une mesure par des procédés électrochimiques (réduction du NO en métabolites dosables en phase aqueuse) a été plus récemment développée. Le maniement très simple et le coût considérablement moindre de cette approche devraient être le point de départ d'un nouveau développement de l'exploration du NO

expiré, en proposant une technologie clairement destinée à l'utilisation ambulatoire ou au lit du patient.

### NO expiré

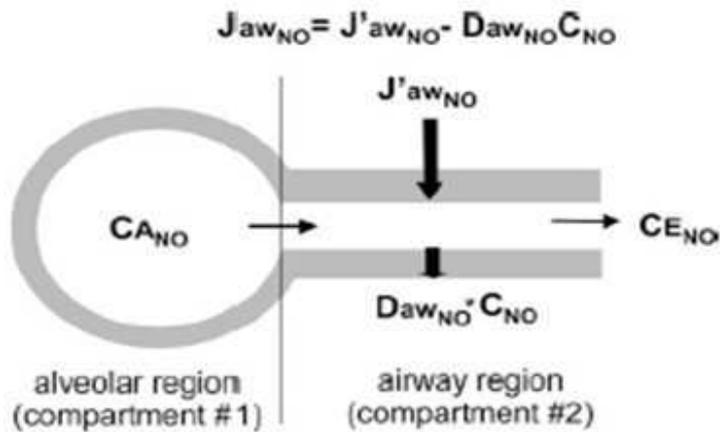
Tsoukias a expliqué la dépendance entre concentration de NO et débit expiratoire par une modélisation du système respiratoire relativement simple qui distingue le NO issu d'un compartiment compressible (constitué de l'espace alvéolaire et bronchiolo-alvéolaire) et le NO issu d'un compartiment non compressible (représenté par les voies de conduction) <sup>153</sup>. Cette description permet de comprendre que la concentration de NO mesurée dans l'air expiré se rapproche de la concentration en NO régnant dans le secteur alvéolaire (concentration faible, < 5 ppb) lors d'une mesure effectuée à débit expiratoire élevé, et se rapproche au contraire de la concentration régnant dans la paroi des voies de conduction (concentration élevée, > 100 ppb) lors d'une manœuvre effectuée à débit expiratoire lent. Dans cette approche compartimentalisée en deux secteurs, la dépendance inverse entre concentration de NO expiré et débit expiratoire peut être décrite par une relation qui fait intervenir trois caractéristiques du NO du système respiratoire <sup>154</sup>: concentration alvéolaire en NO ( $C_{alvNO}$ ), diffusion (passive) du NO au travers de la paroi bronchique ( $D_{awNO}$ ) et concentration intraépithéliale bronchique en NO ( $C_{awNO}$ ). La relation entre concentration de NO expiré, débit expiratoire et ces trois grandeurs indépendantes du débit s'établit sous la forme suivante:

$$F_{E_{NO}}(V') = C_{awNO} + (C_{alvNO} - C_{awNO}) \cdot \exp(-D_{awNO} / V')$$

Le compartiment compressible (poumon profond) contient une (très) faible concentration de NO, variable durant le cycle respiratoire mais qui peut être considérée comme stable ( $C_{alv_{NO}}$ ) après les 8 à 10 secondes d'apnée ou d'expiration continue nécessaire à l'obtention d'un état d'équilibre entre production locale et échange avec le lit vasculaire. Le flux de gaz en provenance de cet espace s'enrichit d'une certaine quantité de NO durant son passage au travers des voies aériennes: cet enrichissement peut être exprimé sous forme d'un débit de NO ( $J_{aw_{NO}}$ ) qui dépend logiquement de la vitesse à laquelle le gaz a circulé dans les voies de conduction ( $V'$ ), de la facilité avec laquelle le gaz diffuse de la paroi bronchique jusqu'à la lumière ( $D_{aw_{NO}}$ ) et du gradient entre concentration en NO au sein de la paroi bronchique ( $C_{aw_{NO}}$ ) et concentration de NO dans la lumière des voies aériennes ( $C_{NO}$ ). Cette relation s'exprime sous la forme:

$$J_{aw_{NO}} = D_{aw_{NO}} (C_{aw_{NO}} - C_{NO})$$

On peut caractériser la contribution des voies aériennes par une autre grandeur ( $J'_{aw_{NO}}$ ) correspondant au débit maximal de NO que peut fournir la bronche lorsqu'il n'y a aucun facteur limitant le transfert du NO. Cette condition non limitante est obtenue lorsque le gradient de concentration entre paroi et lumière bronchique est constant lors du passage de l'air dans les voies de conduction, c'est à dire lorsque le débit de gaz circulant dans les voies aériennes est suffisamment élevé pour emporter « rapidement » le NO jusqu'au milieu extérieur ( $C_{aw_{NO}}$  reste très supérieur à  $C_{NO}$ ).



**Figure 11:** représentation schématique des différents paramètres mesurés par le modèle à deux compartiments: alvéolaire et bronchique. D'après George et al.<sup>154</sup>

### *Valeurs normales*

Dans le modèle en deux compartiments ne tenant pas compte de la diffusion axiale du NO, les valeurs normales de  $C_{alvNO}$ ,  $J'_{awNO}$ ,  $D_{awNO}$ , et  $C_{awNO}$ , sont respectivement : 1,0 à 5,6 ppb, 420 à 1280 pl/s, 3,1 à 9,2  $pl \cdot s^{-1} \cdot ppb^{-1}$  et 75 à 225 ppb.<sup>155 156</sup>

L'avantage de définir ces valeurs normales de paramètres indépendants du débit expiratoire est de pouvoir calculer des normales de fraction expirée de NO pour n'importe quel débit expiratoire.

La production de NO par les voies aériennes et par le parenchyme pulmonaire est liée :

- A l'activité des trois NOS, et particulièrement des NOS-1 et NOS-2.<sup>157 158</sup>
- A l'activité de l'arginase II et des enzymes régulant la synthèse de l'asymmetric dimethyl arginine (inhibiteur endogène des NOS)<sup>159</sup>.
- A la colonisation des voies aériennes par des espèces pouvant jouer un rôle de « dénitrification »<sup>160</sup>.

- Aux procédés physiologiques régulant le pH de l'épithélium des voies aériennes (glutaminase) <sup>161</sup>.

*B. Quelles sont les NOS et les cellules impliquées dans la production du NO expiré ?*

Chez le sujet sain, la NOS-3 qui est exprimée dans la cellule épithéliale où elle régule le battement ciliaire, contribue sans doute à la (faible) production basale de NO mesurable dans l'air expiré. Un argument indirect est l'observation que le NO expiré est diminué de plus de 50% dans les situations où le battement ciliaire est absent <sup>162</sup>. Une participation de la NOS-2 est également établie, l'administration d'inhibiteur sélectif de cette isoforme entraînant une baisse du NO expiré chez le sujet sain <sup>163</sup>. L'augmentation d'expression de la NOS-2 dans l'épithélium bronchique du sujet asthmatique est une donnée « historique » et explique classiquement les concentrations élevées de NO observées dans la maladie <sup>164</sup>. Cette hypothèse est soutenue par l'évidence que l'inhibition sélective de la NOS-2 ou la corticothérapie (directement chez le rongeur ou en réduisant les facteurs inflammatoires qui stimule son activité chez l'homme) diminue considérablement le NO expiré <sup>163</sup>.

Le radical NO diffuse facilement au travers des membranes cellulaires mais il réagit très rapidement dans les milieux biologiques: la concentration de NO expiré reflète ce qui a été synthétisé à proximité immédiate de la lumière bronchique, c'est-à-dire produit i) surtout par la cellule épithéliale bronchique ii) peut-être par la cellule endothéliale vasculaire après diffusion dans l'espace alvéolaire <sup>165</sup> iii) probablement par les différentes cellules inflammatoires présentes à la surface de l'épithélium bronchique ou dans l'espace alvéolaire iv) potentiellement par les cellules neuronales

du système non adrénérgique non cholinérgique présentes à proximité du muscle lisse bronchique, mais ceci reste à démontrer.

L'augmentation de NO expiré a été observée dans plusieurs pathologies respiratoires comparées aux mesures obtenues chez des sujets contrôles. Chez les patients asthmatiques, l'augmentation du NO expiré est associée à une inflammation des voies aériennes à éosinophiles et une augmentation de l'expression de la NOS-2, augmentation sensible à une corticothérapie <sup>166 167</sup>. De plus, l'augmentation de NO expiré chez ces patients peut être utilisée comme un marqueur d'exacerbation de la maladie, voire comme un marqueur de sévérité <sup>168</sup>. D'autres pathologies pulmonaires sont associées à une augmentation de NO expiré: bronchiectasies, rhinites allergiques, rejet aigüe du poumon transplanté <sup>169 170 171</sup>. D'autres pathologies pulmonaires sont associées à une diminution du NO expiré: déficit en  $\alpha_1$ -antitrypsine (phénotype PIZZ) <sup>172</sup>, hypertension artérielle pulmonaire primitive <sup>173</sup>, mucoviscidose <sup>102</sup>.

### C. Mesure du NO expiré chez le patient ventilé

#### Généralités

Du fait que la fraction expirée de NO dépend du débit expiratoire, les sociétés internationales recommandent une mesure à débit expiratoire constant et prolongé permettant d'obtenir un plateau constant de NO <sup>174</sup>. Cette méthodologie est peu applicable chez le patient sous ventilation mécanique. La plupart des auteurs, dans cette situation de ventilation artificielle, mesurent une concentration de NO prélevée à l'extrémité de la sonde d'intubation, en ventilation courante (Figure 13) <sup>175</sup>. Le pic

ou la concentration moyenne sont rapportés, parfois multipliés par le débit ventilatoire moyen (débit de NO).

