



HAL
open science

Rôle du Monoxyde d'Azote (NO) et des NO synthases dans la physiopathologie de la BPCO et de ses complications cardiovasculaires

Laurent Boyer

► **To cite this version:**

Laurent Boyer. Rôle du Monoxyde d'Azote (NO) et des NO synthases dans la physiopathologie de la BPCO et de ses complications cardiovasculaires. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT : 2011PEST0081 . tel-00733086

HAL Id: tel-00733086

<https://theses.hal.science/tel-00733086>

Submitted on 17 Sep 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.

Académie de Créteil
Université Paris-Est Créteil

Thèse de doctorat
Science de la Vie et de la Santé

Présentée par :

Laurent Boyer

Rôle du Monoxyde d'Azote (NO) et des NO Synthases
dans la Physiopathologie de la BPCO et de ses
complications cardiovasculaires

Thèse dirigée par le Dr Jorge Boczkowski

Soutenue le 18 juillet 2011

Rapporteurs : Pr. Carole Planès
Pr. Roger Marthan
Examineurs : Pr Christos Chouaid
Pr Serge Adnot
Dr Jorge Boczkowski

Cette Thèse est dédiée à tous ceux qui m'ont aidé
à la réaliser

Remerciements

Au Dr Jorge Boczkowski, qui m'a ouvert les portes du laboratoire et guidé pendant toutes ces années de thèse. Que ce travail soit l'expression de mon profond respect.

Au Pr Serge Adnot, sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Je vous remercie vraiment pour la confiance que vous m'avez faite.

Aux Professeurs Carole Planès, Roger Marthan et Christos Chouaid, qui ont accepté de participer au jury de cette thèse en tant que rapporteurs ou examinateurs. Que vous soyez remerciés pour votre disponibilité.

Au Dr Laurent Plantier, soutien sans faille tout au long de la première étude. Avec toute mon amitié.

Au Dr Sophie Lanone, pour ton aide avisée, ton soutien bienveillant.

A Philippe Caramelle, compagnon de manip, merci à toi.

Au Dr Sabine Le Gouvello, et à son équipe,

A tous les membres des unités INSERM U700, puis U955, équipe 04. Sans oublier personne je l'espère, Joëlle Marchal, Delphine Goven, Mathieu Desmard, Marielle Maret, Lucie Armand, Olivia Freynet, Sophie Phin, Gilles Dourneau, Séverine Létuvé, Lyes Tabet, Béatrice Audibert, Pascal Andujar, Esther Belade, Stephane Kerbrat, Sandra Chrusciel, Guillaume Lezmi, Anahita Rouze, Elise Guivarch, Maylis Dagouassat, Angélique Simon, Indou Baskara, Marie-Claude Bourin, Jean-Marie Gagliolo, Marie-Laure Montoya, Mirlande Prémumé. Aux membres de l'équipe 08, Dominique Rideau, Elisabeth Marcos, Guillaume Gary-Bobo...

Aux Dr Ala Noroc, Françoise Zerah, Xavier Drouot, Barnabas Gellen, Pierre-François Lesault, Mourad Sarni, Gabriel Pelle, ainsi qu'aux autres membres du service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles de l'hôpital Henri Mondor.

Au Dr Valérie Paul-Boncour, pour ses encouragements constants, ainsi qu'aux Dr Denis Leiber et Pierre Corre.

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| 1. Introduction..... | 7 |
| 2. Première partie : BPCO et Emphysème pulmonaire, données générales | 9 |
| 2.1. Définition et évolution..... | 9 |
| 2.2. Etiologie..... | 10 |
| 2.2.1. Facteurs exogènes..... | 10 |
| 2.2.1.1. Fumée de cigarette..... | 10 |
| 2.2.1.2. Autres facteurs | 11 |
| 2.2.2. Facteurs endogènes..... | 12 |
| 2.2.2.1. Pathologies génétiques directement associées à l'emphysème : déficit en alpha-1-antitrypsine | 12 |
| 2.2.2.2. Polymorphismes génétiques associés au développement de l'emphysème chez les fumeurs..... | 13 |
| 2.2.2.3. Polymorphismes associés à la BPCO..... | 13 |
| 2.3. Mécanismes physiopathologiques de l'atteinte respiratoire : implication de la production excessive de radicaux libres de l'oxygène..... | 14 |
| 2.3.1. Déséquilibre de la balance protéase / antiprotéase | 14 |
| 2.3.2. Inflammation | 15 |
| 2.3.3. Apoptose..... | 15 |
| 2.3.4. Sénescence cellulaire et vieillissement accéléré | 15 |
| 2.3.5. Excès de radicaux libres de l'oxygène d'origine endogène..... | 17 |
| 2.3.5.1. Sources cellulaires d'anion superoxide au niveau pulmonaire | 17 |
| 2.3.5.2. Sources d'anion superoxide dans la cellule | 17 |
| 2.3.5.3. Expression des systèmes antioxydants dans l'emphysème : données contradictoires | 19 |
| 2.3.5.4. Participation des radicaux libres de l'oxygène (ROS) au développement de l'emphysème..... | 19 |
| 2.3.5.4.1. ROS et induction de l'inflammation | 20 |
| 2.3.5.4.2. ROS et dégradation de la matrice extracellulaire | 20 |
| 2.3.5.4.3. ROS et acides nucléiques | 21 |
| 3. Deuxième partie : complications cardio-vasculaires et polyglobulie au cours de la BPCO : mécanismes physiopathologiques et interactions..... | 23 |
| 3.1. Complications cardiovasculaires au cours de la BPCO..... | 23 |
| 3.1.1. Mortalité et morbidité cardiovasculaire au cours de la BPCO | 23 |
| 3.1.2. Physiopathologie de l'athérosclérose | 25 |
| 3.1.3. Inflammation systémique et risque cardiovasculaire au cours de la BPCO..... | 25 |
| 3.1.4. Stress oxydant systémique et maladies cardiovasculaires au cours de la BPCO..... | 27 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.1.5. | Hypercoagulabilité au cours de la BPCO..... | 27 |
| 3.1.6. | Rôle de l'hypoxie | 28 |
| 3.1.7. | Effet de la BPCO sur le système sympathique et risque cardiovasculaire | 29 |
| 3.1.8. | Dégradation du tissu conjonctif | 29 |
| 3.1.9. | Circulation bronchique, le lien manquant ?..... | 30 |
| 3.1.10. | Vieillesse accélérée, athérosclérose et BPCO | 31 |
| 3.2. | Polyglobulie | 32 |
| 3.2.1. | Mécanismes..... | 32 |
| 3.2.2. | Bénéfice discuté au cours de la BPCO..... | 33 |
| 3.2.2.1. | Polyglobulie et performances à l'effort..... | 33 |
| 3.2.2.2. | Polyglobulie et maladies cardiovasculaires..... | 33 |
| 3.2.2.3. | Polyglobulie et circulation pulmonaire..... | 34 |
| 3.2.2.4. | Polyglobulie et pronostic au cours de la BPCO..... | 35 |
| 4. | Troisième partie : NO et NO Synthases | 36 |
| 4.1. | Synthèse et libération du monoxyde d'azote : les NO synthases (NOS) | 36 |
| 4.1.1. | Localisation | 37 |
| 4.1.1.1. | nNOS ou NOS1 | 37 |
| 4.1.1.2. | iNOS ou NOS2 | 38 |
| 4.1.1.3. | eNOS ou NOS3 | 38 |
| 4.1.2. | Structure | 39 |
| 4.1.2.1. | Domaine réductase | 39 |
| 4.1.2.2. | Domaine oxygénase..... | 40 |
| 4.1.2.3. | Dépendance face au calcium..... | 40 |
| 4.1.3. | Régulation de l'expression et de l'activité des NOS..... | 40 |
| 4.2. | Effets vasculaires du NO : contrôle du tonus vasculaire et fonction endothéliale.... | 42 |
| 4.2.1. | Mécanotransduction des forces de cisaillement | 42 |
| 4.2.2. | Rôle du NO dans le contrôle du tonus vasculaire | 43 |
| 4.2.3. | Autres facteurs vasodilatateurs dérivés de l'endothélium | 44 |
| 4.2.4. | Sources non endothéliales de NO au niveau vasculaire, implication de l'hémoglobine | 44 |
| 4.2.5. | Définition de la dysfonction endothéliale et implication dans les pathologies cardiovasculaires..... | 45 |
| 4.2.6. | Evaluation clinique de la dysfonction endothéliale..... | 45 |
| 4.2.6.1. | Utilisation d'un outil pharmacologique..... | 45 |
| 4.2.6.2. | Utilisation d'un stimulus physiologique : la dilatation flux induite (FMD) . | 46 |
| 4.3. | NO et physiologie du système respiratoire | 47 |
| 4.3.1. | NO et développement pulmonaire | 47 |
| 4.3.2. | NO et iNANC..... | 48 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.3.3. | NO et Relaxation du muscle lisse bronchique | 48 |
| 4.3.4. | NO et circulation pulmonaire | 48 |
| 4.3.5. | NO et sécrétion de mucus | 49 |
| 4.4. | Effets physiopathologiques du NO : rôle du peroxy-nitrite. | 49 |
| 4.4.1. | Définitions | 49 |
| 4.4.2. | Toxicité du NO | 50 |
| 4.4.2.1. | Mécanisme de la cytotoxicité du NO : le peroxy-nitrite | 50 |
| 4.4.2.2. | Conséquences de la nitration des protéines | 52 |
| 4.5. | Rôle du NO au cours de la BPCO | 53 |
| 4.5.1. | Rôle du NO et des NOS dans l'atteinte pulmonaire de la BPCO | 53 |
| 4.5.1.1. | NO exhalé | 53 |
| 4.5.1.2. | Peroxy-nitrites et nitrosylation des protéines chez l'homme | 53 |
| 4.5.1.3. | Expression et localisation spécifiques des NOS dans le poumon des patients emphysemateux | 54 |
| 4.5.1.4. | Apport des modèles animaux | 54 |
| 4.5.2. | Rôle du NO et des NOS au niveau vasculaire au cours de la BPCO..... | 55 |
| 4.5.2.1. | BPCO et FMD..... | 55 |
| 4.5.2.2. | BPCO et Plethysmographie d'occlusion veineuse | 55 |
| 4.5.2.1. | Une rigidité artérielle accrue | 55 |
| 4.5.2.2. | Apport des modèles expérimentaux..... | 56 |
| 5. | Hypothèses et objectifs..... | 57 |
| 5.1. | Etude 1, <i>in vivo</i> | 57 |
| 5.2. | Etude 2, clinique | 57 |
| 6. | Résultats | 59 |
| 6.1. | Rôle des NO synthases au cours de l'emphysème induit par l'élastase | 59 |
| 6.2. | Effet de la polyglobulie sur la fonction endothéliale systémique au cours des maladies chroniques hypoxiques..... | 65 |
| 7. | Discussion | 67 |
| 8. | Annexes | 73 |
| 8.1. | Annexe 1 : photographie des techniques d'évaluation de la fonction endothéliale.. | 73 |

1. Introduction

La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une maladie respiratoire en constante progression dans les pays développés le plus souvent secondaire à une intoxication tabagique (1) (2). L'emphysème représente la composante alvéolaire de la BPCO. On estime actuellement à 3,5 millions le nombre de français atteints de BPCO (3). L'évolution progressive de la maladie se fait vers l'aggravation progressive de l'obstruction bronchique responsable à terme d'une insuffisance respiratoire chronique conduisant à un handicap sévère et au décès. Cependant, l'importante morbi-mortalité de la BPCO est liée, outre à l'atteinte respiratoire, à de multiples anomalies systémiques indépendantes de la sévérité de l'obstruction bronchique, notamment cardiovasculaires (1, 4).

Si l'exposition tabagique constitue le principal facteur à l'origine de la maladie, seuls 30% des fumeurs vont développer une BPCO. Plusieurs mécanismes ont pu être mis en évidence, mais la physiopathologie de cette maladie reste incomplètement expliquée. Le rôle des radicaux libres de l'oxygène dans le processus de destruction du mur alvéolaire, qu'ils soient d'origine exogène avec la fumée de cigarette, ou endogène, est aujourd'hui bien documenté, conduisant au concept de stress oxydatif. Parallèlement, un rôle des espèces réactives de l'azote a été évoqué, en particulier le monoxyde d'azote (NO) produit par les NO synthases (NOS). La mise en évidence d'une augmentation du NO expiré chez les patients présentant une BPCO et d'une expression accrue de certaines NOS dans le poumon emphysémateux, suggèrent un rôle du NO et des NOS dans le développement de l'emphysème (5, 6). Cependant, la relation entre ces phénomènes et le développement de l'emphysème n'est pas établie ; il n'est pas déterminé si la nitration des protéines observée dans le poumon constitue un simple épiphénomène ou si elle participe directement au développement des lésions d'emphysème. La première partie de ce travail de thèse a donc consisté à étudier dans un modèle murin d'emphysème secondaire à une instillation d'élastase, l'expression et le rôle des NOS, du NO et de la nitration des protéines dans la genèse des lésions alvéolaires de l'emphysème. Les implications thérapeutiques de ce travail sont réelles en raison de la disponibilité d'inhibiteurs pharmacologiques des NOS utilisables chez l'homme (7).