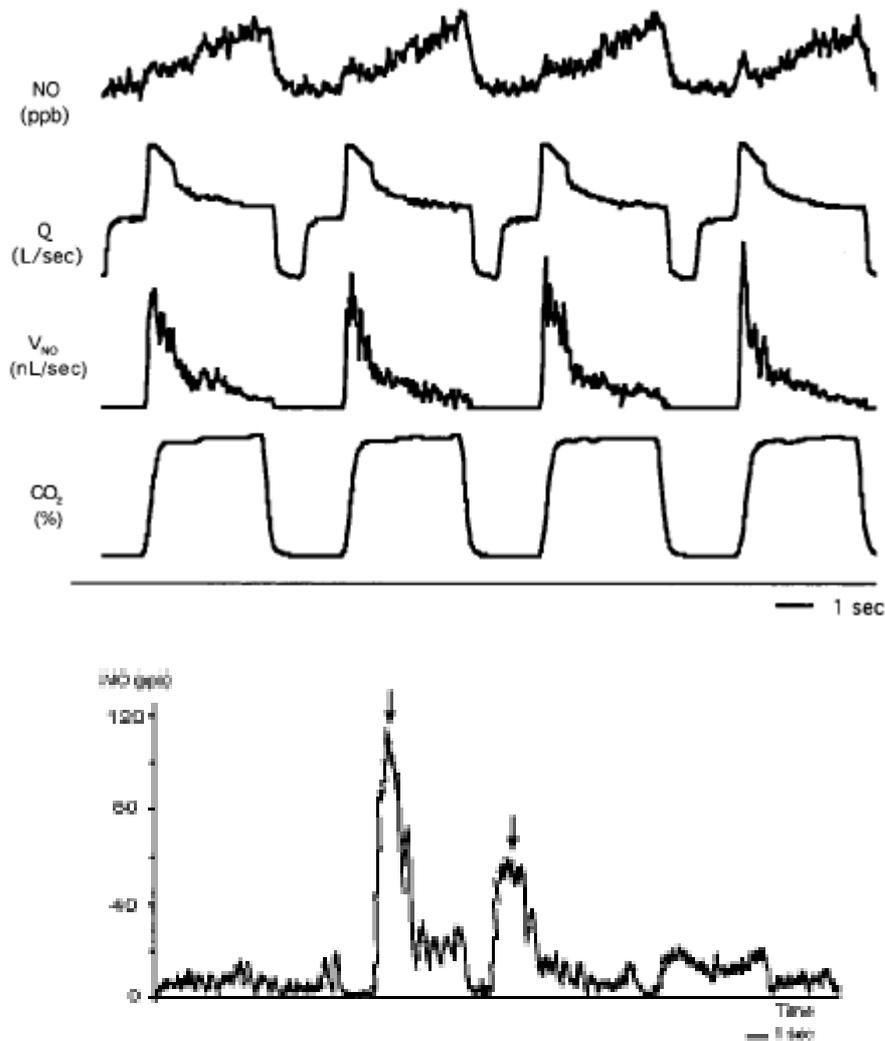


Figure 13 : enregistrement de tracés obtenus chez le patient ventilé : NO expiré, débit (image du haut). Tracé de NO expiré lors de la CEC et en l'absence de ventilation mécanique. Les pics enregistrés correspondent aux épisodes de compression thoracique lors de la chirurgie. D'après Ishibe et al.<sup>175</sup>

Le traitement mathématique des données permettant de déduire les paramètres d'échange du NO (concentration alvéolaire de NO et débit maximal de NO des voies aériennes) n'a encore jamais été utilisé chez le patient sous ventilation mécanique. Seule une étude a mesuré le NO expiré à plusieurs débits expiratoires constants

chez le patient de réanimation par une méthode peu utilisable en routine <sup>176</sup>. L'intubation trachéale ne modifie pas les paramètres qui gouvernent la mesure du NO expiré et le modèle à deux compartiments reste valide. L'intubation trachéale peut diminuer de façon mineure la surface des voies de conduction.

NO expiré et agression pulmonaire aiguë de la chirurgie cardiaque

Plusieurs équipes ont évalué l'intérêt de la mesure du NO expiré en péri-opératoire de chirurgie cardio-vasculaire avec CEC essentiellement dans le but de dépister l'agression pulmonaire aiguë, notamment endothéliale <sup>177 178 179 180 175 181 182 183 184</sup>.

Les résultats issus de ces investigations sont variables, démontrant pour certains une stabilité du NO expiré et pour d'autres une diminution du NO expiré en post-opératoire. Ces auteurs ont pour certains développé une investigation plus fine de la fonction endothéliale par mesure de la bioconversion de vasodilatateurs nitrés intraveineux. Ainsi, l'équipe de Marczin montre une stabilité du NO expiré basal en post-opératoire, alors que la réponse post-opératoire à la nitroglycérine est diminuée, reflétant pour les auteurs l'altération de la fonction endothéliale <sup>182</sup>. Ces investigateurs concluaient que les mesures basales et avec nitroglycérine pourraient représenter différentes sources anatomiques et réponses physiologiques. L'équipe de Weitzberg a confirmé l'altération de la réponse à la nitroglycérine mais a suggéré que la voie NO endothéliale dépendante (réponse à l'acétylcholine) était préservée <sup>184</sup>. Par ailleurs, cette équipe retrouve de façon constante une diminution des valeurs basales de NO en post-opératoire (2ème et 3ème heure post-CEC). Cette même équipe a aussi abordé la problématique de la distinction de l'origine anatomique du NO expiré. Ces auteurs ont mesuré la concentration expirée de NO chez les patients ventilés en réanimation à plusieurs débits expiratoires constants, permettant le calcul

de paramètres d'échange du NO indépendants du débit expiratoire comme cela se fait chez le patient non ventilé<sup>176 165</sup>. Le problème principal de cette méthodologie est la complexité de sa réalisation pratique (en revanche, l'avantage est la simplicité de la solution mathématique de la modélisation), ces auteurs n'ont d'ailleurs pas utilisé leur méthode dans le contexte péri-opératoire. Globalement, l'ensemble de ces investigations a suggéré, sans démonstration formelle, que la mesure de NO expiré pouvait être le reflet de l'agression pulmonaire post-CEC a minima (évaluée sur le rapport PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>). Un des problèmes principaux est que le dogme sous-jacent est que le NO expiré reflète la fonction endothéliale, l'une des solutions apportées ayant été de tester cette fonction endothéliale par la conversion d'un dérivé nitré ou par l'injection d'acétylcholine. Un autre problème est lié au fait que la séquestration vasculaire pulmonaire de neutrophiles est un phénomène constant au cours de la CEC, associé à un certain degré d'œdème interstitiel (reflété par la baisse transitoire du rapport PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>), mais que cela ne présage pas clairement de la survenue ultérieure d'un SDRA. Une seule étude a évalué la mesure du NO expiré dans le SDRA, montrant une diminution de NO expiré dans cette circonstance<sup>185</sup>. Il semble en fait que de façon générale, il existe une diminution de NO expiré chez les patients de réanimation (voir paragraphe sur NO expiré et immunodépression).

#### D. NO nasal

Il y a peu de données sur le NO nasal en réanimation. Deja et al. ont rapporté une diminution du NO nasal chez des patients de réanimation chez lesquels étaient diagnostiqués une sinusite maxillaire nosocomiale et un sepsis<sup>186</sup>. Cette diminution a été rapportée à une diminution de la NOS-2 (ARNm NOS-2). Notons d'ailleurs que

le traitement de la sinusite nosocomiale était associé à une augmentation significative du NO nasal confirmant le rôle essentiel du NO (en particulier de la NOS-2) dans la mobilité ciliaire et les défenses immunitaires. Degano et al. dans leur étude retrouvaient des résultats similaires <sup>187</sup>. De plus, leur étude a permis de mettre en évidence une corrélation négative entre les valeurs de NO nasal et la gravité du patient (mesurée par le score Sepsis-related organ failure assesment, SOFA). Les auteurs expliquaient la diminution de NO nasal essentiellement par deux mécanismes: une diminution de l'expression NOS-2 et une augmentation de réaction entre le NO produit et l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) produisant des nitrites puis des nitrates. Cette production entraînait une diminution de NO mesuré. Cependant, cette faible production de NO nasal pourrait être le reflet d'un manque de substrat. En effet, il a été démontré que l'apport de L-arginine chez certains patients (dyskinésie ciliaire, mucoviscidose) permettait une augmentation du niveau de NO nasal.

### **VIII. Fonctions immunes du NO**

Lorsque le monoxyde d'azote est apparu sur la scène immunologique, le schéma impliquant celui-ci dans le fonctionnement du système immunitaire était assez simple: le NO est produit par les macrophages, stimulés par des cytokines ou des composants bactériens ou les deux<sup>188 189</sup>. La L-arginine permettait la synthèse du NO grâce à la NOS inductible ou NOS-2. Cependant, même si cette schématisation reste vraie, le rôle du NO dans le système immunitaire s'est considérablement complexifié<sup>190</sup>:

- La plupart des cellules du système immunitaire peut produire du NO.
- Les trois isoformes de NOS participent à la synthèse du NO dans le système immunitaire.
- L'action du NO n'est pas limitée à une action locale. Sa grande capacité de diffusion, lié à d'autres molécules, lui permet d'avoir une action à distance du site de synthèse.
- L'action du NO ne se limite pas, comme les cytokines par exemple, à un effet induit par l'association molécule-récepteur. En effet, les multiples cibles du NO lui confèrent des effets multiples et hétérogènes.

Les mécanismes qui régulent la production de NO et entraînent ainsi une immunomodulation dépendent de la cellule et de la NOS régulée. En effet, comme nous l'avons détaillé précédemment, les NOS-1 et 3 existent dans la cellule sous forme de protéines activées par l'élévation de la concentration intracellulaire de calcium. La NOS inductible (NOS-2) est régulée par un mécanisme transcriptionnel. Ainsi, l'activation des gènes promoteurs de la NOS-2 est un

mécanisme de régulation qui a bien été étudié. Les mécanismes propres de stimulations dépendent du stimulus et de la cellule stimulée.

#### A. Source de NO dans le système immunitaire

De nombreuses cellules du système immunitaire produisent du NO: cellules dendritiques, cellules NK, monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles<sup>191</sup>. D'autres cellules impliquées dans les réactions immunes produisent elles aussi du NO: cellules endothéliales, cellules épithéliales, cellules musculaires lisses vasculaires ou bronchiques. De plus, plusieurs études ont retrouvé la NOS-2 et la NOS-3 dans les macrophages, les cellules dendritiques et des cellules dérivées des lignées B et T. Enfin, les trois isoformes de NOS ont été retrouvées dans les cellules B et T<sup>192 193 194 195 196</sup>.

**Tableau 2** : vue générale des cellules du système immunitaire produisant du NO et les isoformes de NOS impliquées. D'après Bogdan C <sup>189</sup>

Cellules	Stimulus	NOS impliquée	Effets du NO
<i>Macrophages</i>			
Macrophages rat et homme	IFN- $\gamma$ +LPS ; IFN- $\gamma$ ; IL-4	NOS-2	Activité antimicrobienne
Macrophages alvéolaires rat	Surfactant	NOS-3	Effets anti-inflammatoires ?
<i>Cellules dendritiques</i>			
Cellules de Langerhans, souris	IFN- $\gamma$ +LPS	NOS-2	Effets pro-inflammatoires ?
Cellules dendritiques immatures (moelle osseuse souris)	IFN- $\gamma$ +LPS	NOS-2	Diminution de la croissance bactérienne
Cellules dendritiques (thymus rat)	Aucun	NOS-2	Pro-apoptotique
<i>Cellules Natural Killer</i>			
Cellules NK rate souris	IL-2, IL-12	NOS-2	Libération IFN- $\gamma$ et augmentation effet cytotoxique
Cellules sanguines humaines NK	IL-2 et anti-CD16 ou cellule cible	NOS-3	Effet anti-apoptotique
Cellules sanguines humaines NK	IL-12, TNF	NOS-2	Diminution effets cytotoxiques, diminution granzyme B.
<i>Cellules T</i>			
Cellules T souris	Anti-CD3	NOS-1	Effet pro-apoptotique
Cellules T leucémiques homme (jurkat)	SDF1 $\alpha$	NOS-3	Augmentation de la réponse chimiotactique au SDF1 $\alpha$
<i>Cellules B</i>			
Cellules lymphome de Burkitt	Aucune	NOS-2	Effet anti-apoptotique
Cellules B leucémie lymphoïde chronique	Aucune	NOS-2	Effet anti-apoptotique

## B. Fonctions immunes du NO

Les fonctions immunes du NO sont multiples et une description exhaustive n'est pas envisageable. Cependant, nous avons distingué trois grandes parties :

- NO et contrôle du processus infectieux
- Régulation des facteurs de l'inflammation par le NO
- NO et polynucléaire neutrophile.

### *NO et contrôle du processus infectieux*

L'exposition de cellules immunitaires à des composés bactériens comme le LPS, peptidoglycane, de l'ADN bactérien voire des bactéries intactes entraînent une augmentation de l'expression de la NOS-2 et une augmentation de la production de NO<sup>197 198 199 200 201</sup>. Ainsi, la formation de NO par la NOS-2, essentiellement par l'action des peroxy-nitrites, agit comme une molécule cytotoxique. De plus, le rôle fondamental du NO et de la NOS-2 dans le contrôle des processus infectieux a été clairement établi sur des modèles murins KO pour le gène de la NOS-2, illustrant le rôle central de cette molécule dans la défense contre les infections virales, bactériennes ou fongiques<sup>201</sup>. Cependant, le rôle de la NOS-2 dans les réactions antimicrobiennes est moins bien établi. Les effets cytotoxiques du NO initialement supposés directement sur les agents infectieux portent aussi sur les tissus hôtes et entraînent des destructions tissulaires.

### *Régulation des facteurs de l'inflammation par le NO*

Les réponses cellulaires au stress oxydatif et/ou nitrrosatif sont généralement régulées au niveau transcriptionnel<sup>202</sup>.

### *Voie NF-κB*

Cette voie joue un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire/immunitaire cellulaire chez l'homme : prolifération des cellules B et T, expression et synthèse cytokinique et des molécules d'adhésion, régulation de l'apoptose<sup>203</sup>. L'activation de NF-κB est essentielle à l'expression de la NOS-2 et le NO peut réguler de différentes façons NF-κB. En effet, le NO peut inhiber l'activité de NF-κB par S-nitrosylation de la sous-unité p50<sup>204</sup>. Cependant, il a été démontré que le NO pouvait être activateur de NF-κB, en agissant sur les facteurs régulant négativement son activité (S-nitrosylation du facteur inhibiteur de l'activité NF-κB p21<sup>ras</sup>)<sup>205 206</sup>. De plus, le NO peut réguler négativement l'activité de la voie NF-κB en diminuant l'activité de l'IK kinase, à l'origine de la dissociation de l'IκB de NF-κB, permettant l'activation de NF-κB, même si de faibles concentrations de NO entraînent l'effet inverse<sup>207 208</sup>. Enfin, des études in-vivo ont retrouvé un rôle activateur de NF-κB du NO dans des situations d'état de choc hémorragique ou d'ischémie reperfusion<sup>209 210</sup>.

### *Janus Kinases*

Les Janus Tyrosine Kinases sont exprimées de façon ubiquitaire et jouent un rôle très important dans la régulation de grandes fonctions cellulaires. Elles permettent la conversion d'un signal extracellulaire à la surface de la cellule en une réponse transcriptionnelle de la cellule en phosphorylant certaines protéines intracellulaires comme les protéines STAT (signal transducer and activator of transcription). Il a été démontré que le NO pouvait inhiber l'activité de Jak2 et Jak3<sup>211</sup>. De plus, le NO produit par les macrophages alvéolaires activés joue un rôle inhibiteur de la prolifération cellulaire T. Ce rôle inhibiteur repose sur une inhibition de Jak1 et

Jak3 par le NO <sup>212</sup>. Cependant, là encore, le rôle du NO n'est pas clairement uniciste. En effet, chez la souris en état de choc hémorragique, le NO produit par l'activation de la NOS-2 permettrait une stimulation de Stat3 à l'origine d'une augmentation de synthèse de l'IL6 et du G-CSF <sup>209</sup>.

Le NO est à l'origine d'une régulation d'autres facteurs de transcription : bactériens (OxyR, SoxR) ; AP-1, via des mécanismes GMPc dépendant ou de S-nitrosilation

213 46 47 .

### *NO et polynucléaire neutrophile*

La synthèse de NO par le polynucléaire neutrophile (PNN) et son action diffèrent en fonction de l'espèce étudiée. Il a été démontré chez le rongeur que les PNN pouvaient produire du NO via la NOS-2, en réponse à une stimulation par le LPS, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  <sup>189</sup>. Chez l'homme, la production de NO par le PNN est plus controversée. Plusieurs études n'ont pas retrouvé de production de NO par le PNN. Cependant, les PNN isolés dans la cavité buccale et dans l'urine de patients présentant une infection urinaire exprimaient la NOS-2 <sup>214</sup>. De plus, les PNN ayant phagocyté des bactéries semblaient exprimer la NOS-2 <sup>214</sup>. Enfin, il semblerait que, même si les PNN activés ne peuvent pas synthétiser directement du NO, ils peuvent convertir la N-hydroxy-L-arginine en nitrite, nitrate et citrulline <sup>215</sup>.

En plus de ses effets anti-microbiens directs, le NO peut réguler les fonctions du PNN. En effet, des études in-vitro ont démontré que le NO et des donneurs de NO entraînaient une diminution de la dégranulation, de la production des leucotriènes, de la synthèse d'anions superoxide ainsi que la migration des PNN <sup>216 217</sup>. De plus, le NO a un rôle important dans le recrutement des leucocytes ainsi que dans

l'adhérence de ces cellules à l'endothélium <sup>218</sup>, via probablement un mécanisme GMPc dépendant direct <sup>219</sup> ou via une down-regulation des molécules d'adhésion (P-selectine, ICAM-1) <sup>220 221 222</sup>. Le rôle du NO dans le recrutement leucocytaire in-vivo est encore plus complexe. Les PNN de souris en péritonite et déficientes pour la NOS-1 et la NOS-3 ont une capacité de migration augmentée alors que des souris déficientes pour la NOS-2 présentaient des capacités de migration des PNN identiques aux souris sauvages <sup>220</sup>. Enfin, dans un modèle expérimental de colite sévère, les souris KO pour la NOS-2 présentaient des lésions tissulaires plus importantes que les souris sauvages <sup>223 224</sup>. Et l'utilisation d'inhibiteur sélectif de la NOS-2 dans un modèle expérimental assez proche retrouvait des résultats contraires <sup>225 226</sup>.

### C. Mesure du NO comme marqueur de fonctionnement du système immunitaire en réanimation

#### *Immunité du patient en réanimation*

Dans les suites d'une agression (chirurgicale, infectieuse...), du fait de la réponse au stress, on observe des modifications profondes de l'état immunitaire des patients. Ces modifications affectent notamment les cellules de la défense innée, à savoir monocyte/macrophage et polynucléaires neutrophiles. Ainsi, les monocytes/macrophages ont une diminution de leur capacité à reconnaître et tuer les agents infectieux (associée à une diminution de synthèse de cytokines inflammatoires). Il a été montré que les polynucléaires neutrophiles de patients de réanimation ont eux aussi une diminution de leurs fonctions bactéricides, diminution qui précède la survenue d'infections nosocomiales <sup>227 228</sup>.

### *NO et immunodépression acquise*

Le NO est impliqué dans la régulation de l'ensemble des processus immunitaires. Il intervient dans la régulation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par le monocyte/macrophages, mais aussi dans la régulation de la migration des polynucléaires neutrophiles. Cette diminution de capacité migratoire est une des caractéristiques de l'immunodépression acquise. L'hypothèse selon laquelle le NO pourrait être impliqué dans l'inhibition de la migration des neutrophiles survenant après les processus d'agression a été testée dans une étude animale. Dans cette étude, les auteurs ont mesuré l'expression des NO synthases et leur activité au décours d'une péritonite expérimentale chez le rat, puis ils ont établi le lien de causalité entre la diminution de synthèse de NO observée et l'inhibition de migration des polynucléaires neutrophiles vers les espaces alvéolaires. Cette étude a par ailleurs mis en évidence que la diminution du NO dans le gaz expiré pouvait servir à dépister et suivre l'immunodépression acquise observée après agression<sup>229</sup>.

Comme nous l'avons vu précédemment, en réanimation peu d'équipes ont mesuré le NO expiré. La plupart des auteurs ont mis en évidence une diminution du NO expiré et nasal (voir paragraphe sur le NO expiré et nasal).

## **PARTIE 2: RESULTATS DES TRAVAUX**

## **Article 1**

*Role of nitric oxide synthase/arginase balance in bronchial reactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease*

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*

### Introduction

Dans le poumon, les cellules endothéliales, épithéliales, ainsi que les cellules musculaires lisses bronchiques peuvent synthétiser du NO et toutes les cellules des voies aériennes expriment au moins une des trois isoformes de NO synthases. De plus, les cellules musculaires lisses bronchiques expriment aussi des arginases. Arginases et NO synthases ont des effets opposés: la première joue un rôle essentiel dans la réparation tissulaire, alors que la seconde diminue la prolifération cellulaire musculaire lisse. Ainsi, il existe une compétition entre les NOS et les arginases pour l'utilisation de leur substrat commun, la L-arginine. Cette balance entre les NOS et les arginases pourrait jouer un rôle dans le remodelage des voies aériennes et la réactivité bronchique dans la phase initiale de la bronchopathie chronique obstructive. En effet, la présence d'une hyperréactivité bronchique à la métacholine constitue un marqueur prédictif de remodelage des voies aériennes et d'obstruction bronchique. Le rôle de cette balance NOS/arginase dans la réactivité bronchique et le tonus bronchique de base n'est pas clairement établi. Alors que le rôle bronchoprotecteur du NO, via la NOS-1 du système NANC inhibiteur est bien démontré, le rôle du NO via la NOS-2 est beaucoup moins clair, et il semblerait que l'utilisation d'inhibiteur spécifique de la NOS inducible permettrait de limiter, en restaurant une activité NOS-1 et NOS-3 prépondérante, l'HRB. Une hyperexpression de la NOS-2 pourrait avoir des effets délétères sur la réactivité bronchique.

Les deux objectifs de ce travail sont :

- Le premier objectif est d'évaluer l'expression de cette balance enzymatique dans le tissu bronchique de patients sans et avec un début de BPCO, avant l'apparition d'un remodelage bronchique important.
- Le second objectif de cette étude est d'évaluer les effets ex vivo d'inhibiteurs de NOS et d'arginases dans la réactivité bronchique de ces patients à l'acétylcholine.