La BPCO est aujourd'hui considérée comme un facteur de risque majeur pour l'athérosclérose et les complications cardiovasculaires, indépendamment du tabagisme. Un tiers des patients atteints de cette maladie décèdent d'une pathologie cardiovasculaire (8). Une dysfonction endothéliale précoce liée à une diminution de la disponibilité en NO au niveau vasculaire a été observée chez ces patients, avant même la survenue des complications cardiovasculaires (9-12). Cependant, l'origine de la dysfonction endothéliale et de ses complications cardiovasculaires n'est pas complètement expliquée ; leur incidence n'est pas corrélée à la

sévérité de l'obstruction bronchique et elles ne semblent concerner que certains patients, qui ont le plus souvent une altération de la fonction respiratoire modérée, un BMI plus élevé, un diabète et une inflammation systémique accrue (13). La polyglobulie survient au cours de la BPCO afin de maintenir un apport suffisant d'oxygène aux tissus malgré l'altération des échanges gazeux. L'hématocrite est modérément élevé chez environ 20% de ces patients (14). Induisant une augmentation de la viscosité sanguine et des forces de cisaillement, la polyglobulie pourrait moduler la fonction endothéliale des patients BPCO. En effet, les forces de cisaillement sont le déterminant principal de la libération de NO par l'endothélium et elles jouent un rôle majeur dans le contrôle du tonus vasculaire. La deuxième partie de ce travail de thèse a donc consisté à déterminer si la polyglobulie secondaire *per se* pouvait induire une dysfonction endothéliale chez les patients présentant une BPCO hypoxémique. Comprendre l'effet de la polyglobulie sur la fonction endothéliale est crucial pour ces patients en raison de l'augmentation de la morbidité et de la mortalité associées aux complications cardiovasculaires. Connaître la relation entre la polyglobulie et la fonction endothéliale est d'autant plus important que le recours à des traitements visant à augmenter l'apport tissulaire en oxygène des patients BPCO en augmentant leur niveau d'hématocrite est aujourd'hui en discussion afin d'améliorer leurs performances à l'effort.

La première partie de cette introduction sera consacrée à la description de la BPCO et de l'emphysème. Elle décrira les mécanismes physiopathologiques de la maladie pulmonaire. La deuxième partie concernera les mécanismes à l'origine des comorbidités et des effets systémiques de la BPCO, en particulier de la polyglobulie et des complications cardiovasculaires. La troisième partie décrira les différents NOS, le mode d'action du NO et les données actuelles de la littérature sur son implication dans la physiopathologie de la BPCO et de ses complications systémiques.

2. Première partie : BPCO et Emphysème pulmonaire, données générales

2.1. Définition et évolution

La BPCO est définie par une diminution incomplètement réversible des débits aériens qui est d'installation lentement progressive, et associée à une réponse inflammatoire anormale en réponse à l'inhalation de substances nocives (15). L'emphysème représente la composante alvéolaire de la BPCO; il est défini histologiquement par la distension permanente des espaces aériens distaux du poumon en rapport avec une destruction des cloisons alvéolaires au-delà des bronchioles terminales. L'absence de lésions significatives de fibrose pulmonaire est nécessaire pour parler d'emphysème.

L'évolution naturelle de la BPCO et de l'emphysème se fait vers l'aggravation progressive des lésions, aboutissant à la réduction progressive de la surface d'échange alvéolo-capillaire et au développement d'une insuffisance respiratoire chronique conduisant à un handicap sévère et au décès dans un grand nombre de cas. En France, la mortalité directement attribuable à la BPCO est estimée à 7352 décès /an, cette valeur correspondant vraisemblablement à une sous-évaluation.

A ce jour, l'emphysème pulmonaire est une maladie incurable dont la prise en charge est pour l'essentiel palliative. Les seules interventions susceptibles de prolonger la survie des patients qui en sont atteints sont l'arrêt du tabagisme, qui obtient par ailleurs un ralentissement du déclin de la fonction respiratoire, ainsi que l'oxygénothérapie de longue durée en cas d'hypoxémie. Les bronchodilatateurs et les corticoïdes inhalés donnent des résultats certes significatifs mais essentiellement limités au contrôle des symptômes (8) (16) (17). Les interventions de réduction de volume pulmonaire, classiquement chirurgicales (18) et depuis peu menées par voie endoscopique (19) peuvent avoir un grand intérêt chez des patients très sélectionnés, mais ces interventions ne corrigent pas la pathologie sous-jacente dont l'évolution se poursuit. Enfin, si le bénéfice de la transplantation pulmonaire en termes d'amélioration de la qualité de vie est reconnu dans cette indication, son bénéfice en termes de survie, s'il existe, reste modeste (20). Aucune mesure thérapeutique ne possède d'effet curatif pour cette pathologie. Un effort de recherche visant à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques paraît nécessaire compte tenu du poids majeur de l'emphysème pulmonaire en termes de santé publique.

2.2. Etiologie

La principale cause de la BPCO est l'exposition à la fumée de tabac, cependant seuls 15 à 20 % des fumeurs vont développer une BPCO. D'autres facteurs de risque environnementaux de cette maladie ont été reconnus : la fraction de BPCO attribuable au tabac varie de 10 à 98 % selon les études et les populations, mais est à moins de 80% dans la plupart des études, indiquant un rôle important des facteurs non tabagiques dans la survenue de la maladie (21).

2.2.1. Facteurs exogènes

2.2.1.1. Fumée de cigarette

La grande majorité des cas d'emphysème pulmonaire est liée à la consommation active de tabac sous la forme de cigarettes dont la fumée est inhalée. La fumée de cigarette, composée d'une phase gazeuse et d'une phase goudron, contient de nombreuses substances toxiques dont une liste sommaire est donnée dans le tableau 1. Parmi les composés contenus dans la fumée de cigarette, de nombreuses espèces radicalaires, en particulier des radicaux libres de l'oxygène et du monoxyde d'azote, semblent jouer un rôle de premier plan dans la physiopathologie de la BPCO en général et de l'emphysème en particulier. D'autres composés tels que le cadmium ont été également impliqués dans la pathogénie de la BPCO. Enfin, la nicotine par elle-même semble également capable d'interférer avec le développement pulmonaire puisque l'exposition de rats femelles à ce produit durant la gestation puis la lactation aboutit au développement de lésions similaires à un emphysème pulmonaire chez les ratons (22).

Le développement de lésions d'emphysème pulmonaire suite à une exposition prolongée à un toxique inhalé donné semble relativement spécifique de la fumée de cigarette. En effet, alors que l'exposition aux fumées dégagées par la combustion de végétaux sur un foyer ouvert (24) a été associée au développement de symptômes respiratoires et au développement d'un trouble ventilatoire obstructif, des lésions d'emphysème n'ont pas été rapportées chez les patients en question. L'exposition prolongée à des poussières organiques peut entraîner l'association d'un trouble ventilatoire obstructif et d'une diminution de la capacité de transfert du CO mais l'existence de lésions d'emphysème, dont la définition est morphologique, n'a pas été décrite au cours de ces formes de BPCO (25), de même que chez les patients exposés aux particules issues des moteurs diesel (26).

Tableau 1 : Principales classes de composants de la fumée de cigarette et nombre de composants identifiés, tiré de Thielen et al. (23)

| Class | No. |
|-------------------------|------|
| Amides, imides, lactams | 237 |
| Carboxylic acids | 227 |
| Lactones | 150 |
| Esters | 474 |
| Aldehydes | 108 |
| Ketones | 521 |
| Alcohols | 379 |
| Phenols | 282 |
| Amines | 196 |
| <i>N</i> -Heterocycles | 921 |
| Hydrocarbons | 705 |
| Nitriles | 106 |
| Anhydrides | 11 |
| Carbohydrates | 42 |
| Ethers | 311 |
| Inorganics | 50 |
| Total | 4720 |

2.2.1.2. Autres facteurs

D'autres facteurs ont pu être associés au développement de lésions d'emphysème comme l'exposition à des particules métalliques (27, 28), certains types de toxicomanie intraveineuse (29), le mécanisme de constitution des lésions n'étant pas connu.

L'infection par le VIH par elle-même semble pouvoir entraîner le développement d'un emphysème pulmonaire chez les non-fumeurs (30) et augmente considérablement le risque de développer un emphysème chez les fumeurs (31). Le mécanisme de constitution des lésions dans ce cas n'est pas connu précisément mais la constatation d'un nombre élevé de lymphocytes T8 cytotoxiques dans le LBA des sujets infectés par le VIH par rapport à des sujets indemnes de cette infection a soulevé l'hypothèse d'un rôle de ces cellules dans la pathogénie de l'emphysème (32).

La malnutrition sévère et prolongée peut être responsable du développement de lésions d'emphysème pulmonaire, comme cela avait pu être observé par les médecins du ghetto de Varsovie lors de la deuxième guerre mondiale. Plus récemment, le développement de lésions d'emphysème débutantes a été rapporté chez des patients atteints d'anorexie mentale. Dans ce dernier cas, l'emphysème était diagnostiqué par le scanner en l'absence d'altération des volumes et débits pulmonaires ainsi que de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (33).

Le développement de lésions d'emphysème suite à une malnutrition a été reproduit chez l'animal, indiquant une relation de cause à effet entre ces deux phénomènes (34).

2.2.2. Facteurs endogènes

Le développement d'un emphysème pulmonaire ne survient pas chez l'ensemble des fumeurs et n'est pas observé selon une relation dose-effet linéaire (35), ce qui indique l'intervention de facteurs endogènes dans le cours de cette maladie. Notamment, les cas de BPCO les plus précoces et les plus sévères semblent adopter une répartition familiale (36).

2.2.2.1. Pathologies génétiques directement associées à l'emphysème : déficit en alpha-1-antitrypsine

Le principal facteur endogène associé à la survenue d'un emphysème pulmonaire est la présence de mutations de l' α -1-antitrypsine rassemblées dans le cadre nosologique nommé déficit en alpha-1-antitrypsine. Historiquement, la constatation d'une grande fréquence de l'emphysème pulmonaire chez les patients porteurs de ces mutations a conduit à la formulation des premières hypothèses physiopathologiques concernant cette maladie. Le déficit en α -1-antitrypsine est une maladie relativement rare quoique sous-diagnostiquée, rendant compte de 2 à 3% des cas d'emphysème aux Etats-Unis (37). L' α -1-antitrypsine est un inhibiteur des sérines protéases et est le principal inhibiteur endogène de l'élastase du polynucléaire neutrophile. Les hépatocytes sont le principal lieu de synthèse de l' α -1-antitrypsine, qu'ils relarguent dans la circulation. Les pneumocytes de type 2 participent cependant aussi à sa synthèse in situ dans le poumon (38).

Dans la grande majorité des cas, à l'exception des rares individus porteurs d'une délétion de ce gène, la présence de la mutation entraîne un défaut d'arrangement de la structure tertiaire de la molécule et une séquestration de celle-ci dans le réticulum endoplasmique des cellules la produisant, ce qui a été décrit au niveau des hépatocytes. La séquestration de l' α -1-antitrypsine dans le cytoplasme des hépatocytes aboutit à une baisse majeure de l'activité anti-élastasique du sérum, ainsi que dans le poumon. Un rôle majeur dans la constitution de l'emphysème est attribué au déséquilibre élastase/anti-élastase en résultant (39).

S'il est largement admis, ce dernier point peut cependant être remis en cause. Ainsi, le traitement substitutif par l' α -1-antitrypsine recombinante, qui corrige intégralement le déséquilibre de la balance élastase/anti-élastase dans la circulation, n'a jamais fait la preuve formelle de son efficacité pour le traitement de l'emphysème lié au déficit en α -1-antitrypsine (40). Par ailleurs, l'accumulation d' α -1-antitrypsine mutée dans le cytoplasme peut par elle-même entraîner une cytotoxicité, celle-ci représentant le principal mécanisme de l'atteinte hépatique associée aux mutations de l' α -1-antitrypsine. L' α -1-antitrypsine étant également

produite par les pneumocytes de type 2, la cytotoxicité entraînée par l'accumulation d' α -1-antitrypsine mutée dans le cytoplasme de ces cellules pourrait également contribuer à l'atteinte pulmonaire de cette maladie.

2.2.2.2. Polymorphismes génétiques associés au développement de l'emphysème chez les fumeurs

Un certain nombre de polymorphismes génétiques potentialisant l'agression environnementale ont été associés au développement de l'emphysème chez les sujets fumeurs. Sur le plan clinique, ces associations se traduisent par le fait que seule une minorité de fumeurs, de l'ordre de 25 à 30 % d'entre eux, développe un emphysème (41).

2.2.2.3. Polymorphismes associés à la BPCO

De nombreux polymorphismes ont été associés chez les sujets fumeurs au développement d'une BPCO définie par un déclin accéléré de la fonction respiratoire. Les gènes identifiés incluent des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire tels que l'interleukine 10 (IL10), l'interleukine 13 (IL13), le toll-like receptor 4 (TLR4), le TGF-beta ; le TIMP-2, une antiprotéase, ainsi que plusieurs protéases dont les métalloprotéases matricielles (MMP) 1 et 12 et la SERPINE2 aussi nommée Plasminogen Activator Inhibitor-1 ; des enzymes impliqués dans la défense anti-oxydante et la détoxification des xénobiotiques comme la Glutathion S Transférase et l'époxide hydrolase microsomale (mEPHX) ; des protéines impliquées dans le contrôle de la survie cellulaire et de l'apoptose comme p53, p21, Bcl2 (41).