## Discussion

Le résultat principal de cette étude est qu'une augmentation de l'expression NOS-2 est associée à une obstruction bronchique, illustrée par une augmentation ex vivo du tonus bronchique de base. En effet, nous avons retrouvé que l'inhibition non spécifique des 3 NOS par du L-NAME diminuait de façon paradoxale la tension de base, que l'inhibition spécifique de la NOS-2 entraînait une diminution de la tension de base, à la différence de l'inhibition spécifique de la NOS-1 où aucun effet n'était observé. Enfin, même s'il n'a pas été observé d'effet significatif sur la sensibilité et la réactivité des bronches à l'ACh, des inhibiteurs de NOS employés, il faut noter que le L-NAME et l'inhibition spécifique de la NOS-2 entraînaient une modification de sensibilité et de réactivité identique (non significative), opposés aux effets de l'inhibition de la NOS-1.

De plus, nous avons retrouvé une corrélation négative entre les marquages NOS-3 et  $\alpha$ -actine. Ceci suggérerait le rôle antiprolifératif de certaines NOS. Enfin, nous avons trouvé une diminution de la sensibilité des bronches à l'acétylcholine lors de l'utilisation d'inhibiteur des arginases, laissant suggérer que l'augmentation de la disponibilité de la L-arginine pour les NOS lors du blocage de la voie arginase permettrait la synthèse de NO bronchoprotecteur.

Ces résultats illustrent le rôle complexe du NO sur la réactivité bronchique et le tonus bronchique de base dans certaines pathologies pulmonaires marquées par de l'obstruction bronchique et le rôle de la balance NOS/arginase dans la physiopathologie de l'obstruction bronchique.

## **Article 2**

### *Partitioning of exhaled NO in ventilated patients undergoing cardiac surgery*

#### *Respir Physiol Neurobiol*

#### Introduction

La chirurgie cardiaque avec circulation extracorporelle (CEC) entraîne une dysfonction pulmonaire postopératoire allant d'une hypoxémie temporaire et non significative cliniquement à une atteinte respiratoire extrêmement sévère entrant dans le cadre d'un Syndrome de Détresse Respiratoire Aigue (SDRA). Ces complications respiratoires semblent être essentiellement liées à la CEC et une ischémie-reperfusion du parenchyme pulmonaire. Plusieurs auteurs se sont intéressés au NO expiré au cours de la CEC en émettant l'hypothèse que la mesure du NO expiré après la CEC pourrait constituer un marqueur d'atteinte pulmonaire. Les résultats de ces études sont discordants : pas de modification observée après la CEC, diminution franche voire augmentation du NO expiré après CEC. Enfin, des études animales ont démontré que la ventilation mécanique entraînait des lésions des voies aériennes périphériques du fait d'une succession d'ouverture et de fermeture liée à la ventilation mécanique. Cette atteinte des voies aériennes était caractérisée par modifications des propriétés mécaniques du poumon et une diminution du NO expiré.

Les objectifs de cette étude sont d'analyser les changements de NO expiré après la CEC, de déterminer l'origine anatomique des modifications de NO expiré (alvéolaire ou bronchique), et enfin d'analyser l'éventuelle influence de la ventilation mécanique sur ces modifications.

## Discussion

Cette étude apporte les conclusions suivantes :

- On observe une diminution du NO expiré après CEC.
- Cette diminution porte essentiellement sur le NO bronchique.
- Cette diminution de NO expiré n'est pas liée à une diminution globale de production de NO car la mesure de NO nasal est inchangée après CEC.
- Cette diminution du NO bronchique est probablement liée à une occlusion des voies aériennes distales car la PEEP durant la CEC prévient cette diminution.

### **Article 3**

*Prediction of nosocomial infection acquisition in ventilated patients by nasal  
nitric oxide: proof-of-concept study*

*Shock*

#### Introduction

Les infections nosocomiales en réanimation sont à l'origine d'une augmentation de la morbidité et probablement de la mortalité. Ceci est en partie lié à un état d'immunodépression acquis en réanimation. Le développement d'un biomarqueur capable de prédire la survenue d'une infection nosocomiale permettrait le développement de stratégies préventives. Le NO joue un rôle fondamental dans le système immunitaire et la mesure du NO produit par le patient (expiré et nasal) pourrait constituer un marqueur prédictif de survenue d'infections nosocomiales.

Le but de cette étude est d'évaluer la valeur prédictive de la mesure du NO produit par les voies aériennes basses (NO expiré) et hautes (NO nasal) sur la survenue d'infections nosocomiales.

## Discussion

Le résultat principal de cette étude suggère que la mesure du NO nasal pourrait être un bon marqueur prédictif de survenue d'infections nosocomiales, essentiellement des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. Une diminution du NO nasal avait déjà été observée chez les patients de réanimation. Ces résultats étaient surprenant pour les auteurs, car le NO était initialement considéré comme un marqueur de l'inflammation. Cependant, les résultats de cette étude et le rôle clairement établi du NO dans le système immunitaire pose à nouveau la question de l'utilité de l'immunonutrition avec L-arginine, immunonutrition qui a démontré sa capacité, en péri-opératoire, à diminuer l'incidence des infections nosocomiales. En effet, plusieurs études ont confirmé l'intérêt d'un apport en L-arginine chez des patients de réanimation: diminution des infections nosocomiales et des complications post-opératoires de chirurgie majeure. Ce bénéfice pourrait être lié à une correction d'un déficit en L-arginine. Cependant son administration reste encore l'objet de controverse (augmentation de la mortalité chez certains patients avec infections graves). L'identification de patients ayant un déficit acquis en L-arginine et donc un NO nasal bas permettrait de cibler ces patients qui pourraient bénéficier d'un apport en L-arginine.

## TRAVAUX ASSOCIES

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les différents travaux réalisés dans cette thèse nous ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

- Le NO n'a pas un effet univoque de relaxation sur la cellule musculaire lisse. La NOS impliquée et le stimulus à l'origine de sa synthèse sont deux déterminants fondamentaux des effets du NO
- La mesure du NO expiré chez le malade ventilé pourrait permettre une approche de lésions induites par la ventilation mécanique.
- La mesure du NO nasal en réanimation pourrait représenter une approche intéressante du monitoring de l'immunité chez les patients graves.

Le premier travail a retrouvé chez le BPCO une augmentation de l'expression de la NOS-2, associée à l'obstruction bronchique. Ces données suggéreraient un bénéfice d'une inhibition spécifique de la NOS-2 chez ces patients. Des inhibiteurs spécifiques de la NOS-2 existent. L'équipe de Barnes a réalisé une étude utilisant un inhibiteur de NOS-2 inhalé (aminoguanidine), permettant de diminuer de façon significative le NO expiré (bronchique) et une tendance à la diminution du NO alvéolaire et des concentrations de peroxy-nitrite<sup>37</sup>. Ces données ont été retrouvées chez des patients asthmatiques. Cependant, la diminution du NO expiré après inhibition sélective de la NOS-2 n'est pas associée à une diminution de l'hyperréactivité bronchique ni à l'inflammation bronchique<sup>230</sup>. Il semblerait que l'augmentation de l'expression NOS-2 ne soit pas le seul phénomène à l'origine des modifications des propriétés contractiles de la bronche. En effet, Brindicci et al. ont retrouvé une augmentation de l'expression et de l'activité NOS-1 dans le tissu pulmonaire périphérique des patients BPCO, corrélée avec la sévérité de la maladie<sup>93</sup>.

La mesure du NO expiré chez le malade ventilé en validant la méthode de mesure à deux compartiments nous a permis de conclure que les variations de NO expiré au cours de la ventilation mécanique pouvaient être liées à une atteinte des petites voies aériennes distales (atélectasies ou lésions induites par la succession ouverture-fermeture lors de la ventilation mécanique). Ces données obtenues chez l'homme sont en accord avec les observations faites par l'équipe d'Edgardo d'Angelo chez le lapin <sup>231 232 233</sup>.

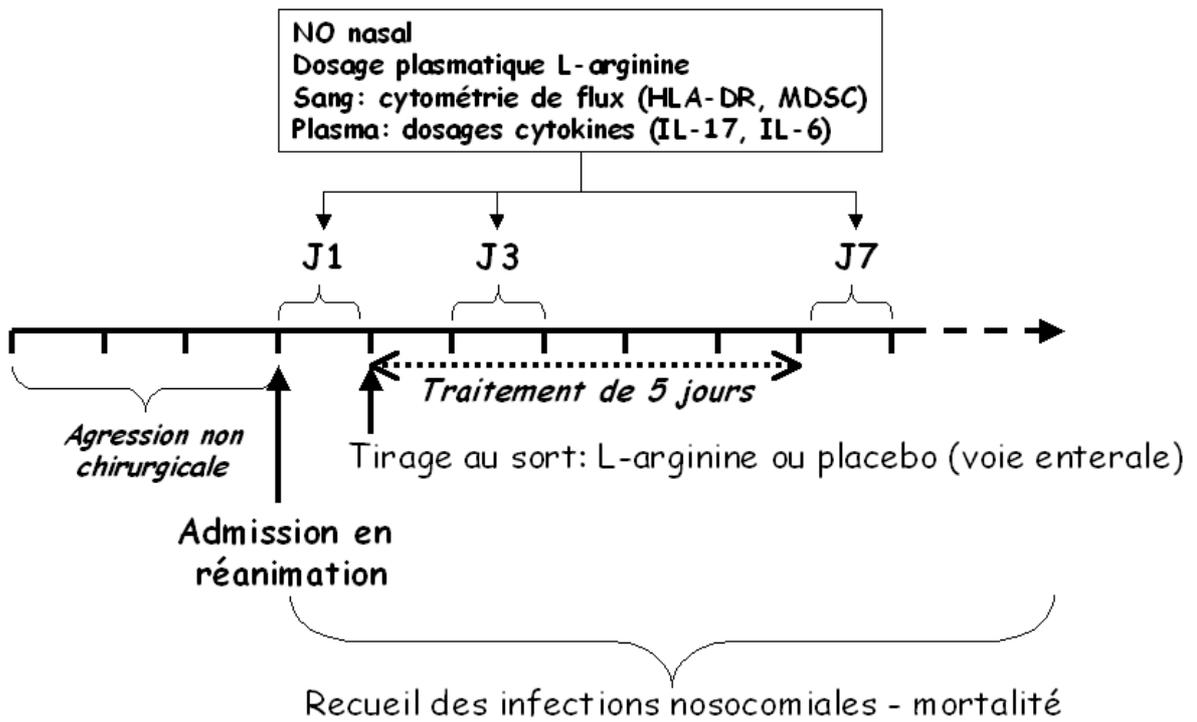
Enfin, les résultats obtenus lors du troisième travail chez le patient de réanimation pourraient permettre d'explorer de façon simple la dysfonction immunitaire acquise en réanimation, source d'infections nosocomiales et donc d'une surmorbidity importante. De plus, nous pensons que la correction de ce paramètre biologique (NO nasal diminué) pourrait permettre de corriger cette dysfonction immunitaire et à terme diminuer l'incidence des infections nosocomiales.

Nous avons ainsi débuté un essai randomisé d'immunonutrition par L-arginine guidée en réanimation non chirurgicale (étude IMMUNOLARG). En effet, les malades hypercataboliques, en particulier de réanimation présentent des besoins nutritionnels qualitatifs particuliers. C'est pourquoi des produits appelés « immune enhanced diets » ont été mis au point. L'immunonutrition (ou mieux, la pharmaconutrition) fait appel à des nutriments qui ont des effets sur l'immunité (stimulation), la cicatrisation (synthèses protéiques), la réponse inflammatoire et le contrôle des phénomènes de peroxydation <sup>234 235 236 237</sup>. Elle se distingue donc de la « simple » nutrition par l'ajout de divers nutriments aux effets théoriquement immunostimulants, anti-inflammatoires, anti-oxydants. Les bénéfices de l'immunonutrition par rapport à une

nutrition conventionnelle en péri-opératoire de chirurgie sont démontrés, notamment sur l'incidence d'infections nosocomiales. En revanche, en réanimation, l'immunonutrition reste un sujet de controverse <sup>238</sup>. Les études cliniques ont démontré des effets positifs <sup>239 240</sup>, l'absence d'effet et parfois même des effets délétères sur la survie chez les patients en état de choc septique <sup>241</sup>. Cette différence en terme d'efficacité sur les complications infectieuses est bien mise en évidence dans une méta-analyse lorsque l'on analyse l'effet de l'immunonutrition dans des sous-groupes de patients (péri-opératoire versus réanimation non chirurgicale). Dans cette même méta-analyse, l'analyse de sous-groupes permettait de mettre en évidence que les effets de l'immunonutrition semblaient principalement dus aux essais cliniques ayant évalué des formules riches en L-arginine <sup>237</sup>. La littérature démontre que l'immunonutrition est associée à des effets sur la réponse immunitaire: expression monocytaire d'HLA-DR, sécrétion plasmatique d'interleukine (IL)-6, d'IL-10 et réponse cutanée retardée à des antigènes communs <sup>242</sup>. L'effet clinique de l'immunonutrition semble donc bien dû à une stimulation et/ou restauration des fonctions immunitaires, justifiant le terme d'immunonutrition. Notre hypothèse est que d'associer un critère supplémentaire, la notion de déficit relatif ou absolu en L-arginine (diminution des concentrations de NO des voies aériennes), permettra de sélectionner une population de patients de réanimation médicale où l'effet de l'immunonutrition sera plus franc. Il faut noter que l'élévation de NO des voies aériennes lors d'une administration orale de L-arginine a été vérifiée dans plusieurs contextes (sujets sains, mucoviscidose, dyskinésie ciliaire primitive, drépanocytose). Notre objectif est donc de centrer notre recherche physiopathologique sur les patients de réanimation non chirurgicale et d'évaluer les bénéfices potentiels d'une immunonutrition par la seule L-arginine. Pour répondre à ces objectifs, il est

nécessaire de définir un groupe de patients de réanimation non chirurgicale pouvant bénéficier de l'apport de L-arginine. Pour définir ce groupe, nous utiliserons la mesure non invasive du NO nasal (une diminution affirmant le concept de déficit relatif ou absolu en L-arginine) pour guider l'administration de L-arginine: concept d'immunonutrition dirigée ou guidée. La mesure de NO permet d'écarter les patients fort producteurs de NO (état de choc septique et/ou polymorphisme des enzymes synthétisant le NO) chez qui l'apport en excès d'arginine pourrait être dangereux (innocuité du traitement). L'objectif principal est de montrer que le groupe de patients recevant de la L-arginine, par rapport au groupe n'ayant pas reçu de L-arginine, a une concentration de NO nasal plus élevée et présente de meilleures fonctions immunitaires (expression d'HLA-DR plus élevée et concentrations d'IL-6 et IL-17 plus basses): concept d'immunonutrition (le calcul d'effectif est effectué sur la modification d'expression d'HLA-DR, critère pour lequel on a le plus de données). L'objectif secondaire est de montrer l'absence d'effet délétère de l'immunonutrition sur les défaillances d'organe et sur l'incidence infectieuse nosocomiale: innocuité de l'immunonutrition.

## Schéma de l'étude



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615
2. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG: Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345: 346-7
3. Knowles RG, Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298 ( Pt 2): 249-58
4. Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC: Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7809-13
5. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G: Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84: 731-65
6. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA: Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem* 1994; 269: 33082-90
7. Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR: Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 3491-5
8. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T: Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1992; 307: 287-93
9. Houdijk AP, van Leeuwen PA, Teerlink T, Flinkerbusch EL, Boermeester MA, Sauerwein HP, Wesdorp RI: Glutamine-enriched enteral diet increases renal arginine production. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1994; 18: 422-6
10. Wakabayashi Y, Yamada E, Yoshida T, Takahashi H: Arginine becomes an essential amino acid after massive resection of rat small intestine. *J Biol Chem* 1994; 269: 32667-71
11. Wakabayashi Y, Yamada E, Yoshida T, Takahashi N: Effect of intestinal resection and arginine-free diet on rat physiology. *Am J Physiol* 1995; 269: G313-8
12. Ghosh DK, Stuehr DJ: Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* 1995; 34: 801-7
13. Crane BR, Rosenfeld RJ, Arvai AS, Ghosh DK, Ghosh S, Tainer JA, Stuehr DJ, Getzoff ED: N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization. *Embo J* 1999; 18: 6271-81

14. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J: N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 1991; 266: 6259-63
15. Schmidt HH, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M: No .NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 14492-7
16. Hobbs AJ, Fukuto JM, Ignarro LJ: Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10992-6
17. Murphy ME, Sies H: Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10860-4
18. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS: Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 834-42
19. Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S: Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 191-220
20. Muscara MN, Wallace JL: Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *Am J Physiol* 1999; 276: G1313-6
21. Wink DA, Feelisch M, Fukuto J, Chistodoulou D, Jourdeuil D, Grisham MB, Vodovotz Y, Cook JA, Krishna M, DeGraff WG, Kim S, Gamson J, Mitchell JB: The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch Biochem Biophys* 1998; 351: 66-74
22. Cynober L: Pharmacokinetics of arginine and related amino acids. *J Nutr* 2007; 137: 1646S-1649S
23. Cynober L: About immune-enhancing diets in critically ill patients. *Crit Care Med* 2007; 35: 329-30; author reply 330
24. Morris SM, Jr.: Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 87-105
25. Geller DA, Billiar TR: Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 7-23
26. Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H: Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Faseb J* 1998; 12: 773-90
27. Bredt DS, Snyder SH: Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 682-5

28. Gachhui R, Abu-Soud HM, Ghosha DK, Presta A, Blazing MA, Mayer B, George SE, Stuehr DJ: Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem* 1998; 273: 5451-4
29. Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I: Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 81-8
30. Komeima K, Hayashi Y, Naito Y, Watanabe Y: Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 28139-43
31. Hemmens B, Woschitz S, Pitters E, Klosch B, Volker C, Schmidt K, Mayer B: The protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN): characterization of its action on pure nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 1998; 430: 397-400
32. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC: Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 1998; 392: 821-4
33. Bender AT, Silverstein AM, Demady DR, Kanelakis KC, Noguchi S, Pratt WB, Osawa Y: Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274: 1472-8
34. Ratovitski EA, Alam MR, Quick RA, McMillan A, Bao C, Kozlovsky C, Hand TA, Johnson RC, Mains RE, Eipper BA, Lowenstein CJ: Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 1999; 274: 993-9
35. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T: Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 1996; 271: 6518-22
36. Bryk R, Wolff DJ: Pharmacological modulation of nitric oxide synthesis by mechanism-based inactivators and related inhibitors. *Pharmacol Ther* 1999; 84: 157-78
37. Brindicci C, Ito K, Torre O, Barnes PJ, Kharitonov SA: Effects of aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on nitric oxide production and its metabolites in healthy control subjects, healthy smokers, and COPD patients. *Chest* 2009; 135: 353-67
38. Wolff DJ, Datto GA, Samatovicz RA: The dual mode of inhibition of calmodulin-dependent nitric-oxide synthase by antifungal imidazole agents. *J Biol Chem* 1993; 268: 9430-6
39. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F: Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 203-36

40. Foster DC, Wedel BJ, Robinson SW, Garbers DL: Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999; 135: 1-39
41. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA: Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 375-414
42. Juilfs DM, Soderling S, Burns F, Beavo JA: Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999; 135: 67-104
43. Moncada S, Erusalimsky JD: Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 214-20
44. Brown GC: Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem* 1995; 232: 188-91
45. Stamler JS, Lamas S, Fang FC: Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 2001; 106: 675-83
46. Kim SO, Merchant K, Nudelman R, Beyer WF, Jr., Keng T, DeAngelo J, Hausladen A, Stamler JS: OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* 2002; 109: 383-96
47. Ding H, Demple B: Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5146-50
48. Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C: Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 2003; 140-141: 113-24
49. Schopfer FJ, Baker PR, Freeman BA: NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 646-54
50. Lanone S, Manivet P, Callebort J, Launay JM, Payen D, Aubier M, Boczkowski J, Mebazaa A: Inducible nitric oxide synthase (NOS2) expressed in septic patients is nitrated on selected tyrosine residues: implications for enzymic activity. *Biochem J* 2002; 366: 399-404
51. Gunther MR, Hsi LC, Curtis JF, Gierse JK, Marnett LJ, Eling TE, Mason RP: Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J Biol Chem* 1997; 272: 17086-90
52. Goodwin DC, Gunther MR, Hsi LC, Crews BC, Eling TE, Mason RP, Marnett LJ: Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin

endoperoxide synthase turnover. Detection of the radical derivative of tyrosine 385. *J Biol Chem* 1998; 273: 8903-9

53. Fischer A, Hoffmann B: Nitric oxide synthase in neurons and nerve fibers of lower airways and in vagal sensory ganglia of man. Correlation with neuropeptides. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 209-16

54. Luhrs H, Papadopoulos T, Schmidt HH, Menzel T: Type I nitric oxide synthase in the human lung is predominantly expressed in capillary endothelial cells. *Respir Physiol* 2002; 129: 367-74

55. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS: Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 371-7

56. Li CG, Rand MJ: Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 91-4

57. Widdicombe JG: Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: S171-5

58. Pechkovsky DV, Zissel G, Stamme C, Goldmann T, Ari Jaffe H, Einhaus M, Taube C, Magnussen H, Schlaak M, Muller-Quernheim J: Human alveolar epithelial cells induce nitric oxide synthase-2 expression in alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2002; 19: 672-83

59. Warner RL, Paine R, 3rd, Christensen PJ, Marletta MA, Richards MK, Wilcoxon SE, Ward PA: Lung sources and cytokine requirements for in vivo expression of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 649-61

60. Xue C, Rengasamy A, Le Cras TD, Koberna PA, Dailey GC, Johns RA: Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia. *Am J Physiol* 1994; 267: L667-78

61. Romanska HM, Polak JM, Coleman RA, James RS, Harmer DW, Allen JC, Bishop AE: iNOS gene upregulation is associated with the early proliferative response of human lung fibroblasts to cytokine stimulation. *J Pathol* 2002; 197: 372-9

62. Watkins DN, Peroni DJ, Basclain KA, Garlepp MJ, Thompson PJ: Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 629-39