De plus, certains polymorphismes ont été associés non seulement au développement d'un trouble ventilatoire obstructif irréversible mais aussi à celui de lésions anatomiques caractéristiques d'un emphysème pulmonaire, ces lésions ayant été appréciées de façon non invasive par le scanner dans la plupart des études. Des polymorphismes responsables d'une augmentation de l'expression du TNF-alpha, une cytokine pro-inflammatoire, et de la MMP-9, une enzyme protéolytique, ont été associés au développement de l'emphysème chez les sujets fumeurs, ainsi que des polymorphismes responsables d'une perte de fonction de l'hème-oxygénase-1, une puissante enzyme anti-oxydante, et de l'époxide hydrolase microsomale (41).

2.3. Mécanismes physiopathologiques de l'atteinte respiratoire : implication de la production excessive de radicaux libres de l'oxygène

La physiopathologie de l'emphysème est incomplètement expliquée. Plusieurs mécanismes ont cependant été identifiés tel qu'un déséquilibre de la balance protéase/antiprotéase, la présence d'une réaction inflammatoire chronique ou pour certains auteurs une apoptose accrue des cellules alvéolaires. Mais surtout, une production excessive de radicaux libres de l'oxygène joue un rôle particulièrement important au cours de cette maladie. Le rôle causal de certains de ces phénomènes dans le développement de l'emphysème a pu être mis en évidence dans des modèles animaux.

2.3.1. Déséquilibre de la balance protéase / antiprotéase

Le déséquilibre de la balance protéase / antiprotéase est responsable d'une dégradation excessive des protéines de la matrice extra-cellulaire, en particulier de l'élastine.

Les protéases impliquées dans l'emphysème sont essentiellement des sérines protéases telles que l'élastase du polynucléaire neutrophile et des métalloprotéases de la matrice (MMP). Dans le poumon emphysémateux humain, l'élastase du neutrophile est co-localisée avec les lésions d'emphysème (42). Les MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-12 et MMP-14 ont été retrouvées à un taux plus élevé dans l'expectoration ou le LBA des sujets emphysémateux.

Les modèles animaux ont souligné le rôle causal d'un excès de ces protéases dans la survenue de l'emphysème. L'instillation d'élastase dans la trachée est un modèle classique d'emphysème expérimental (43). L'inactivation du gène codant pour l'élastase du polynucléaire neutrophile chez la souris diminue de 59 % l'emphysème induit par la fumée de cigarette (44) alors que l'inactivation du gène codant pour MMP-12 les protège complètement (45). Chez le cobaye, un inhibiteur commun à MMP-9 et MMP-12 diminue de 68 % les lésions d'emphysème induites par la fumée de cigarette (46). A l'inverse, La surexpression de MMP-9 induit spontanément un emphysème chez la souris, associé à une dégradation accrue de l'élastine (47).

Ce déséquilibre de la balance protéase / antiprotéase est aggravé dans l'emphysème par la diminution de l'expression et de l'activité des principales anti protéases. Ces anti protéases sont essentiellement les serpins, dont l'alpha 1-antitrypsine est le principal représentant, et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP). La fonction majeure de l'alpha-1-antitrypsine est de protéger les tissus et notamment le poumon contre les effets de l'élastase du polynucléaire neutrophile. Le déficit en alpha-1-antitrypsine induit un emphysème chez certains

patients et la supplémentation en alpha-1-antitrypsine humaine diminue de 63 % l'emphysème induit par la fumée de cigarette chez la souris (48).

2.3.2. Inflammation

Un infiltrat inflammatoire des parois alvéolaires composé de polynucléaires neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes T activés est présent dans le poumon emphysémateux (49). L'intensité de la réaction inflammatoire pulmonaire est corrélée à la destruction du mur alvéolaire (50).

Les souris surexprimant dans le poumon l'interféron-gamma ou l'interleukine-13, des cytokines pro-inflammatoires, développent spontanément un emphysème pulmonaire (51, 52), ce qui suggère une relation de cause à effet entre l'inflammation chronique et la survenue de l'emphysème.

2.3.3. Apoptose

Plus récemment, certains auteurs ont avancé le rôle d'une apoptose accrue des cellules structurales de l'alvéole dans la survenue de l'emphysème. Des cellules alvéolaires apoptotiques ont été mises en évidence dans le poumon des sujets emphysémateux (53, 54). Beaucoup d'arguments sont en faveur d'une implication directe de l'apoptose dans le développement de l'emphysème et l'apoptose des cellules endothéliales peut induire per se une destruction des espaces aériens chez la souris (55, 56). Plus directement, l'instillation trachéale de caspase 3 activée, un effecteur puissant de l'apoptose, est suivie d'une apoptose extensive des cellules épithéliales alvéolaires et de lésions rapides d'emphysème (57).

2.3.4. Sénescence cellulaire et vieillissement accéléré

La sénescence cellulaire consiste en un état d'arrêt permanent de la prolifération qui limite le renouvellement des tissus et participe aux processus de vieillissement (58). Par ailleurs, les cellules sénescents synthétisent et secrètent des nombreuses cytokines, chimiokines, protéases et médiateurs lipidiques que modifient l'environnement cellulaire (59). Ces deux mécanismes pourraient expliquer le rôle de la sénescence dans la genèse de l'emphysème. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de la sénescence par la fumée de cigarette et le rôle causal de la sénescence dans le développement de l'emphysème sont peu connus à l'heure actuelle.

La sénescence cellulaire est un état d'arrêt permanent de la prolifération cellulaire avec ou sans rapport avec le raccourcissement des télomères (respectivement sénescence répliquative ou accélérée) (58). Les cellules sénescents présentent des changements morphologiques caractéristiques ; elles deviennent plus larges, aplaties et avec un aspect granuleux. Elles sont positives pour la réaction de la galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal). La sénescence répliquative dépend du raccourcissement des télomères secondaire au nombre de divisions cellulaires, alors que la sénescence accélérée est secondaire à l'exposition cellulaire à différents stimuli stressants tels que le stress oxydant, la surexpression de certains oncogènes et certains types d'altérations de l'ADN (y compris les altérations oxydatives). Des études récentes ont montré un rôle de la sénescence cellulaire dans le vieillissement et en tant que mécanisme de suppression de tumeurs. En plus, les cellules sénescents peuvent exprimer des protéases, facteurs de croissance et médiateurs de l'inflammation pouvant altérer la structure et/ou fonction de cellules environnantes (60).

Quel que soit le type de sénescence (répliquative ou accélérée), la mise en jeu des mécanismes de suppression de tumeurs est critique pour l'induction et le maintien du phénotype sénescents. Les signaux télomériques (sénescence répliquative) et l'endommagement de l'ADN (sénescence accélérée) agissent essentiellement via un mécanisme impliquant la voie p53-p21 alors que les signaux non-télomériques autre que l'endommagement de l'ADN le font essentiellement via la voie p16-protéine du rétinoblastome (pRB) (58). Cependant, p16 intervient aussi dans la sénescence répliquative.

Des études récentes ont mis en évidence une sénescence répliquative et accélérée (raccourcissement des télomères et expression protéique augmentée de p21 et p16) dans les cellules épithéliales alvéolaires in situ et dans des fibroblastes in vitro issus de poumons de patients avec emphysème post-tabagique (61, 62). De même, l'expression de p53 est augmentée in situ dans le poumon emphysémateux (63). Cependant, le raccourcissement des télomères n'était pas spécifique de l'emphysème, car il était également observé, au même degré, chez des sujets et des cellules issues de fumeurs sans BPCO. In vivo, il a été mis en évidence une sénescence accélérée dans les cellules alvéolaires après 15 jours d'exposition à la fumée de cigarette (64). Par ailleurs, l'exposition in vitro de cellules épithéliales alvéolaires et de fibroblastes à la fumée de cigarette induit une sénescence accélérée (64, 65), inhibée par des antioxydants (64). Globalement, ces études suggèrent l'existence d'une sénescence accélérée, secondaire à un stress oxydant, dans l'emphysème pulmonaire post-tabagique. Cependant, il n'y a pas de données montrant si cette sénescence accélérée joue ou non un rôle causal dans l'emphysème et le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans ce phénomène.

Synthèse 1 : les mécanismes à l'origine de l'emphysème et de la BPCO sont multiples et font intervenir traditionnellement un excès d'inflammation, un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases. Plus récemment, d'autres mécanismes ont pu être mis en évidence, dont l'apoptose et la sénescence cellulaire conduisant entre autre à un défaut de réparation participant à l'amplification des lésions induites par les différentes agressions. Ces mécanismes restent très intriqués, l'excès de radicaux libres de l'oxygène d'origine exogène ou produit par les cellules pulmonaires semble cependant déterminant car il module et influence chacun des processus décrits précédemment.

2.3.5. Excès de radicaux libres de l'oxygène d'origine endogène

Le poumon est l'organe le plus exposé à de fortes concentrations d'oxygène. Un excès de radicaux libres de l'oxygène a été mis en évidence au niveau pulmonaire et systémique chez les patients atteints d'emphysème. Ces radicaux libres sont pour partie d'origine exogène. En effet, la fumée de cigarette contient de très grandes quantités de radicaux libres, environ 10^{14} par bouffée, dont la majorité sont des radicaux alkoxy ($RO\cdot$) et peroxy ($RO_2\cdot$) (66). Cependant, la surproduction endogène de radicaux libres de l'oxygène joue un rôle essentiel au cours de l'emphysème. Le principal de ces radicaux libres endogènes est l'anion superoxyde (O_2^-) (figure 1).

2.3.5.1. Sources cellulaires d'anion superoxyde au niveau pulmonaire

Les macrophages alvéolaires (67) et les polynucléaires neutrophiles (68) mais aussi les pneumocytes 2 produisent l'anion superoxyde. Wallaert et al. ont montré que les cellules épithéliales alvéolaires de type 2 de cobayes produisent l'anion superoxyde en quantité comparable à celle produite par les macrophages alvéolaires des mêmes animaux (69). De même, un étirement mécanique entraîne la production d'anion superoxyde dans des cultures primaires de cellules alvéolaires de type 2 de rat (70). Les fibroblastes pulmonaires ne semblent pas produire d'anion superoxyde (69).

2.3.5.2. Sources d'anion superoxyde dans la cellule

Les principales sources d'anion superoxyde dans la cellule sont la chaîne respiratoire mitochondriale, les molécules de la famille NADPH oxydase (NOX) et la xanthine oxidoreductase.

A l'état basal, environ 1 à 3% de l' O_2 consommé est incomplètement métabolisé par la chaîne respiratoire mitochondriale et est converti en anion superoxyde. En situation pathologique,

l'inhibition du transfert d'électron au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale est associée à une augmentation de la production d'anion superoxyde (70).

Les NOX sont des protéines intermembranaires catalysant la génération d'anion superoxyde à partir de l' O_2 et de la NADPH selon la réaction suivante : $NADPH + O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + O_2^-$. La NADPH oxidase ou NOX 2 a été initialement décrite dans les cellules phagocytaires où elle participe à la destruction des pathogènes. D'autres enzymes de cette famille ont été identifiées dans des cellules non phagocytaires, notamment épithéliales. En particulier, NOX4 participe à la production de radicaux libres de l'oxygène par les pneumocytes 2. En effet, la suppression de l'expression de NOX4 par interférence ARN diminue la production de radicaux libres de l'oxygène induite par l'exposition aux particules diesel dans une lignée cellulaire proche des pneumocytes de type 2 (71).

Enfin, la xanthine oxidase catalyse l'oxydation de la xanthine en urate, nécessitant pour cela la réduction de l' O_2 , et la production d' O_2^- . La xanthine oxidase est essentiellement exprimée par les cellules endothéliales vasculaires et est impliquée dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion. Cependant, des arguments indirects suggèrent la présence de la xanthine oxydase dans les pneumocytes de type 2 (72). Dans le modèle d'œdème pulmonaire de réexpansion chez le rat, alors qu'il existe une forte production de radicaux libres de l'oxygène dans les pneumocytes de type 2, l'administration d'allopurinol, un inhibiteur de la xanthine oxydase, diminue la production de radicaux libres de l'oxygène dans le poumon.

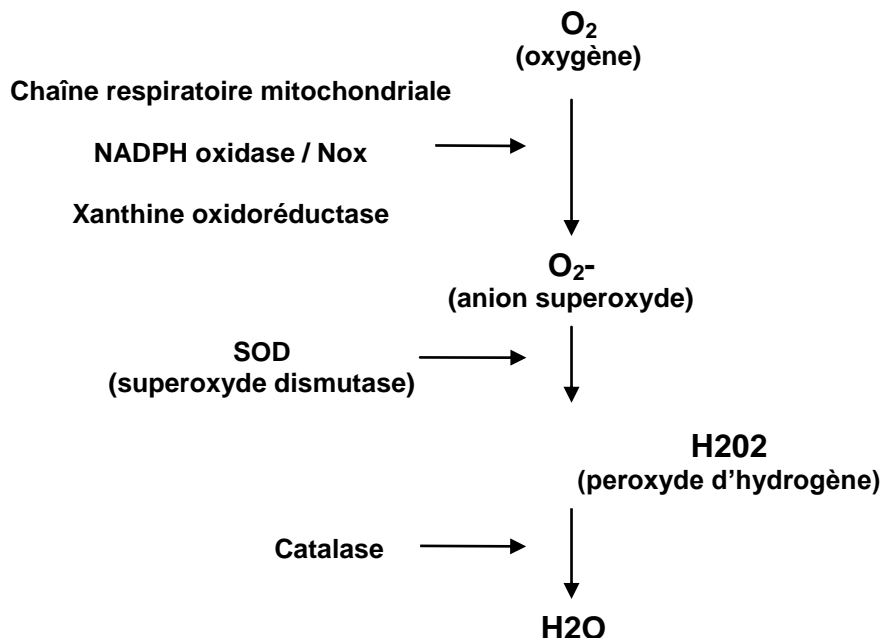


Figure 1: radicaux libres de l'oxygène (O_2^- , H_2O_2)

2.3.5.3. Expression des systèmes antioxydants dans l'emphysème : données contradictoires

Les systèmes antioxydants présents dans le poumon sont multiples et incluent à la fois des éléments extracellulaires tels que le glutathion et des éléments intracellulaires tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase ou l'hème-oxygenase-1 (HO-1). L'expression de ces systèmes est sous le contrôle de facteurs de transcription, notamment du facteur Nrf2 (73).

L'expression de certains systèmes anti-oxydants est diminuée dans le poumon emphysémateux. Ainsi, les macrophages alvéolaires des sujets atteints de BPCO sévère expriment l'HO-1 à un niveau inférieur à celui des macrophages alvéolaires de sujets fumeurs indemnes d'emphysème (6). De même, l'expression de Nrf2 est plus faible dans le poumon emphysémateux humain par rapport au poumon de sujets fumeurs indemnes d'emphysème ou non fumeurs (74). Cependant, l'expression pulmonaire d'autres systèmes anti-oxydants semble augmentée au niveau des cloisons alvéolaires au cours de cette pathologie, dont l'hème-oxygenase 2 (6) ou la MnSOD (75). La résultante nette de la somme de la sous-expression de certains systèmes anti-oxydants et de la surexpression de certains autres en terme de capacité anti-oxidante pulmonaire au cours de la BPCO n'est pas connue. Cependant, le défaut de plusieurs systèmes anti-oxidants est associé à une aggravation de l'emphysème induit par la fumée de cigarette chez l'animal ; cela suggère un rôle important de la défaillance des systèmes anti oxydant dans la genèse de la maladie (76).

2.3.5.4. Participation des radicaux libres de l'oxygène (ROS) au développement de l'emphysème

L'excès d'oxydants est une des caractéristiques du poumon emphysémateux. Le taux d'H₂O₂ dans l'air exhalé est plus élevé chez les sujets fumeurs et les sujets BPCO par rapport aux sujets non fumeurs (77) alors que les produits de la peroxydation lipidique, marquant la présence d'espèces réactives de l'oxygène, sont détectés à des taux élevés dans le condensat de l'air exhalé et le tissu pulmonaire des fumeurs atteints de BPCO par rapport à ceux des fumeurs indemnes d'emphysème et des non-fumeurs (78, 79). De même, la 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OH-dG), qui est produite par les dommages oxydatifs de l'ADN induits par les radicaux libres de l'oxygène est augmentée dans le poumon périphérique des patients emphysémateux (80).

La relation de cause à effet entre la production de radicaux libres de l'oxygène et la survenue d'un emphysème pulmonaire est évidente dans des modèles animaux. Le traitement par des chelateurs des oxydants tels la N-acetyl-cysteine (81) ou la thioredoxine (82) protègent les animaux contre l'emphysème induit par l'élastase. De plus, les souris surexprimant la

superoxyde dismutase copper zinc (CuZnSOD), une enzyme initiant le processus de détoxification des anions superoxydes en les convertissant en peroxyde d'hydrogène (figure X), sont protégées de l'emphysème induit par la fumée de cigarette ou par l'élastase (83).

La participation des radicaux libres de l'oxygène dans la destruction alvéolaire induite par la fumée de cigarette passe par plusieurs mécanismes.

2.3.5.4.1. ROS et induction de l'inflammation

Une relation entre les marqueurs de stress oxydants dans l'air exhalé et le nombre de neutrophiles a pu être observée (84).

Initialement, il a été montré que les radicaux libres de l'oxygène pouvaient diminuer la défrotabilité des polynucléaires neutrophiles, conduisant à une séquestration pulmonaire plus importante des polynucléaires neutrophiles (85). Cette séquestration est abolie par les antioxydants (86).

Les radicaux libres de l'oxygène peuvent avoir un rôle fondamental dans l'induction d'une inflammation accrue en raison de la stimulation redox sensible de facteurs de transcriptions comme NFkB, ERK (extra cellular signal-regulated kinase), cJun Nterminal Kinase(87, 88). Il a été montré que la fumée de cigarette activait chacun de ces mécanismes de régulation (89, 90).

Le remodelage de la chromatine est un autre événement induit par les radicaux libres de l'oxygène qui peut être à l'origine d'une inflammation accrue. Dans des circonstances normales, l'ADN est enroulé autour des « core » d'histones et cette configuration prévient la transcription excessive par des facteurs comme NFkB tout en réduisant l'accès de la RNA polymérase à l'ADN, le tout conduisant à une répression transcriptionnelle. Sous le contrôle de l'histone acetyltransférase, les résidus de l'histone sont acétylés induisant une modification de l'interaction de l'ADN avec l'histone. Cela permet l'accès de l'ADN aux facteurs de transcription comme NFkB ou à la RNA polymérase conduisant à une augmentation de l'expression des gènes. Ce processus est réversible grâce aux histones déacétylases (HDAC). Ces différents processus sont connus pour être redox sensible, en particulier l'acétylation des histones (91). La fumée de cigarette induit *in vivo* une augmentation des histones acétylées et à une diminution de l'activité des HDAC, qui pourraient intervenir dans le développement de la BPCO (92).

2.3.5.4.2. ROS et dégradation de la matrice extracellulaire

En premier lieu, les radicaux libres de l'oxygène peuvent fragmenter les composants de la matrice extra cellulaire, comme l'élastine, le collagène, le hyalurona. La surexpression de la superoxyde dismutase extra cellulaire (SOD3) dans le poumon prévient la fragmentation de la

matrice extra cellulaire induite par les oxydants et le développement de l'emphysème secondaire à la fumée de cigarette chez la souris (93). Les fragments d'élastine ainsi produits se comportent comme des néo antigènes conduisant à une réaction auto immune et à un afflux de cellules inflammatoires qui entretiennent et amplifient la réaction inflammatoire excessive (94). Ainsi, l'effet protecteur de la SOD3 est directement liée à une diminution de l'activité chimiotactique liée aux fragments d'élastine vis-à-vis des cellules inflammatoires, en particulier les polynucléaires neutrophiles (93).

Non seulement les radicaux de l'oxygène participent à la dégradation de la matrice extra cellulaire, mais ils empêchent aussi l'assemblage des fibres élastiques composant cette matrice (95). L'oxydation de la tropoélastine, un précurseur de l'élastine, prévient l'assemblage des fibres élastiques à toutes ses étapes, de l'interaction entre les fibres élastiques à l'interaction avec les autres protéines (95). Ainsi, les radicaux libres de l'oxygène pourraient contribuer aux anomalies de structures et de fonction des fibres élastiques au cours de la BPCO.

Les ROS peuvent aussi diminuer l'activité des antiprotéases. L'oxydation de l' $\alpha 1$ anti trypsine sur son résidu méthionine diminue sa capacité à inhiber l'élastase du neutrophile (96). De plus, l' $\alpha 1$ antrypsine oxydée augmente la sécrétion par les cellules épithéliales de MCP-1 et d'IL-8, qui à leur tour attirent les macrophages et les polynucléaires neutrophiles et amplifie la réaction inflammatoire (96).

2.3.5.4.3. ROS et acides nucléiques

L'acide nucléique est aussi une cible préférentielle pour les radicaux libres de l'oxygène. Une augmentation de l'oxydation de l'ADN et de l'ARN a récemment été mise en évidence dans le poumon des patients présentant un emphysème (80). La guanine est la base la plus accessible à l'oxydation qui conduit à la production de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8OHdG) au niveau de l'ADN et de 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8OHG) au niveau de l'ARN.

L'oxydation de l'ADN est connue pour induire un certain nombre de mécanismes de réparation de l'ADN conduisant à une sénescence accélérée ou à une apoptose des cellules concernées (58). Ces mécanismes passent essentiellement par p53 qui est surexprimé dans le poumon des patients présentant un emphysème (63). L'âge pourrait être un facteur conduisant à une diminution des systèmes antioxydants et à une augmentation des lésions oxydatives de l'ADN induites par la fumée de cigarette (97).

L'oxydation de l'ARN et ses conséquences biologiques ont été moins caractérisées, mais elles pourraient déréguler la translation, induire des erreurs de translation et jouer un rôle dans le développement de l'emphysème (98). Afin de s'opposer aux effets de l'oxydation de l'ARN, il existe de multiples voies de réparation. L'ARN oxydé peut ainsi être fixé sélectivement, séquestré et exclu du matériel de translation. Si le rôle de ces mécanismes n'est pas connu au

cours de l'emphysème, il a été démontré une diminution de l'expression de ces voies de réparation, notamment de la *Y-box binding protein 1* (YB1), dans les fibroblastes de sujets emphysémateux comparés à des témoins fumeurs (99). Ceci suggère que l'oxydation de l'ARN pourrait directement intervenir dans le développement de l'emphysème. L'oxydation de l'ARN fait maintenant l'objet d'une plus grande attention depuis qu'il a été montré qu'elle était impliquée dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives (100). Elle pourrait en particulier constituer un signal conduisant à la sénescence cellulaire (101).

Synthèse 2: Les radicaux libres de l'oxygène, en particulier l'anion superoxide, participent à la destruction des cloisons alvéolaires au cours de l'emphysème par des mécanismes multiples, induction et afflux de cellules inflammatoires, apoptose des cellules alvéolaires et défaut de réparation, dégradation de la matrice extra cellulaire, défaut d'assemblage des fibres élastiques. Cependant, d'autres espèces radicalaires pourraient jouer un rôle important dans l'emphysème. En particulier, un excès de radicaux libres de l'azote et notamment de NO a été identifié dans le poumon emphysémateux. Si beaucoup d'arguments suggèrent une mise en jeu de cette voie au cours de la BPCO, le rôle du NO au cours de l'emphysème n'est pas connu mais pourrait être majeur compte tenu de celui rapporté dans d'autres maladies chroniques.

3. Deuxième partie : complications cardio-vasculaires et polyglobulie au cours de la BPCO : mécanismes physiopathologiques et interactions

L'importante morbi-mortalité de la BPCO est liée, outre à l'atteinte respiratoire, à de multiples anomalies systémiques indépendantes de la sévérité de l'obstruction bronchique (1, 4). Ainsi, des facteurs de co-morbidité tels que le risque cardiovasculaire (multiplié par 3 dans la BPCO), la perte de poids, la dysfonction musculaire, la déminéralisation osseuse, la dénutrition contribuent à l'expression de la maladie et à sa sévérité (1, 4). Le décès des patients BPCO est pour un tiers de cause cardiovasculaire (102). Ces éléments sont déterminants dans la prise en charge des patients et dans le coût socioéconomique de la maladie. Si l'importance des co-morbidités au cours de la BPCO est clairement mise en évidence aujourd'hui, les mécanismes qui en sont à l'origine restent peu connus.

Depuis 20 ans, il est établi que le VEMS est un facteur prédictif de mortalité cardiovasculaire parmi les fumeurs, les non fumeurs et les patients avec BPCO et il y a aujourd'hui beaucoup de preuves d'une relation entre BPCO et maladies cardiovasculaires. Cependant, si certains mécanismes sont assez évidents comme l'exposition commune à la fumée de cigarette, les mécanismes pouvant expliquer cette association restent encore peu explorés.

3.1. Complications cardiovasculaires au cours de la BPCO

3.1.1. Mortalité et morbidité cardiovasculaire au cours de la BPCO

La mortalité cardiovasculaire est une cause de décès croissante, mais souvent méconnue, au cours de la BPCO. Dans la *Tucson Epidemiological Study of Airways Obstructive Disease*, une cause cardiovasculaire de décès était mentionnée chez environ 50% des patients présentant une BPCO (103). Dans une autre étude chez 11 493 sujets BPCO suivis pendant plus de 3 ans, le taux de mortalité d'origine cardiovasculaire était multiplié par 3 à 4 chez les sujets BPCO par rapport à des sujets sans BPCO appariés sur le sexe et l'âge. Les patients BPCO avaient un risque plus important d'insuffisance cardiaque (RR, 4,09), d'arythmie (RR, 2,81) et d'infarctus du myocarde (RR, 1,51) (104).

Chez les patients ayant une pathologie cardiovasculaire établie, la BPCO est associée à une mortalité cardiovasculaire accrue, et à un taux d'hospitalisation plus important, que ce soit dans les suites d'un infarctus du myocarde ou au cours de l'insuffisance cardiaque (105-107).

De plus, il existe un risque plus élevé de morbidité cardiovasculaire et d'hospitalisation pour une maladie cardiovasculaire au cours de la BPCO comparé au reste de la population (108, 109). Les sujets plus jeunes (<65 ans) et les femmes semblent avoir un plus haut risque que les hommes plus âgés.