63. Blackford JA, Jr., Antonini JM, Castranova V, Dey RD: Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxide production in alveolar macrophages and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 426-31

64. Yeadon M, Price R: Induction of calcium-independent nitric oxide synthase by allergen challenge in sensitized rat lung in vivo. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2545-6
65. Haddad EB, Liu SF, Salmon M, Robichaud A, Barnes PJ, Chung KF: Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in Brown Norway rats exposed to ozone: effect of dexamethasone. *Eur J Pharmacol* 1995; 293: 287-90
66. Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F: Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 1788-92
67. Shaul PW: Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 749-74
68. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA: Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest* 1994; 94: 2231-6
69. Pechkovsky DV, Zissel G, Goldmann T, Einhaus M, Taube C, Magnussen H, Schlaak M, Muller-Quernheim J: Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L684-92
70. Kawamoto H, Takumida M, Takeno S, Watanabe H, Fukushima N, Yajin K: Localization of nitric oxide synthase in human nasal mucosa with nasal allergy. *Acta Otolaryngol Suppl* 1998; 539: 65-70
71. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH: Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 83-8
72. Kobzik L: Translating NO biology into clinical advances: still searching for the right dictionary? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41: 9-13
73. Maarsingh H, Pera T, Meurs H: Arginase and pulmonary diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008; 378: 171-84
74. Thirstrup S: Control of airway smooth muscle tone: II-pharmacology of relaxation. *Respir Med* 2000; 94: 519-28
75. Thirstrup S: Control of airway smooth muscle tone. I--electrophysiology and contractile mediators. *Respir Med* 2000; 94: 328-36
76. Ellis JL, Udem BJ: Inhibition by L-NG-nitro-L-arginine of nonadrenergic-noncholinergic-mediated relaxations of human isolated central and peripheral airway. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1543-7

77. Ward JK, Barnes PJ, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG: Evidence for the involvement of cGMP in neural bronchodilator responses in humal trachea. *J Physiol* 1995; 483 ( Pt 2): 525-36
78. Ward JK, Belvisi MG, Fox AJ, Miura M, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Barnes PJ: Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro. *J Clin Invest* 1993; 92: 736-42
79. Kesler BS, Mazzone SB, Canning BJ: Nitric oxide-dependent modulation of smooth-muscle tone by airway parasympathetic nerves. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 481-8
80. Ward JK, Barnes PJ, Springall DR, Abelli L, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Polak JM, Belvisi MG: Distribution of human i-NANC bronchodilator and nitric oxide-immunoreactive nerves. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 175-84
81. Belvisi MG, Stretton D, Barnes PJ: Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol* 1991; 198: 219-21
82. Spicuzza L, Basile L, Belvisi MG, Bellofiore S, Matera MG, Cazzola M, Di Maria GU: The protective role of epithelium-derived nitric oxide in isolated bovine trachea. *Pulm Pharmacol Ther* 2002; 15: 357-62
83. Figini M, Ricciardolo FL, Javdan P, Nijkamp FP, Emanuelli C, Pradelles P, Folkerts G, Geppetti P: Evidence that epithelium-derived relaxing factor released by bradykinin in the guinea pig trachea is nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 918-23
84. Naline E, Bertrand C, Biyah K, Fujitani Y, Okada T, Bisson A, Advenier C: Modulation of ET-1-induced contraction of human bronchi by airway epithelium-dependent nitric oxide release via ET(A) receptor activation. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 529-35
85. Matera MG, D'Agostino B, Cardone M, Calderaro V, Rossi F: Functional role of nitric oxide in guinea pig tracheal epithelium. *Life Sci* 1995; 56: PL231-5
86. Sadeghi-Hashjin G, Henricks PA, Folkerts G, Verheyen AK, van der Linde HJ, Nijkamp FP: Bovine tracheal responsiveness in vitro: role of the epithelium and nitric oxide. *Eur Respir J* 1996; 9: 2286-93
87. De Boer J, Pouw FM, Zaagsma J, Meurs H: Effects of endogenous superoxide anion and nitric oxide on cholinergic constriction of normal and hyperreactive guinea pig airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1784-9
88. Kakuyama M, Ahluwalia A, Rodrigo J, Vallance P: Cholinergic contraction is altered in nNOS knockouts. Cooperative modulation of neural bronchoconstriction by nNOS and COX. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 2072-8

89. Hatziefthimiou AA, Karetsi E, Pratzoudis E, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA: Resting tension effect on airway smooth muscle: the involvement of epithelium. *Respir Physiol Neurobiol* 2005; 145: 201-8
90. Feletou M, Lonchamp M, Coge F, Galizzi JP, Bassoullet C, Merial C, Robineau P, Boutin JA, Huang PL, Vanhoutte PM, Canet E: Regulation of murine airway responsiveness by endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L258-67
91. De Sanctis GT, MacLean JA, Hamada K, Mehta S, Scott JA, Jiao A, Yandava CN, Kobzik L, Wolyniec WW, Fabian AJ, Venugopal CS, Grasemann H, Huang PL, Drazen JM: Contribution of nitric oxide synthases 1, 2, and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. *J Exp Med* 1999; 189: 1621-30
92. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tiberio IF: Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 457-65
93. Brindicci C, Kharitonov SA, Ito M, Elliott MW, Hogg JC, Barnes PJ, Ito K: Nitric oxide synthase isoenzyme expression and activity in peripheral lung tissue of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*; 181: 21-30
94. Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q, Rothenberg ME: Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest* 2003; 111: 1863-74
95. Meurs H, Hamer MA, Pethe S, Vadon-Le Goff S, Boucher JL, Zaagsma J: Modulation of cholinergic airway reactivity and nitric oxide production by endogenous arginase activity. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1793-8
96. Meurs H, McKay S, Maarsingh H, Hamer MA, Macic L, Molendijk N, Zaagsma J: Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 391-8
97. Boucher JL, Custot J, Vadon S, Delaforge M, Lepoivre M, Tenu JP, Yapo A, Mansuy D: N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1614-21
98. Maarsingh H, Tio MA, Zaagsma J, Meurs H: Arginase attenuates inhibitory nonadrenergic noncholinergic nerve-induced nitric oxide generation and airway smooth muscle relaxation. *Respir Res* 2005; 6: 23
99. Hey C, Boucher JL, Vadon-Le Goff S, Ketterer G, Wessler I, Racke K: Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N omega-hydroxy-

D,L-Indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 395-400

100. Shearer JD, Richards JR, Mills CD, Caldwell MD: Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am J Physiol* 1997; 272: E181-90

101. Satriano J: Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids* 2004; 26: 321-9

102. Grasemann H, Gaston B, Fang K, Paul K, Ratjen F: Decreased levels of nitrosothiols in the lower airways of patients with cystic fibrosis and normal pulmonary function. *J Pediatr* 1999; 135: 770-2

103. Grasemann H, Schwartz R, Matthiesen S, Racke K, Ratjen F: Increased arginase activity in cystic fibrosis airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1523-8

104. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM, Jr., Gladwin MT: Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *Jama* 2005; 294: 81-90

105. Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FB, Farver C, Hazen SL, Jennings C, Dweik RA, Arroliga AC, Erzurum SC: Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *Faseb J* 2004; 18: 1746-8

106. Hoyt JC, Robbins RA, Habib M, Springall DR, Buttery LD, Polak JM, Barnes PJ: Cigarette smoke decreases inducible nitric oxide synthase in lung epithelial cells. *Exp Lung Res* 2003; 29: 17-28

107. Gebel S, Gerstmayer B, Kuhl P, Borlak J, Meurrens K, Muller T: The kinetics of transcriptomic changes induced by cigarette smoke in rat lungs reveals a specific program of defense, inflammation, and circadian clock gene expression. *Toxicol Sci* 2006; 93: 422-31

108. Wei LH, Jacobs AT, Morris SM, Jr., Ignarro LJ: IL-4 and IL-13 upregulate arginase I expression by cAMP and JAK/STAT6 pathways in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C248-56

109. Lindemann D, Racke K: Glucocorticoid inhibition of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) induced up-regulation of arginase in rat airway fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 368: 546-50

110. Kurosawa M, Shimizu Y, Tsukagoshi H, Ueki M: Elevated levels of peripheral-blood, naturally occurring aliphatic polyamines in bronchial asthmatic patients with active symptoms. *Allergy* 1992; 47: 638-43

111. Hobbs CA, Gilmour SK: High levels of intracellular polyamines promote histone acetyltransferase activity resulting in chromatin hyperacetylation. *J Cell Biochem* 2000; 77: 345-60
112. Iyer R, Jenkinson CP, Vockley JG, Kern RM, Grody WW, Cederbaum S: The human arginases and arginase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1998; 21 Suppl 1: 86-100
113. Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ: Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol* 2001; 166: 2173-7
114. Szabo C, Southan GJ, Wood E, Thiemermann C, Vane JR: Inhibition by spermine of the induction of nitric oxide synthase in J774.2 macrophages: requirement of a serum factor. *Br J Pharmacol* 1994; 112: 355-6
115. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J: Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; 338: 1173-4
116. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE: Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 1996; 334: 150-4
117. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE: Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88: 2149-55
118. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA: Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 5: 4
119. Feletou M, Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H985-1002
120. Davignon J, Ganz P: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: III27-32
121. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6
122. Lockette W, Otsuka Y, Carretero O: The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 1986; 8: II61-6
123. Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY, Large SR, Wells FC, Wallwork J: Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1539-47

124. Peinado VI, Barbera JA, Ramirez J, Gomez FP, Roca J, Jover L, Gimferrer JM, Rodriguez-Roisin R: Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am J Physiol* 1998; 274: L908-13
125. Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P, Chabrier PE: Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1991; 87: 155-62
126. Giaid A, Saleh D: Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333: 214-21
127. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Ohashi Y, Rikitake Y, Inoue N, Hirata KI, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M: Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension* 2001; 37: 322-7
128. Kageyama N, Miura M, Ichinose M, Tomaki M, Ishikawa J, Ohuchi Y, Endoh N, Shirato K: Role of endogenous nitric oxide in airway microvascular leakage induced by inflammatory mediators. *Eur Respir J* 1997; 10: 13-9
129. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256-76
130. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD: The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645-53
131. Gross NJ, Co E, Skorodin MS: Cholinergic bronchomotor tone in COPD. Estimates of its amount in comparison with that in normal subjects. *Chest* 1989; 96: 984-7
132. Barr RG, Mesia-Vela S, Austin JH, Basner RC, Keller BM, Reeves AP, Shimbo D, Stevenson L: Impaired flow-mediated dilation is associated with low pulmonary function and emphysema in ex-smokers: the Emphysema and Cancer Action Project (EMCAP) Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 1200-7
133. McAllister DA, Maclay JD, Mills NL, Mair G, Miller J, Anderson D, Newby DE, Murchison JT, Macnee W: Arterial stiffness is independently associated with emphysema severity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 1208-14
134. Mills NL, Miller JJ, Anand A, Robinson SD, Frazer GA, Anderson D, Breen L, Wilkinson IB, McEniery CM, Donaldson K, Newby DE, Macnee W: Increased arterial stiffness in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a mechanism for increased cardiovascular risk. *Thorax* 2008; 63: 306-11