Cependant, les données obtenues au cours de ces études étaient obtenues à partir de certificats de décès, qui pouvaient conduire à des erreurs de classification. Dans l'essai clinique TORCH, une large étude des effets des corticoïdes inhalés et des b2 mimétiques de longue durée d'action sur la mortalité dans la BPCO (110), la cause de la mortalité était déterminée avec précision : 25% des décès étaient dus à une origine pulmonaire, 27% étaient d'origine cardiovasculaire. De même, dans la Lung Health Study, les causes de décès et d'hospitalisation ont été établies de manière indépendante chez 5 887 patients avec BPCO âgés de 35 à 46 ans avec une obstruction légère ou modérée, et suivis pendant 5 ans. La mortalité à 5 ans était de 2,5%, 25% des décès étaient d'origine cardiovasculaire et les maladies cardiovasculaires étaient à l'origine de 42 % des premières hospitalisations, et de 44% des secondes hospitalisations, comparées à 14 % d'hospitalisations liées à une origine respiratoire (111).

Ainsi, un large panel d'études confirme que la BPCO pourrait être un important facteur en cause dans le développement des cardiopathies ischémiques. Le mécanisme responsable de ce risque cardiovasculaire accru n'est pas connu, mais une série d'hypothèses a pu être avancée (figures 2).

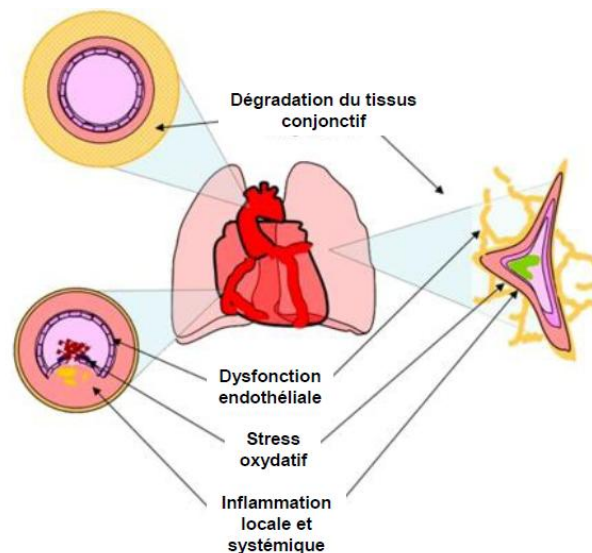


Figure 2 : Physiopathologie de la BPCO et des maladies coronariennes, d'après MacNee W. et al.(112)

3.1.2. Physiopathologie de l'athérosclérose

La physiopathologie de l'athérosclérose est complexe (113). Le rôle du métabolisme lipidique est bien établi ; cependant des études ont révélé l'importance de l'inflammation au cours du développement de la plaque d'athérome et au cours de sa rupture (114).

Le développement de l'athérosclérose débute par la lésion de l'endothélium vasculaire, qui est rendu plus perméable à toute une variété de facteurs, notamment l'inflammation systémique et le stress oxydant. Les lipoprotéines entrent alors dans l'intima via l'endothélium vasculaire. Les lipoprotéines modifiées et l'inflammation accrue induisent alors la production de cytokines et l'expression de molécules d'adhésions, comme ICAM-1 et VCAM-1 au niveau de l'endothélium vasculaire, permettant aux monocytes circulants d'adhérer à la surface vasculaire endommagée. La libération de facteurs chimiotactiques spécifiques dirige ensuite la migration des leucocytes vers l'intima du vaisseau. Les cellules musculaires lisses vasculaires prolifèrent alors et peuvent migrer de la média vers l'intima. Ces cellules musculaires produisent une matrice extracellulaire, qui s'accumule à l'intérieur de plaques avec la formation de lésions fibro-graisseuses. Ceci induit une fibrose du mur vasculaire et par conséquent une mort des cellules musculaires lisses. Des calcifications peuvent survenir, produisant une plaque avec un cœur fibreux entouré d'une enveloppe riche en lipides.

Certaines plaques plus vulnérables, qui contiennent un niveau élevé de lipides et de cellules inflammatoires, sont prédisposées à la rupture qui induit une vasoconstriction et la formation d'un thrombus impliqué dans la survenue d'un infarctus du myocarde.

Une série de cellules comme les macrophages et les lymphocytes T activés peuvent promouvoir et entretenir cette réaction inflammatoire. L'expression accrue de cytokines, comme l'interleukine (IL)-6, le *Tumor necrosis factor* α (TNF α) peuvent faciliter le dépôt des composants nécessaire à la formation de la plaque athéromateuse.

La **dysfonction endothéliale** joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Il s'agit d'une altération des fonctions de l'endothélium avec une perte de ses capacités d'adaptation vasculaire aux modifications de débit sanguin, de régulation des phénomènes inflammatoires locaux, des processus d'agrégation plaquettaire et de coagulation (cf partie suivante).

3.1.3. Inflammation systémique et risque cardiovasculaire au cours de la BPCO

Il existe des preuves abondantes d'une inflammation systémique au cours de la BPCO, à la fois une augmentation des leucocytes circulants activés et à la fois une augmentation des médiateurs inflammatoires (115).

Les polynucléaires neutrophiles périphériques sont activés chez les patients avec BPCO pour libérer des radicaux libres de l'oxygène (116). Ils ont une expression accrue de molécules d'adhésion. Par ailleurs, les monocytes circulants des patients BPCO libèrent 2,5 fois plus de matrice métallo protéases 9 (MMP9) que des sujets contrôles, et MMP9 est impliqué dans la pathogénie de l'athérosclérose de la rupture de la plaque (113, 117).

La CRP circulante, un biomarqueur majeur d'inflammation systémique, est largement augmentée chez les sujets BPCO, son niveau est inversement corrélé à l'obstruction bronchique (117-119). La CRP est aussi retrouvée dans les lésions athéromateuses et a par conséquent un rôle causal dans l'athérogenèse (120). Sachant que la CRP est un marqueur pronostic de mortalité au cours de la BPCO (119) et qu'elle est un marqueur de risque cardiovasculaire accru (121), ces éléments sont en faveur d'une implication de l'inflammation systémique dans le développement de l'athérosclérose au cours de la BPCO.

Cependant, l'origine de cette inflammation accrue n'est pas clairement établie et plusieurs mécanismes ont pu être proposés. En premier lieu, son origine pourrait être le résultat d'un excédent de médiateurs de l'inflammation (ou *overspill*) issus des poumons (122), La mise en évidence du passage de substances inhalées lors de nébulisation dans la circulation systémique est en faveur de cette hypothèse (123, 124), et plusieurs études montrent que l'inhalation de particules, comme des polluants atmosphériques, peuvent conduire à une réponse inflammatoire systémique (125-127). La corrélation négative entre le niveau de cytokines comme IL1- β ou TNF- α dans l'expectoration induite avec l'index de masse corporelle suggèrent que l'excès d'inflammation pulmonaire observée au cours de la BPCO pourrait être directement à l'origine de certaines atteintes systémiques (128). Cependant, en dehors des exacerbations (129), il n'a pas pu être démontré de relation entre le niveau de cytokines au niveau des voies aériennes et celui retrouvé au niveau systémique (130-132).

Une autre explication serait que l'inflammation systémique et pulmonaire serait liée à un mécanisme commun dont l'origine ne serait pas nécessairement pulmonaire. Ainsi, la mise en évidence d'une corrélation entre le polymorphisme du gène de certaines cytokines comme TNF- α ou IL6, et la sévérité de la maladie, et le niveau circulant de ces cytokines serait en faveur de cette hypothèse (133). Cependant, la nécessité d'une exposition pulmonaire environnementale—dont le tabac est le principal représentant—ne permet pas de retenir exclusivement ce mécanisme commun.

Une autre origine de l'inflammation systémique au cours de la BPCO pourrait être la moelle osseuse. La moelle osseuse est le site de production des cellules inflammatoires, et la libération de ces cellules par la moelle est connue pour être stimulée par la fumée de cigarette ou la pollution atmosphérique (134, 135), Palange et al. cependant, montrait que les progéniteurs hématopoïétiques circulants étaient significativement réduits chez des sujets BPCO comparés à des témoins, et que leur nombre était inversement corrélé à la sévérité de l'obstruction (136).

3.1.4. Stress oxydant systémique et maladies cardiovasculaires au cours de la BPCO

Aucune étude n'a confirmé directement l'hypothèse qu'une production accrue de radicaux libres de l'oxygène est à l'origine du risque cardiovasculaire accru observé au cours de la BPCO. Cependant, le rôle pivot du stress oxydant dans la pathogénie de l'athérosclérose et la mise en évidence d'un stress oxydant accru non seulement au niveau pulmonaire mais aussi systémique au cours de la BPCO sont en faveur de cette hypothèse.

Les radicaux libres de l'oxygène (ROS) induisent des lésions des membranes cellulaires et nucléaires et interagissent avec les médiateurs vasoactifs endogènes formés dans les cellules endothéliales et modulent ainsi le processus d'athérogenèse. Les ROS induisent une peroxydation des lipides, conduisant à la formation de lipoprotéines oxydées (LDL), un médiateur clé de l'athérosclérose. Les LDL oxydés induisent entre autre une augmentation des molécules d'adhésions au niveau de l'endothélium, stimulant l'afflux de monocytes macrophages, lymphocytes T dans la paroi vasculaire (137).

De plus, les polynucléaires neutrophiles systémiques des patients avec BPCO produisent non seulement plus de ROS, mais sont aussi associés à un niveau plasmatique plus élevé de nitrotyrosine et produisent plus de peroxydation lipidique (138). Par ailleurs, l'excès de stress oxydant au cours des exacerbations est associé à une inflammation systémique plus importante, et pourrait participer à l'instabilité de la plaque d'athérome et conduire à un syndrome coronarien aigu.

3.1.5. Hypercoagulabilité au cours de la BPCO

Un état d'hypercoagulabilité a été observé chez les patients BPCO comparés à des fumeurs sans BPCO et des non-fumeurs (139, 140). Une augmentation de l'activation plaquettaire pourrait être déterminante dans la genèse des complications cardiovasculaires chez ces patients (141). A la suite d'une lésion vasculaire et de la dénudation de l'endothélium, les plaquettes circulantes deviennent activées, stimulant l'expression de récepteurs de surface cellulaires, comme la P-Selectin et le ligand CD40 facilitant l'adhésion à la paroi artérielle. Les plaquettes activées libèrent des chemokines inflammatoires et recrutent des cellules inflammatoires conduisant à la formation d'agrégats plaquettes-monocytes, qui constitue un processus précoce au cours de l'athérosclérose. Le nombre d'agrégats plaquettes-monocytes est augmenté dans le sérum des BPCO (141). La P-selectine est augmentée chez les BPCO et inversement corrélée au VEMS (142, 143).

Le mécanisme à l'origine de cette hyperactivation plaquettaire n'est pas connu précisément, mais plusieurs paramètres pourraient intervenir comme l'inflammation systémique accrue, l'hypoxémie et le stress hémodynamique. L'activation plaquettaire est étroitement liée à

l'inflammation locale vasculaire, car les plaquettes activées sécrètent des facteurs chemoattractants pour les leucocytes. De même, les leucocytes induisent une activation plaquettaire.

La diminution du NO disponible au niveau vasculaire chez les patients BPCO participe probablement à ce processus. En effet, le NO produit par la eNOS au niveau de l'endothélium ou des plaquettes a d'importants effets antithrombotiques car il inhibe l'adhésion, l'activation plaquettaire et l'agrégation monocytes plaquettes (144, 145). L'inhibition des NOS chez des volontaires sains est ainsi associée à une diminution de l'expression à la surface des plaquettes de la P-Selectine et du ligand CD40 (146).

3.1.6. Rôle de l'hypoxie

L'hypoxie secondaire aux formes sévères de la maladie pourrait être impliquée dans les processus d'athérogénèse. Il pourrait en être de même en ce qui concerne l'hypoxie intermittente lors des exacerbations ou de l'exercice.

En effet, il a été montré que l'hypoxie pouvait induire un ensemble d'effets pouvant influencer la survenue de l'athérosclérose. Cela englobe l'inflammation systémique, la production de radicaux libres de l'oxygène, et la stimulation des molécules d'adhésion cellulaire (147-149). La production de cellules spumeuses, un constituant critique de la plaque d'athérome, est aussi stimulée lorsque les macrophages sont en condition hypoxique (147). L'expression d'ICAM-1 est aussi stimulé quand les cellules endothéliales sont en condition hypoxique (149). L'hypoxie peut aussi induire chez la souris une athérosclérose accrue en induisant une augmentation de la peroxydation des lipides (150) et une réduction du niveau de la superoxyde dismutase a pu être observée dans le tissu myocardique de rats exposés à un environnement hypoxique (151).

L'hypoxie induit aussi un stress hémodynamique (152). Des sujets normaux mis en conditions hypoxiques afin de réduire leur saturation à 80% pendant une heure augmentent leur fréquence cardiaque et leur débit cardiaque. Ces effets aigus pourraient être relevant chez les sujets présentant une BPCO, car ils sont soumis à des épisodes d'hypoxie intermittente lors des exacerbations. De même, l'hypoxie affecte la circulation rénale, diminuant le flux sanguin rénal et activant le système rénine angiotensine, et conduisant ainsi à une vasoconstriction périphérique plus importante (153).

Cependant, si ces phénomènes peuvent intervenir au cours des complications cardiovasculaires survenant chez de patients présentant des formes sévères de BPCO, ils ne peuvent rendre compte de l'augmentation du risque cardiovasculaire décrit dans les formes modérées, qui sont probablement peu associées à une hypoxie.