135. Watson N, Magnussen H, Rabe KF: The relevance of resting tension to responsiveness and inherent tone of human bronchial smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 694-700
136. Watson N, Magnussen H, Rabe KF: Inherent tone of human bronchus: role of eicosanoids and the epithelium. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 1099-104
137. Vincenc KS, Black JL, Yan K, Armour CL, Donnelly PD, Woolcock AJ: Comparison of in vivo and in vitro responses to histamine in human airways. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 875-9
138. Armour CL, Black JL, Berend N, Woolcock AJ: The relationship between bronchial hyperresponsiveness to methacholine and airway smooth muscle structure and reactivity. *Respir Physiol* 1984; 58: 223-33
139. Xue C, Reynolds PR, Johns RA: Developmental expression of NOS isoforms in fetal rat lung: implications for transitional circulation and pulmonary angiogenesis. *Am J Physiol* 1996; 270: L88-100
140. Kawai N, Bloch DB, Filippov G, Rabkina D, Suen HC, Losty PD, Janssens SP, Zapol WM, de la Monte S, Bloch KD: Constitutive endothelial nitric oxide synthase gene expression is regulated during lung development. *Am J Physiol* 1995; 268: L589-95
141. Sherman TS, Chen Z, Yuhanna IS, Lau KS, Margraf LR, Shaul PW: Nitric oxide synthase isoform expression in the developing lung epithelium. *Am J Physiol* 1999; 276: L383-90
142. Coers W, Timens W, Kempinga C, Klok PA, Moshage H: Specificity of antibodies to nitric oxide synthase isoforms in human, guinea pig, rat, and mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1385-92
143. Parker TA, le Cras TD, Kinsella JP, Abman SH: Developmental changes in endothelial nitric oxide synthase expression and activity in ovine fetal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L202-8
144. Shaul PW, Afshar S, Gibson LL, Sherman TS, Kerecman JD, Grubb PH, Yoder BA, McCurnin DC: Developmental changes in nitric oxide synthase isoform expression and nitric oxide production in fetal baboon lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L1192-9
145. Palmer LA, Gaston B, Johns RA: Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 1197-203
146. Marshall HE, Stamler JS: Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 2001; 40: 1688-93

147. Nagaki M, Shimura MN, Irokawa T, Sasaki T, Shirato K: Nitric oxide regulation of glycoconjugate secretion from feline and human airways in vitro. *Respir Physiol* 1995; 102: 89-95
148. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Sisson JH: TNF-alpha and IL-1 beta upregulate nitric oxide-dependent ciliary motility in bovine airway epithelium. *Am J Physiol* 1995; 268: L911-7
149. Loukides S, Kharitonov S, Wodehouse T, Cole PJ, Barnes PJ: Effect of arginine on mucociliary function in primary ciliary dyskinesia. *Lancet* 1998; 352: 371-2
150. Duszyk M: Regulation of anion secretion by nitric oxide in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L450-7
151. Snyder AH, McPherson ME, Hunt JF, Johnson M, Stamler JS, Gaston B: Acute effects of aerosolized S-nitrosoglutathione in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 922-6
152. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S: Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 852-7
153. Tsoukias NM, George SC: A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol* 1998; 85: 653-66
154. George SC, Hogman M, Permutt S, Silkoff PE: Modeling pulmonary nitric oxide exchange. *J Appl Physiol* 2004; 96: 831-9
155. Mahut B, Louis B, Zerah-Lancner F, Delclaux C: Validity criteria and comparison of analytical methods of flow-independent exhaled NO parameters. *Respir Physiol Neurobiol* 2006; 153: 148-56
156. Mahut B, Delacourt C, Zerah-Lancner F, De Blic J, Harf A, Delclaux C: Increase in alveolar nitric oxide in the presence of symptoms in childhood asthma. *Chest* 2004; 125: 1012-8
157. De Sanctis GT, Mehta S, Kobzik L, Yandava C, Jiao A, Huang PL, Drazen JM: Contribution of type I NOS to expired gas NO and bronchial responsiveness in mice. *Am J Physiol* 1997; 273: L883-8
158. Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A, Silverman EK, Yandava CN, Israel E, Wand M, Drazen JM: Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with NOS1 genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2043-7
159. Nelin LD, Krenz GS, Chicoine LG, Dawson CA, Schapira RM: L-Arginine uptake and metabolism following in vivo silica exposure in rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 348-55

160. Gaston B, Ratjen F, Vaughan JW, Malhotra NR, Canady RG, Snyder AH, Hunt JF, Gaertig S, Goldberg JB: Nitrogen redox balance in the cystic fibrosis airway: effects of antipseudomonal therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 387-90
161. Hunt JF, Erwin E, Palmer L, Vaughan J, Malhotra N, Platts-Mills TA, Gaston B: Expression and activity of pH-regulatory glutaminase in the human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 101-7
162. Mahut B, Escudier E, de Blic J, Zerah-Lancner F, Coste A, Harf A, Delclaux C: Impairment of nitric oxide output of conducting airways in primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 158-63
163. Hansel TT, Kharitonov SA, Donnelly LE, Erin EM, Currie MG, Moore WM, Manning PT, Recker DP, Barnes PJ: A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *Faseb J* 2003; 17: 1298-300
164. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM: Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993; 342: 1510-3
165. Delclaux C, Mahut B, Zerah-Lancner F, Delacourt C, Laoud S, Cherqui D, Duvoux C, Mallat A, Harf A: Increased nitric oxide output from alveolar origin during liver cirrhosis versus bronchial source during asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 332-7
166. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ: Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998; 53: 91-5
167. Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A: Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *Faseb J* 1998; 12: 929-37
168. Massaro AF, Mehta S, Lilly CM, Kobzik L, Reilly JJ, Drazen JM: Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1510-4
169. Kharitonov SA, Wells AU, O'Connor BJ, Cole PJ, Hansell DM, Logan-Sinclair RB, Barnes PJ: Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1889-93
170. Henriksen AH, Sue-Chu M, Holmen TL, Langhammer A, Bjermer L: Exhaled and nasal NO levels in allergic rhinitis: relation to sensitization, pollen season and bronchial hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 1999; 13: 301-6
171. Silkoff PE, Caramori M, Tremblay L, McClean P, Chaparro C, Kesten S, Hutcheon M, Slutsky AS, Zamel N, Keshavjee S: Exhaled nitric oxide in human lung

transplantation. A noninvasive marker of acute rejection. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1822-8

172. Malerba M, Clini E, Cremona G, Radaeli A, Bianchi L, Corda L, Pini L, Ricciardolo F, Grassi V, Ambrosino N: Exhaled nitric oxide in patients with PiZZ phenotype-related alpha1-anti-trypsin deficiency. *Respir Med* 2001; 95: 520-5

173. Riley MS, Porszasz J, Miranda J, Engelen MP, Brundage B, Wasserman K: Exhaled nitric oxide during exercise in primary pulmonary hypertension and pulmonary fibrosis. *Chest* 1997; 111: 44-50

174. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 912-30

175. Ishibe Y, Liu R, Hirosawa J, Kawamura K, Yamasaki K, Saito N: Exhaled nitric oxide level decreases after cardiopulmonary bypass in adult patients. *Crit Care Med* 2000; 28: 3823-7

176. Tornberg DC, Bjerne H, Lundberg JO, Weitzberg E: Multiple single-breath measurements of nitric oxide in the intubated patient. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1210-5

177. Alexiou C, Tang AT, Sheppard SV, Haw MP, Gibbs R, Smith DC: A prospective randomized study to evaluate the effect of leukodepletion on the rate of alveolar production of exhaled nitric oxide during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 2139-45; discussion 2145

178. Beghetti M, Silkoff PE, Caramori M, Holtby HM, Slutsky AS, Adataia I: Decreased exhaled nitric oxide may be a marker of cardiopulmonary bypass-induced injury. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 532-4

179. Brett SJ, Quinlan GJ, Mitchell J, Pepper JR, Evans TW: Production of nitric oxide during surgery involving cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med* 1998; 26: 272-8

180. Cuthbertson BH, Stott SA, Webster NR: Exhaled nitric oxide as a marker of lung injury in coronary artery bypass surgery. *Br J Anaesth* 2002; 89: 247-50

181. Kovesi T, Royston D, Yacoub M, Marczin N: Basal and nitroglycerin-induced exhaled nitric oxide before and after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth* 2003; 90: 608-16

182. Kovesi T, Szabo A, Royston D, Marczin N: Correlation between pulmonary gas exchange and basal and nitroglycerin (GTN)-induced exhaled nitric oxide (eNO) in patients undergoing cardiac surgery. *Vascul Pharmacol* 2005; 43: 434-40

183. Sheppard SV, Gibbs RV, Smith DC: Does leucocyte depletion during cardiopulmonary bypass improve oxygenation indices in patients with mild lung dysfunction? *Br J Anaesth* 2004; 93: 789-92
184. Tornberg DC, Angdin M, Settergen G, Liska J, Lundberg JO, Weitzberg E: Exhaled nitric oxide before and after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass--response to acetylcholine and nitroglycerin. *Br J Anaesth* 2005; 94: 174-80
185. Brett SJ, Evans TW: Measurement of endogenous nitric oxide in the lungs of patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 993-7
186. Deja M, Busch T, Bachmann S, Riskowski K, Campean V, Wiedmann B, Schwabe M, Hell B, Pfeilschifter J, Falke KJ, Lewandowski K: Reduced nitric oxide in sinus epithelium of patients with radiologic maxillary sinusitis and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 281-6
187. Degano B, Genestal M, Serrano E, Rami J, Arnal JF: Effect of treatment on maxillary sinus and nasal nitric oxide concentrations in patients with nosocomial maxillary sinusitis. *Chest* 2005; 128: 1699-705
188. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 1992; 6: 3051-64
189. Bogdan C: Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2: 907-16
190. MacMicking J, Xie QW, Nathan C: Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 323-50
191. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A: The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173: 17-26
192. Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P, Padron J, Phillips RS: Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 980-4
193. Thuring H, Stenger S, Gmehling D, Rollinghoff M, Bogdan C: Lack of inducible nitric oxide synthase activity in T cell clones and T lymphocytes from naive and *Leishmania major*-infected mice. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3229-34
194. Bauer H, Jung T, Tsikas D, Stichtenoth DO, Frolich JC, Neumann C: Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1- and T-helper 2-associated cytokines in activated human T cells. *Immunology* 1997; 90: 205-11
195. Jimenez JL, Gonzalez-Nicolas J, Alvarez S, Fresno M, Munoz-Fernandez MA: Regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T lymphocytes by nitric oxide. *J Virol* 2001; 75: 4655-63

196. Reiling N, Kroncke R, Ulmer AJ, Gerdes J, Flad HD, Hauschildt S: Nitric oxide synthase: expression of the endothelial, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent isoform in human B and T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996; 26: 511-6
197. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E: Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 471-9
198. Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD: Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 1993; 261: 1445-8
199. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF: Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 5243-8
200. Murray HW, Nathan CF: Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med* 1999; 189: 741-6
201. Nathan C, Shiloh MU: Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8841-8
202. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS: Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *Faseb J* 2000; 14: 1889-900
203. Tak PP, Firestein GS: NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11
204. delaTorre A, Schroeder RA, Punzalan C, Kuo PC: Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages. *J Immunol* 1999; 162: 4101-8
205. Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, Tauras JM: Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem* 1996; 271: 19705-9
206. Lander HM, Ogiste JS, Teng KK, Novogrodsky A: p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem* 1995; 270: 21195-8
207. Spiecker M, Peng HB, Liao JK: Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of IkappaBalpha. *J Biol Chem* 1997; 272: 30969-74
208. Umansky V, Hehner SP, Dumont A, Hofmann TG, Schirmacher V, Droge W, Schmitz ML: Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2276-82

209. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, Tweardy DJ: Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* 1998; 187: 917-28
210. Zingarelli B, Hake PW, Yang Z, O'Connor M, Denenberg A, Wong HR: Absence of inducible nitric oxide synthase modulates early reperfusion-induced NF-kappaB and AP-1 activation and enhances myocardial damage. *Faseb J* 2002; 16: 327-42
211. Duhe RJ, Evans GA, Erwin RA, Kirken RA, Cox GW, Farrar WL: Nitric oxide and thiol redox regulation of Janus kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 126-31
212. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, Zanovello P, Segal DM: Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol* 2002; 168: 689-95
213. Hausladen A, Privalle CT, Keng T, DeAngelo J, Stamler JS: Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* 1996; 86: 719-29
214. Wheeler MA, Smith SD, Garcia-Cardena G, Nathan CF, Weiss RM, Sessa WC: Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest* 1997; 99: 110-6
215. Holm P, Kankaanranta H, Oja SS, Knowles RG, Moilanen E: No detectable NO synthesis from L-arginine or N(G)-hydroxy-L-arginine in fMLP-stimulated human blood neutrophils despite production of nitrite, nitrate, and citrulline from N(G)-hydroxy-L-arginine. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 127-34
216. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB: Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1992; 90: 1116-21
217. Moilanen E, Vuorinen P, Kankaanranta H, Metsa-Ketela T, Vapaatalo H: Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 852-8
218. Kosonen O, Kankaanranta H, Malo-Ranta U, Moilanen E: Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophil adhesion to endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1999; 382: 111-7
219. Johnston B, Kanwar S, Kubes P: Hydrogen peroxide induces leukocyte rolling: modulation by endogenous antioxidant mechanisms including NO. *Am J Physiol* 1996; 271: H614-21
220. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R: Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 1999; 276: H1943-50

221. Kosonen O, Kankaanranta H, Uotila J, Moilanen E: Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression in and neutrophil adhesion to human endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 2000; 394: 149-56
222. Lindemann S, Sharafi M, Spiecker M, Buerke M, Fisch A, Grosser T, Veit K, Gierer C, Ibe W, Meyer J, Darius H: NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. *Thromb Res* 2000; 97: 113-23
223. McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, Sharkey KA, Kubes P: Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. *Gut* 1999; 45: 864-73
224. McCafferty DM, Mudgett JS, Swain MG, Kubes P: Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology* 1997; 112: 1022-7
225. Zingarelli B, Cuzzocrea S, Szabo C, Salzman AL: Mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 1048-55
226. Kankuri E, Vaali K, Knowles RG, Lahde M, Korpela R, Vapaatalo H, Moilanen E: Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 1128-32
227. Stephan F, Yang K, Tankovic J, Soussy CJ, Dhonneur G, Duvaldestin P, Brochard L, Brun-Buisson C, Harf A, Delclaux C: Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002; 30: 315-22
228. Mekontso-Dessap A, Honore S, Kirsch M, Plonquet A, Fernandez E, Touqui L, Farcet JP, Soussy CJ, Loisanche D, Delclaux C: Blood neutrophil bactericidal activity against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* during cardiac surgery. *Shock* 2005; 24: 109-13
229. Attalah HL, Honore S, Eddahibi S, Marcos E, Soussy CJ, Adnot S, Delclaux C: Decreased exhaled nitric oxide as a marker of postinsult immune paralysis. *J Appl Physiol* 2004; 97: 1188-94
230. Singh D, Richards D, Knowles RG, Schwartz S, Woodcock A, Langley S, O'Connor BJ: Selective inducible nitric oxide synthase inhibition has no effect on allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 988-93
231. D'Angelo E, Koulouris NG, Della Valle P, Gentile G, Pecchiari M: The fall in exhaled nitric oxide with ventilation at low lung volumes in rabbits: an index of small airway injury. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 160: 215-23

232. D'Angelo E, Pecchiari M, Baraggia P, Saetta M, Balestro E, Milic-Emili J: Low-volume ventilation causes peripheral airway injury and increased airway resistance in normal rabbits. *J Appl Physiol* 2002; 92: 949-56
233. D'Angelo E, Pecchiari M, Della Valle P, Koutsoukou A, Milic-Emili J: Effects of mechanical ventilation at low lung volume on respiratory mechanics and nitric oxide exhalation in normal rabbits. *J Appl Physiol* 2005; 99: 433-44
234. Beale RJ, Bryg DJ, Bihari DJ: Immunonutrition in the critically ill: a systematic review of clinical outcome. *Crit Care Med* 1999; 27: 2799-805
235. Curis E, Crenn P, Cynober L: Citrulline and the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 620-6
236. De Bandt JP, Cynober L: Therapeutic use of branched-chain amino acids in burn, trauma, and sepsis. *J Nutr* 2006; 136: 308S-13S
237. Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U: Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *Jama* 2001; 286: 944-53
238. Heyland DK, Novak F: Immunonutrition in the critically ill patient: more harm than good? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001; 25: S51-5; discussion S55-6
239. Galban C, Montejo JC, Mesejo A, Marco P, Celaya S, Sanchez-Segura JM, Farre M, Bryg DJ: An immune-enhancing enteral diet reduces mortality rate and episodes of bacteremia in septic intensive care unit patients. *Crit Care Med* 2000; 28: 643-8
240. Radrizzani D, Bertolini G, Facchini R, Simini B, Bruzzone P, Zanforlin G, Tognoni G, Iapichino G: Early enteral immunonutrition vs. parenteral nutrition in critically ill patients without severe sepsis: a randomized clinical trial. *Intensive Care Med* 2006; 32: 1191-8
241. Bertolini G, Iapichino G, Radrizzani D, Facchini R, Simini B, Bruzzone P, Zanforlin G, Tognoni G: Early enteral immunonutrition in patients with severe sepsis: results of an interim analysis of a randomized multicentre clinical trial. *Intensive Care Med* 2003; 29: 834-40
242. Tepaske R, Velthuis H, Oudemans-van Straaten HM, Heisterkamp SH, van Deventer SJ, Ince C, Eysman L, Kesecioglu J: Effect of preoperative oral immune-enhancing nutritional supplement on patients at high risk of infection after cardiac surgery: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 358: 696-701

## Résumé

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule produite par l'ensemble des cellules des voies aériennes. Sa synthèse à partir de la L-arginine fait appel à un groupe d'enzymes : les NO synthases (NOS). Il existe trois isoformes de NOS exprimées par des cellules ayant des fonctions diverses conférant ainsi au NO produit une spécificité d'action dépendante de la cellule et de la « situation » ayant entraîné sa synthèse. Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse explorent des rôles différents (bronchoréactivité, immunitaires) du NO produit par les voies aériennes ainsi que la mesure du NO dans le contexte de l'anesthésie – réanimation. L'objectif du premier travail était de « revisiter » la fonction régulatrice du tonus bronchique dans le cadre d'une pathologie respiratoire, l'objectif du deuxième travail était méthodologique (étude des sources anatomiques du NO expiré chez le patient sous ventilation mécanique), et l'objectif du troisième travail était d'utiliser la mesure validée dans le deuxième travail pour évaluer les fonctions immunes du NO en réanimation.

*Premier travail.* La compétition entre les NO synthases et les arginases pour leur substrat commun, la L-arginine, pourrait être impliquée dans régulation de la réactivité et du remodelage bronchique chez le patient atteint de BPCO. Le but du premier travail était d'évaluer la relation entre expression de cette balance enzymatique, et les effets pharmacologiques de l'inhibition des NOS et des arginases sur la réactivité bronchique ex vivo à l'acétylcholine de patients sans et avec une BPCO peu sévère. Pour cela, nous avons étudié les bronches de 22 patients. Des études immunohistochimiques nous ont permis de mettre en évidence une expression bronchique NOS-2 plus importante chez les patients BPCO comparée aux patients non BPCO. De plus, les études pharmacologiques réalisées en cuve à organe ont permis de mettre en évidence une tension bronchique de base plus importante chez les BPCO, corrélée à l'expression de la NOS-2 et au degré d'obstruction bronchique (VEMS). L'utilisation d'inhibiteur des NOS diminuait cette tension de base. Nous avons démontré ainsi qu'une augmentation de l'expression NOS-2 chez le BPCO était impliquée dans l'augmentation du tonus bronchique de base et dans l'obstruction bronchique.

*Deuxième travail.* Les variations de NO expiré après chirurgie cardiaque avec circulation extracorporelle (CEC) demeurent controversées. Le but de ce deuxième travail était de déterminer quelle source de NO expiré (bronchique ou alvéolaire) était modifiée après CEC, et d'étudier les effets de la ventilation mécanique pendant la CEC sur ces variations. Nous avons étudié ainsi 32 patients ventilés ou non durant une chirurgie cardiaque avec CEC. Nous avons observé une diminution significative du NO expiré d'origine bronchique après la CEC. Cette diminution n'était pas observée lors du maintien durant la CEC d'une ventilation avec pression expiratoire positive (PEEP). Ce travail permettait de conclure que la diminution du NO bronchique après la CEC pouvait être liée à une occlusion des petites voies aériennes. Cette atteinte de petites voies aériennes était prévenue par la PEEP.

*Troisième travail.* Enfin, dans ce troisième travail, nous avons émis l'hypothèse que la mesure du NO produit par les voies aériennes (NO expiré et nasal) pouvait constituer un marqueur prédictif de survenue d'infection nosocomiale (fonctions immunitaires du NO). Dans une étude observationnelle chez 45 patients de réanimation ventilés (15 patients ont développé une infection nosocomiale), le NO nasal était le seul marqueur significativement plus bas chez les patients développant une infection nosocomiale (le NO expiré, les dosages d'IL6 et d'IL10 ainsi que le score SOFA n'étaient pas différents entre les deux groupes). Un NO nasal inférieur à 148 ppb 72 heures après l'admission du patient, permettait de prédire la survenue d'une infection nosocomiale avec une sensibilité et une spécificité de 80% et de 70% respectivement et un odds ratio de 2.7. Le développement de ce bio marqueur simple à mesurer permettrait de mettre en place des stratégies préventives (immunonutrition avec de la L-arginine).