3.1.7. Effet de la BPCO sur le système sympathique et risque cardiovasculaire

L'activation du système nerveux sympathique (SNS) est associée à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (154). Étant donné que la BPCO et l'insuffisance respiratoire chronique sont associées à une activation du SNS (155), celle-ci pourrait contribuer à la mortalité et la morbidité cardiovasculaire au cours de la BPCO.

Plusieurs études ont montré qu'une fréquence cardiaque élevée au repos est un facteur indépendant de mortalité et morbidité cardiovasculaire dans la population générale (156); la tachycardie est fréquente au cours de la BPCO (155). De plus, la BPCO est aussi associée à une réduction de la variabilité de la fréquence cardiaque, marqueur d'une régulation autonome cardiaque anormale, mais aussi marqueur prédictif de mortalité chez les sujets âgés (157, 158).

Vus les effets potentiels négatifs de la stimulation sympathique et les effets bénéfiques des β -bloquants au cours de l'insuffisance cardiaque, de la fibrillation atriale, de l'infarctus du myocarde, plusieurs études observationnelles ont étudié les effets des β_2 mimétiques sur la morbidité et la mortalité cardiovasculaire avec des résultats discordants (159, 160). Cependant, l'étude TORCH ne retrouvait pas d'augmentation de la mortalité cardiovasculaire chez 1521 patients traités par salmétérol comparés à 1524 patients ayant eu un placebo (8).

Dans une méta-analyse incluant 131 patients avec COPD randomisés entre β -bloquants et placebo, le VEMS n'était pas significativement modifié chez les patients traités par β -bloquants (161). De plus, des preuves issues d'études observationnelles sont en faveur d'une diminution de la mortalité cardiovasculaire chez les sujets BPCO traités par β -bloquants après chirurgie vasculaire, infarctus du myocarde, ou lors d'une hospitalisation pour exacerbation (162-164), quoique dans de telles études, il est difficile de tenir compte des facteurs confondants. Cependant, ces éléments sont en faveur d'une implication du SNS dans la survenue des complications cardiovasculaires au cours de la BPCO.

3.1.8. Dégradation du tissu conjonctif

La sévérité de l'emphysème, quantifiée en tomographie densitométrique, est aussi corrélée à la rigidité artérielle évaluée par la propagation de l'onde de pouls, indépendamment de l'âge, du sexe, du nombre de paquets-années. Dans les artères, la dégradation de l'élastine est associée à une augmentation du collagène, un épaississement des artères et à une rigidité accrue (165). Parallèlement, la dégradation de l'élastine dans le poumon conduit à une perte de la structure alvéolaire, une diminution de la compliance, une augmentation du collagène et de l'emphysème (166). Les rides cutanées, qui sont caractéristiques de la dégradation de l'élastine dans le derme (167), sont aussi associées à la sévérité de l'emphysème, indépendamment du nombre de paquets-années (168).

L'augmentation de l'activité élastolytique pourrait être impliquée dans le développement à la fois de l'emphysème et de la rigidité artérielle et pourrait constituer le lien manquant entre ces deux pathologies. Ainsi, les souris MMP12 -/- sont non seulement protégées de l'emphysème induit par la fumée de cigarette mais aussi de la dégradation de l'élastine et de l'athérosclérose chez des souris déficientes apoE (45, 169).

Il a aussi été proposé que l'auto-immunité au cours de la BPCO pourrait être à l'origine des complications cardiovasculaires observées et de cette dégradation globale de l'élastine (170). Les sujets BPCO et emphysémateux présentent une augmentation de la réponse des cellules B et T aux peptides d'élastine, de même que des anticorps anti-élastine (171).

3.1.9. Circulation bronchique, le lien manquant ?

La circulation bronchique a peu été explorée au cours de la BPCO. Une ancienne étude histologique réalisée sur des poumons en post mortem montrait une diminution de la vascularisation bronchique chez les patients avec BPCO (172). Une réduction globale du calibre des artères bronchiques est associée à un aspect « en tire-bouchon » au niveau proximal avec régulièrement une obstruction de la lumière (172). Ces observations pourraient suggérer que l'atteinte vasculaire périphérique est associée à une atteinte artérielle bronchique. On ne connaît pas le rôle de cette atteinte artérielle bronchique, mais il n'est pas exclu qu'elle puisse participer à la genèse de l'atteinte bronchique de la BPCO, voire de l'emphysème. En effet, la circulation bronchique est impliquée dans la formation de la couche liquide tapissant l'épithélium bronchique et une circulation bronchique fonctionnelle est nécessaire pour le maintien de la clairance muco-ciliaire (173). De même, la circulation bronchique est nécessaire pour l'absorption des micro particules (174 , 175). Il est aussi intéressant de constater que le TNF alpha, dont le rôle semble important au cours de l'emphysème, induit une vasoconstriction des artères bronchiques (176)

Plus récemment, avec des méthodes moins invasives, des auteurs n'ont pas retrouvé de diminution du nombre de vaisseaux dans les voies aériennes des patients BPCO (par opposition aux patients asthmatiques), soit après analyses de biopsies bronchiques ou en bronchovideoscopie (177, 178).

De manière intéressante, une évaluation non invasive du flux sanguin bronchique ne montrait pas d'augmentation du flux en réponse à l'acétylcholine chez les patients BPCO comparés à des sujets contrôles, mais ce flux était corrélé au NO expiré (179).

3.1.10. Vieillesse accélérée, athérosclérose et BPCO

Le vieillissement est un important déterminant non seulement de l'emphysème, mais aussi de la rigidité artérielle, ainsi que de l'ostéoporose et des rides cutanées (180). Ainsi, un vieillissement accéléré global pourrait être à l'origine de la BPCO et des complications notamment cardiovasculaires qui lui sont associées (181).

De manière intéressante, il a été observé une diminution de la longueur des télomères des leucocytes circulants chez les patients présentant une BPCO (182). La longueur des télomères est un facteur prédictif d'événement cardiovasculaire et la réduction de la longueur des télomères des leucocytes circulants est associée à la mortalité de toute origine au cours de la maladie coronarienne stable (183, 184). Une relation a été montrée entre la longueur des télomères et la rigidité artérielle évaluée par la vitesse de propagation de l'onde de pouls (185).

Des télomères courts ont été détectés dans les cellules endothéliales sénescents et les cellules musculaires lisses issues de plaques d'athérome (186). De plus, des télomères plus courts ont été retrouvés dans les cellules endothéliales de patients avec maladies coronaires comparés à des patients indemnes de maladies coronaires (186). Les cellules sénescents promeuvent la dysfonction endothéliale et le développement de l'athérosclérose et pourraient être impliquées dans la déstabilisation de la plaque d'athérome (187).

Par ailleurs, il a été montré une diminution du nombre des cellules progénitrices endothéliales circulantes chez les patients BPCO comparés à des témoins (136, 188). Le mécanisme de cette diminution n'est pas connu actuellement, mais la sénescence cellulaire pourrait y participer et expliquer le développement accru de l'athérosclérose au cours de cette pathologie.

Synthèse 3 : Au total, la prise en compte et le dépistage de l'atteinte vasculaire constitue un axe majeur de la thérapeutique des patients atteints de BPCO. A l'heure actuelle, de nombreuses hypothèses sont avancées pour expliquer ces atteintes systémiques, de l'inflammation systémique, de l'excès de radicaux libres de l'oxygène. La dégradation excessive du tissu conjonctif pourrait constituer un mécanisme commun à l'atteinte pulmonaire et vasculaire. Cependant, aucun de ces mécanismes n'a fait la preuve de son implication dans le développement de l'atteinte cardiovasculaire au cours de la BPCO et la dysfonction endothéliale pourrait jouer un rôle majeur. Des interactions ont pu être mises en évidence entre l'hémoglobine et l'endothélium, mais le rôle de la polyglobulie, complication traditionnelle de la BPCO, sur la fonction endothéliale n'a pas été explorée.

3.2. Polyglobulie

Si la polyglobulie sévère survient rarement au cours de l'évolution de la BPCO en raison de l'avènement de l'oxygénothérapie longue durée dans la prise en charge des patients, une augmentation modérée de l'hématocrite concerne environ 20% des patients (14). La polyglobulie reste importante à dépister comme facteur lié à la gravité de la maladie, afin de décider de la mise en place d'une oxygénothérapie longue durée ou de dépister un syndrome d'apnée du sommeil associé. Elle est définie par un taux d'hémoglobine supérieur à 18 g/dl chez l'homme, 16 g/dl chez la femme. Elle est associée à une élévation de l'hématocrite à plus de 52% chez l'homme, plus de 47 % chez la femme.

3.2.1. Mécanismes

L'hypoxie chronique induit une érythropoïèse accrue : les cellules sensibles à l'hypoxie au niveau juxta glomérulaire rénal libèrent en réaction de l'érythropoïétine (EPO) conduisant à une augmentation de la masse globulaire moyenne et du volume sanguin. Une hypoxémie inférieure à 60 mmHg continue pendant au moins deux heures est suffisante pour induire une libération d'érythropoïétine chez un sujet sain (189).

Le principal déterminant de la synthèse d'EPO est l'activité transcriptionnelle de ses gènes qui est liée à la tension locale en oxygène. Elle est sous le contrôle de *l'hypoxia_inducible transcriptions factors* (HIF), dont la sous-unité HIF-2 α semble le déterminant majeur de la synthèse d'EPO (190).

La corrélation retrouvée entre le niveau d'EPO et le niveau d'hémoglobine au cours de la BPCO confirme le rôle de ce mécanisme dans la régulation du niveau d'hémoglobine au cours de cette pathologie (191). Cependant, l'absence de différence de niveau d'EPO entre des patients présentant une BPCO hypoxémique polyglobuliques et non polyglobuliques suggère l'implication d'autres mécanismes, sans que dans cette étude ait pu mettre en évidence une sensibilité différente à l'EPO des cellules progénitrices médullaires érythroïdes (192).

Le tabagisme semble jouer un rôle prépondérant dans l'induction de la polyglobulie, même en l'absence de BPCO (193, 194). Le niveau d'hémoglobine est proportionnel au tabagisme cumulé et diminue à l'arrêt de l'intoxication tabagique (195, 196). Cependant, l'absence d'augmentation de l'EPO circulante chez les fumeurs par rapport à des contrôles est en faveur d'un mécanisme indépendant de l'EPO dans la survenue de la polyglobulie chez les fumeurs (197).

3.2.2. Bénéfice discuté au cours de la BPCO

3.2.2.1. Polyglobulie et performances à l'effort

La polyglobulie est un processus compensatoire permettant une augmentation du transport de l'oxygène au niveau des tissus en augmentant le nombre de molécules d'hémoglobine pouvant fixer l'oxygène au niveau pulmonaire. Pour un hémocrite normal, l'EPO ou la retransfusion de globules rouges qui augmentent la concentration en globules rouges, améliore la consommation maximale d'oxygène (VO₂max) et les performances d'endurance (198, 199). Cet effet est recherché par les sportifs, notamment lors d'entraînements en altitude. De même, en situation pathologique cette fois, les performances à l'effort sont augmentées lorsque l'hémocrite est plus élevé chez des patients ayant une cardiopathie cyanogène (200).

Cependant, l'augmentation du niveau d'hémoglobine est associée à une augmentation de la viscosité sanguine et, de fait, à des résistances vasculaires périphériques plus élevées, ce qui pourrait diminuer la VO₂max du fait de la diminution du débit cardiaque induite (201, 202). Pour confirmer cette hypothèse, le débit cardiaque et les capacités à l'exercice des patients polyglobuliques atteints de BPCO sont augmentées après hémodilution (203).

Ainsi, l'impact clinique de la polyglobulie sur les performances à l'effort est débattu. Déterminer son effet sur les performances à l'effort des sujets BPCO est cependant important car cela pourrait justifier ou non de la mise en place de traitements substitutifs de type EPO chez les patients présentant des altérations des performances à l'effort. Ce type de traitement pourrait être particulièrement intéressant au cours du réentraînement à l'effort.

3.2.2.2. Polyglobulie et maladies cardiovasculaires

L'augmentation de la masse globulaire et de la viscosité sanguine pourrait par ailleurs avoir des effets cardiovasculaires néfastes et être à l'origine d'une hypertension artérielle, d'événements thrombo emboliques ou d'AVC (204). Des données convaincantes montrent qu'une augmentation importante de l'hémocrite est associée à des résistances élevées et une diminution du débit sanguin vers le cerveau ou vers d'autres organes (204). Chez les patients ayant une polyglobulie sévère, les interventions thérapeutiques visant à diminuer l'hémocrite améliorent le débit sanguin cérébral, le débit sanguin au niveau des membres inférieurs ainsi que le transport de l'oxygène (205). La polyglobulie au cours de la maladie de Vaquez est clairement associée à une augmentation du risque thromboembolique et une altération de la fonction endothéliale.

Cependant, ce type de complication est beaucoup moins importante au cours de la polyglobulie secondaire que lors de la polyglobulie de la maladie de Vaquez, suggérant que d'autres

facteurs que la polyglobulie interviennent au cours de la maladie de Vaquez (206). En faveur de cette hypothèse, l'incidence des maladies coronaires semble moins importante chez les individus présentant une polyglobulie en condition hypoxique vivant en altitude ou chez des adultes présentant une cardiopathie cyanogène comparés à des contrôles normocythémiques (207, 208). De plus, la polyglobulie chez les BPCO n'est pas associée à un risque post opératoire thrombo embolique plus important par rapport à des patients normoglobuliques (209). L'augmentation de la viscosité sanguine induirait une augmentation des forces de cisaillement au niveau vasculaires, qui constituent un des déterminants principaux de la libération de NO endothélium dépendant, et conduisant à une vasodilatation. Martini et al. ont ainsi montré dans un modèle animal qu'une augmentation modérée de l'hématocrite induisait paradoxalement une hypotension associée à une augmentation du diamètre vasculaire. Cet effet disparaissait après traitement par un inhibiteur des NOS ou chez les souris eNOS -/-, confirmant le rôle du NO et d'eNOS dans les phénomènes observés (210). De même, les souris surexprimant l'EPO sont protégées des maladies cardiovasculaires et ont une survie plus importante ; de manière intéressante cet effet protecteur disparaît en présence d'un inhibiteur des NOS, confirmant le rôle du NO dans ce processus (211).

Ainsi, l'impact clinique de la polyglobulie sur le système vasculaire est débattu et les mécanismes par lesquels la polyglobulie pourrait le modifier sont connus de manière très partielle. Par ailleurs, l'EPO pourrait avoir des effets cardiovasculaires propres, indépendamment de l'augmentation de l'hématocrite, rendant encore plus difficile l'interprétation des effets cardiovasculaires de la polyglobulie en condition hypoxique (212). Ceci est à prendre en compte chez les patients BPCO car ils présentent une diminution des récepteurs à l'EPO au niveau des cellules endothéliales progénitrices circulantes (213).

3.2.2.3. Polyglobulie et circulation pulmonaire

Peu de données existent décrivant l'effet de la polyglobulie sur la circulation pulmonaire. Chez la souris surexprimant l'EPO, et de fait polyglobulique, la pression artérielle pulmonaire était plus élevée *in vivo*, mais diminuée *in vitro* dans un poumon perfusé et exsanguiné (ref). Ceci suggérait un effet spécifique de la polyglobulie et de l'augmentation de la viscosité sanguine sur la pression artérielle pulmonaire, indépendamment d'un autre mécanisme. De plus, les vaisseaux pulmonaires des souris transgéniques étaient caractérisés par une production de prostacyclines élevée, une forte expression d'eNOS et une diminution de l'épaisseur du muscle lisse vasculaire. Cependant, en condition d'hypoxie, l'EPO a probablement un impact différent ; en effet, le traitement par l'EPO prévient le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire induite par l'hypoxie chez le rat (ref).

Chez l'homme, la fonction endothéliale évaluée par la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine est très altérée dans la circulation pulmonaire de sujets BPCO polyglobuliques par rapport à des normoglobuliques (214). Il est intéressant d'observer que la supplémentation en fer, qui est associée à une augmentation de l'hématocrite, améliore la vasoconstriction hypoxique et réduit l'augmentation de pression artérielle pulmonaire secondaire à un séjour en altitude. Ceci suggère une amélioration de la fonction endothéliale artérielle pulmonaire avec l'augmentation du niveau d'hémoglobine (215).

3.2.2.4. Polyglobulie et pronostic au cours de la BPCO

Si la polyglobulie est habituellement considérée comme un facteur de gravité au cours de la BPCO, il est étonnant de constater qu'aucune étude à notre connaissance n'a montré qu'elle était associée à un pronostic plus défavorable dans cette maladie. Cote et al. ne montrent pas de différence en terme de fonction respiratoire, d'index de BODE, de distance parcourue entre 40 patients polyglobuliques et 637 patients non polyglobuliques (216). Cependant, les patients n'étaient pas appariés sur le niveau de PaO₂ et l'effectif était insuffisant pour réaliser une analyse de survie. Dans l'étude de Chambellan et al. comportant 2 524 patients, l'hématocrite était un facteur prédictif indépendant de la survie, du nombre d'hospitalisation, et de la durée cumulée d'hospitalisation (14). La survie à trois ans était de 24 % quand l'hématocrite était inférieur à 35% contre 70% quand il était supérieur à 55%. A l'inverse, l'anémie est un facteur avéré de mauvais pronostic (14, 216).

Synthèse 4 : Si la polyglobulie est devenue peu fréquente au cours de la BPCO, une augmentation modérée de l'hématocrite survient chez 20% des patients présentant une BPCO. Son origine semble liée à une augmentation de l'EPO induite par l'hypoxie, mais il ne s'agit probablement pas du seul mécanisme impliqué. Si elle est décrite depuis de longues années, ses effets sur les performances à l'effort et sur le système vasculaire chez les patients BPCO restent finalement discutés et peu explorés. L'augmentation de viscosité et des forces de cisaillement qu'elle induirait pourrait moduler la libération de NO par l'endothélium sans qu'il soit possible de définir si la polyglobulie a un effet délétère ou protecteur vis-à-vis de la fonction endothéliale. Connaître l'impact de la polyglobulie sur le système cardiovasculaire est crucial en raison de l'augmentation de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaire associée à la BPCO.

4. Troisième partie : NO et NO Synthases

4.1. Synthèse et libération du monoxyde d'azote : les NO synthases (NOS)

Le monoxyde d'azote (NO) est synthétisé à partir de L-Arginine et d'oxygène moléculaire (O₂) selon la réaction suivante : L-Arginine + O₂ → L-Citrulline + NO. Brièvement, la réaction de synthèse du NO peut être assimilée à deux réactions de **monooxygénation**. La première réaction consiste en l'oxydation de la L-Arginine. Cette réaction engendre un intermédiaire, la N^ω-OH-L-Arginine, rapidement oxydée en L-Citrulline. Ces deux réactions d'oxygénation sont réalisées en parallèle avec la **réduction** d'une molécule et demi de NADPH en NADP⁺. Les électrons sont fournis par le NADPH, transférés sur les flavines et la calmoduline, puis présentés à l'hème, centre catalytique.

L'enzyme responsable de la synthèse du NO est la NO Synthase, ou NOS, dont il existe trois isoformes. La classification de ces trois isoformes s'appuie sur la chronologie de la découverte de leur ADN, plutôt que sur leur localisation tissulaire. En effet, il apparaît qu'une population cellulaire donnée peut exprimer une, deux, voire les trois isoformes de la NOS. Il existe ainsi la NOS1, ou NOS neuronale (nNOS), isolée pour la première fois dans des neurones (217), la NOS2, mise en évidence dans les macrophages (218), et la NOS3, isolée dans des cellules endothéliales (219). Une terminologie plus biochimique est aussi utilisée, regroupant ainsi les NOS1 et 3 sous le terme de NOS constitutives (cNOS), du fait de leur expression généralement (mais pas systématiquement) à l'état de base de la cellule, la NOS2 étant alors appelée NOS inductible (iNOS), son expression étant induite en réponse à des stimuli inflammatoires. Les isoformes constitutives de la NOS se distinguent de l'isoforme inductible par leur dépendance face au calcium et à la calmoduline, en terme d'activité enzymatique.

Physiologiquement, les NOS constitutives produisent un taux faible de NO à l'état de base, tandis que la NOS2, lorsqu'elle est induite, produit de larges quantités de NO. Cependant, il n'y a pas de correspondance parfaite entre les isoformes, le schéma d'expression, les taux de production de NO et les rôles biologiques des différentes NOS.

4.1.1. Localisation

Le tableau 2 résume les principales caractéristiques des NOS humaines.

| | NOS1 | NOS2 | NOS3 |
|--------------------------------|--------------------------|---------------|---------------------------|
| Local. chromosomique | 12 | 17 | 7 |
| Taille du gène | >200 kb | 37 kb | 21 kb |
| Nombre d'exons | 29 | 26 | 26 |
| Taille de l'ARNm | 8.5 - 9.5 kb | 4.2 - 4.5 kb | 4.3 - 4.8 kb |
| Nombre acides aminés | 1434 | 1153 | 1203 |
| Poids moléculaire | 160 kDa | 130 kDa | 135 kDa |
| Localisation initiale | Neurones | Macrophages | Cellules endothéliales |
| Localisation cellulaire | Cytoplasmique | Cytoplasmique | Membranaire |
| Expression | Constitutive mais régulé | Inductible | Constitutive mais régulée |
| Dépendance vs Ca ²⁺ | Oui | Non | Oui |
| Dépendance vs calmoduline | Oui | Oui | Oui |

Tableau 2 : Caractéristiques des NOS humaines

4.1.1.1. nNOS ou NOS1

Le gène de la NOS1 humaine est localisé sur le chromosome 12. C'est la première isoforme de la NOS à avoir été isolée, en 1990, par Bredt et Snyder (217). Initialement purifiée à partir de tissu nerveux, d'où son appellation de NOS neuronale, la NOS1 a aussi été détectée dans de nombreux autres types cellulaires et tissulaires, notamment les cellules épithéliales bronchiques humaines (220). Elle est essentiellement retrouvée au niveau des cellules nerveuses des voies aériennes chez l'homme et l'animal (221). Chez l'homme, ces fibres nerveuses qui contiennent NOS1 sont présentes dans le muscle lisse des voies aériennes, où le NO est le un médiateur de la relaxation du muscle lisse bronchique (222).

La NOS1 est une enzyme cytosolique.

4.1.1.2. iNOS ou NOS2

La NOS2, localisée au chromosome 17 chez l'homme, a été clonée en premier lieu dans une lignée de macrophages stimulés par du LPS et de l'interféron gamma (IFN γ) (218). Actuellement, elle a été décrite dans de nombreux types cellulaires, en particulier au niveau pulmonaire : pneumocytes de type 2 (223), fibroblastes pulmonaires (224), cellules endothéliales (225). Dans les cellules épithéliales respiratoires, iNOS a pu être mis en évidence de manière « constitutive » (226). Les stimuli induisant une activation transcriptionnelle d'iNOS sont multiples, incluant des facteurs médiateurs endogènes, aussi bien que des facteurs exogènes (résumés dans la figure 3, ref (225)).

La NOS2 est essentiellement cytosolique.

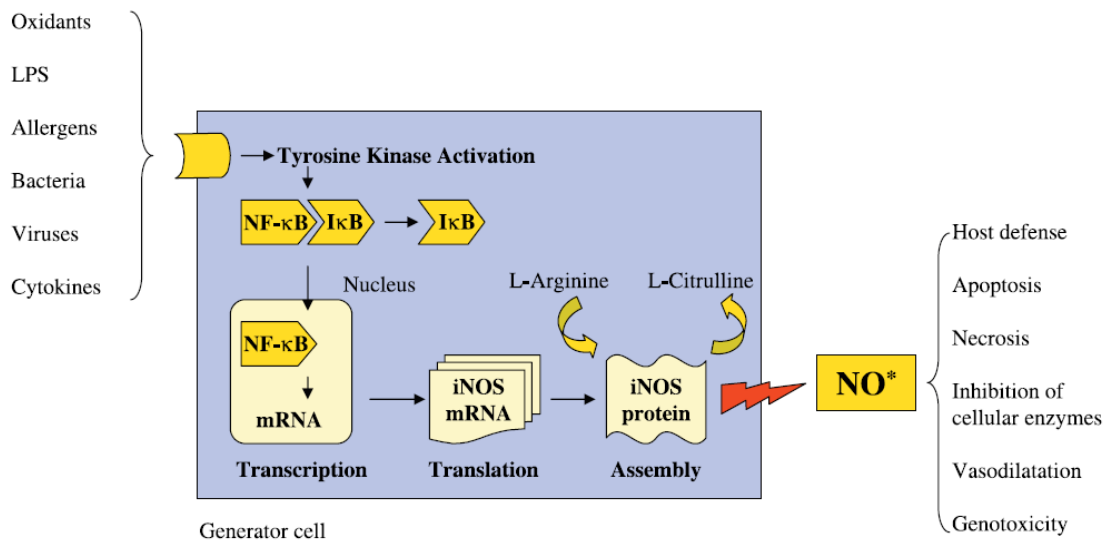


Figure 3 : Vue d'ensemble des voies de transduction conduisant à l'augmentation de l'expression de la NO synthase inductible (iNOS), d'après Ricciardolo et al. (225)

4.1.1.3. eNOS ou NOS3

La NOS3 humaine est localisée au chromosome 7. Là encore, la NOS3 a tout d'abord été identifiée au niveau des cellules endothéliales vasculaires (d'où son autre appellation de NOS endothéliale) (227). Au niveau pulmonaire, elle est aussi décrite dans les pneumocytes de type 2 et dans l'épithélium bronchique (228, 229). Plus de 95% de son activité est située dans les cellules endothéliales.

La NOS3 est, à plus de 90%, particulière, du fait de la présence d'un site de myristylation NH-2 terminal.

4.1.2. Structure

Les NOS sont des protéines homodimériques, comprenant deux monomères de 160, 130 et 135 kDa chacun pour les NOS1, 2 et 3 respectivement. Les NOS1, 2 et 3 humaines sont respectivement composées de 1434, 1153 et 1203 acides aminés par monomère (230). Chaque monomère est constitué de deux sous-domaines, l'un ayant une fonction réductase et l'autre, une fonction oxygénase (Figure 4).

4.1.2.1. Domaine réductase

Le domaine réductase est situé du côté C-terminal de la protéine. Il contient les flavines FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et FMN (Flavine Mono Nucléotide), ainsi que les sites de liaison au NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) et à la calmoduline. Ce domaine réductase présente 30 à 40% d'homologie de séquence avec la cytochrome P450 réductase. Ce domaine a ainsi la capacité de transférer des électrons du NADPH vers un autre composé redox, situé dans le domaine oxygénase : l'hème (ou ferroprotoporphyrine IX).

Le site de liaison à la calmoduline a une situation centrale sur les monomères de NOS. La liaison de la calmoduline sur son site sert quatre fonctions : premièrement, la calmoduline protège son site de liaison de l'attaque des protéases. Deuxièmement, des études ont montré que la NOS2 ne peut pas être exprimée en tant qu'enzyme fonctionnelle dans *Escherichia coli* sans l'expression parallèle de calmoduline, ceci suggérant que la NOS2 nécessite la présence de calmoduline pour s'organiser structurellement, et donc être active (230). Troisièmement, la liaison de la calmoduline facilite le transfert d'électrons depuis le NADPH vers les flavines, puis des flavines jusqu'aux accepteurs exogènes. Enfin, la zone médiane de la NOS apparaît comme une zone charnière entre les domaines oxygénase et réductase, zone pour laquelle la liaison à la calmoduline sert de déclencheur de l'activité de transfert des électrons. En effet, dans la NOS1, en absence de calcium (et de calmoduline), les deux domaines ne semblent pas être alignés, cette configuration ne permettant pas le passage des électrons. En revanche, quand le calcium est présent, la calmoduline se lie, et presque instantanément, il y a passage d'électrons depuis les flavines jusqu'à l'hème. La liaison de la calmoduline à la NOS2 semble être si forte, même en absence de calcium, qu'on peut considérer la calmoduline comme étant une sous-unité de la NOS2.

Les sites de liaison aux NADPH, FAD, FMN et à la calmoduline sont consensus pour les trois isoformes des NOS.

4.1.2.2. Domaine oxygénase

En plus de l'hème, le domaine oxygénase comporte les sites de liaison à la L-Arginine et à la tétrahydrobioptérine (BH₄). C'est ce domaine qui permet la dimérisation des monomères de NOS, sous le contrôle de la BH₄ et de la L-Arginine, la BH₄ participant de plus à la stabilité des dimères formés (231).

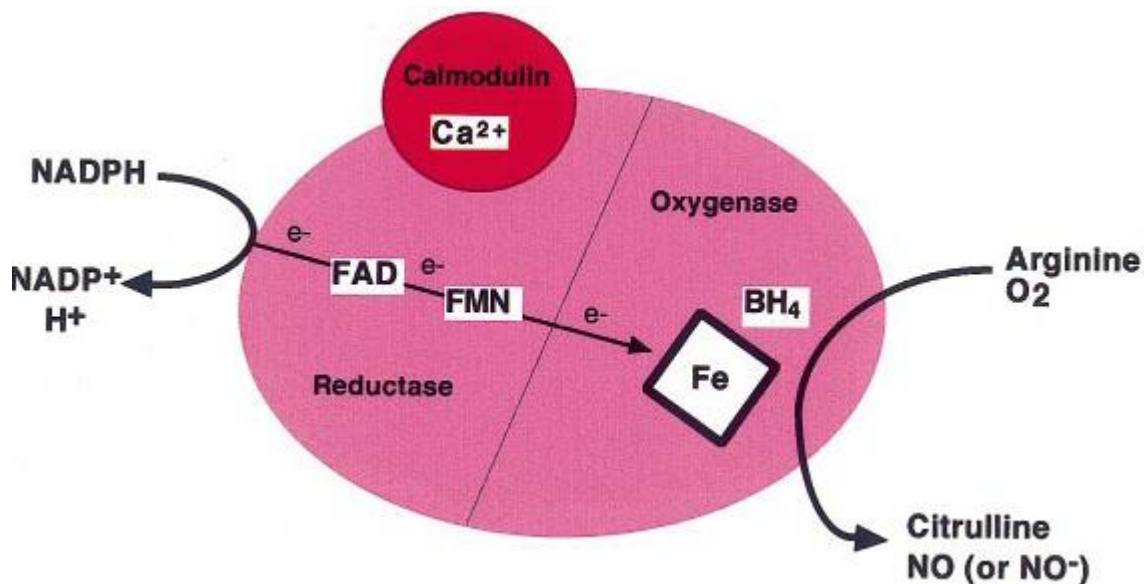


Figure 4 : Réactions catalysées et co facteurs des NOS

4.1.2.3. Dépendance face au calcium

Comme on l'a vu précédemment, la réaction de synthèse du NO ne peut se faire qu'en présence de tous les cofacteurs de la réaction. Il est à noter une différence majeure entre les différentes isoformes des NOS : leur dépendance face au calcium. En effet, l'activité de la NOS2 est toujours rapportée comme étant indépendante de ce cofacteur, alors que celle des NOS dites constitutives (NOS1 et 3) est dépendante de la présence du calcium. En effet, c'est la fixation du complexe calcium-calmoduline qui conditionne la réaction de synthèse de NO. Ainsi, la NOS2, qui a une affinité très élevée pour la calmoduline, se lie à la calmoduline à de très faibles concentrations de calcium, ce qui la rend ainsi "indépendante" de la présence de calcium.

4.1.3. Régulation de l'expression et de l'activité des NOS

Les NOS1 et 3 ont historiquement été appelées NOS constitutives du fait de leur expression à l'état cellulaire basal, à des taux invariables. De même, la NOS2, ou NOS inducible, a été tout d'abord décrite comme étant exprimée uniquement en réponse à des stimuli inflammatoires :

lipopolysaccharide ou LPS, cytokines pro-inflammatoires (IL-1, ou interleukine-1, TNF α , ou tumor necrosis factor alpha, IFN γ , ou interféron gamma). Actuellement, il est montré que la régulation de l'une ou l'autre des isoformes de la NOS est d'origine pré- ou post-transcriptionnelle.

En ce qui concerne iNOS, la production de NO est corrélée avec les changements de quantité de mRNA pour iNOS, confirmant qu'une part majeure de la régulation d'iNOS est d'origine transcriptionnelle. L'analyse du promoteur murin de INOS a mis en évidence deux régions régulatrices une sensible au LPS, l'autre à l'Interferon γ , au niveau du système respiratoire (232) (233). La région sensible au LPS contient un site de fixation pour NF κ B, un facteur de transcription impliqué dans l'activation de gènes variés exprimés au cours de la réponse inflammatoire. Le LPS active la voie des mitogen-activated protein (MAP) kinases, qui vont activer NF κ B via la phosphorylation et la dégradation de I κ B. Par ailleurs, l'Interferon γ est crucial pour l'induction d'iNOS dans les cellules épithéliales alvéolaires in vitro (234). Cette dernière voie passe par l'interaction avec un récepteur spécifique, suivi par la voie de Janus kinase (JAK)-STAT1 qui conduisent à une cascade de phosphorylation de la tyrosine (235).

Cependant, la régulation d'iNOS peut être post transcriptionnelle et le défaut de substrat représenté par l'arginine est associé à une diminution de l'activité d'iNOS (236). De même, il semblerait que la nitration d'iNOS pourrait être associé à une diminution de son activité, constituant alors un rétrocontrôle négatif (237).

La régulation d'eNOS est transcriptionnelle et post transcriptionnelle (238), La transcription d'eNOS est sous le contrôle de NF κ B ou du facteur de transcription KLF (lung Küpper_like factor). Foxo-1 agit comme un répresseur de la transcription d'eNOS (239). Mais les mécanismes post translationnels sont très importants en ce qui concerne eNOS. La phosphorylation de la sérine Ser-1177 est un des mécanismes de régulation post translationnelle les plus importants ; elle augmente l'activité d'eNOS. Elle est liée à l'activation d'Akt par la PI3 kinase (240). De même, eNOS peut être inhibé de lui-même par une production importante de NO ; la nitrosylation de la NOS fonctionnelle induit sa monomérisation et son inactivation (241). De plus, la localisation d'eNOS est importante pour son activation. En effet, eNOS est située au niveau des cavéoles, qui sont des régions de la membrane plasmique correspondant à des invaginations membranaires riche en cholestérol, sphingomyéline et surtout cavéoline, la protéine majeure des cavéoles. Elles se retrouvent principalement dans les cellules endothéliales ou les pneumocytes de type 1. La dissociation d'eNOS de son interaction avec les caveolines est une étape précoce de son activation. Les souris déficientes en caveoline-1 présente une diminution de variabilité tensionnelle qui est rapportée à une disponibilité plus importante en NO (242).

A faible concentration, le NO produit par nNOS et eNOS a une fonction de messenger, diffusant de l'endroit où il est synthétisé vers les cellules environnantes où il active la guanylate cyclase synthétisant le GMP cyclique. Il module les niveaux intracellulaires de calcium et a un effet vasodilatateur, neurotransmetteur ou relaxateur du muscle lisse selon la nature de la cellule cible (243). Historiquement, l'activité du NO a été initialement décrite dans le contrôle du tonus vasculaire. Nous allons voir d'abord l'effet du NO sur les vaisseaux et ensuite sur le système respiratoire.

4.2. Effets vasculaires du NO : contrôle du tonus vasculaire et fonction endothéliale

L'endothélium, qui constitue une fine couche cellulaire qui tapisse la surface interne de tous les vaisseaux sanguins de l'organisme, joue un rôle central dans le contrôle de la balance vasoconstriction/vasodilatation et permet l'adaptation vasculaire aux modifications de débit sanguin. L'endothélium permet l'augmentation du diamètre artériel en réponse à l'augmentation du débit sanguin. Ce phénomène appelé dilatation débit-dépendante représente un mécanisme fondamental d'adaptation du diamètre des vaisseaux de gros calibre au débit sanguin.

4.2.1. Mécanotransduction des forces de cisaillement

En effet, l'écoulement sanguin génère une force de cisaillement parallèle à l'axe longitudinal du vaisseau et qui s'exerce à la surface de l'endothélium. Cette force de cisaillement exerce une contrainte mécanique qui est perçue par la cellule endothéliale et qui provoque par l'intermédiaire de mécanismes de mécanotransduction les phénomènes biologiques permettant l'adaptation aiguë et chronique de géométrie vasculaire en réponse aux variations de débit sanguin.

Ces forces de cisaillement qui s'exercent à la surface de l'endothélium constitue un mécanisme d'activation de la NO synthase endothéliale. Il a été montré que l'application d'une force de cisaillement sur les cellules endothéliales entraîne l'activation de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) qui active à son tour la sérine kinase Akt et la protéine kinase A (PKA), responsables de la phosphorylation de la NO-synthase sur le résidu Ser¹¹⁷⁷ et de l'augmentation de la production de NO (244).

4.2.2. Rôle du NO dans le contrôle du tonus vasculaire

Après sa libération par la eNOS, le NO diffuse vers le muscle lisse vasculaire sous-jacent mais également vers la lumière vasculaire. Il se lie aux molécules ayant un noyau ferreux, généralement au sein d'une structure de type héminique. L'action du NO sur le muscle lisse vasculaire s'exerce principalement par une enzyme cytoplasmique, la guanylate cyclase soluble, qui active la transformation de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (245). Le GMPc active une protéine kinase GMPc dépendante ou kinase G (PKG) responsable de la relaxation des cellules musculaires lisses par la phosphorylation de différentes cibles cellulaires (246). La PKG diminue la concentration de calcium intracellulaire, en phosphorylant la protéine Gq, intermédiaire entre le récepteur et la phospholipase C comme en phosphorylant la protéine IRAG (IP3 receptor associated cGMP kinase substrate) qui interagit avec le récepteur de l'IP3 et inhibe la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique (247) (248). Il a été aussi montré que la PKG pouvait phosphoryler le phospholamban, une protéine de la membrane du réticulum sarcoplasmique, qui normalement inhibe l'activité de la calcium ATPase, aboutissant rapidement à la séquestration du calcium intracellulaire dans le réticulum sarcoplasmique (249). Cette diminution du calcium intracellulaire réduit la formation du complexe de la chaîne légère de la myosine avec le calcium et la calmoduline diminuant sa phosphorylation et inhibant la vasoconstriction (250).

Le NO libéré par les cellules endothéliales *in vivo* est à l'origine d'un tonus vasodilatateur permanent au niveau artériolaire qui contribue à la régulation de la pression artériolaire. Ainsi, l'inhibition de la NOS endothéliale, qui se situe sous forme active essentiellement au niveau membranaire, par des analogues structuraux de la L-arginine, comme le L-NMMA s'accompagne d'une diminution des relaxations endothélium-dépendantes observées *in vitro* et *in vivo* (251, 252). De plus leur administration locale s'accompagne d'une vasoconstriction artériolaire (253) et de façon systémique d'une élévation de la pression artérielle (252, 254).

Le rôle du NO dans le contrôle des propriétés mécaniques artérielles reste controversé chez l'homme. Ceci est particulièrement important car les fonctions du système artériel de distribution du sang à la périphérie et d'amortissement de la pulsativité artérielle reposent sur les propriétés mécaniques des artères. Par son action sur le tonus et la trophicité de la paroi artérielle, l'endothélium occupe une place importante dans la régulation du comportement mécanique artériel mais les facteurs endothéliaux impliqués ne sont pas tous connus chez l'homme. L'administration systémique de LNMMA entraîne une augmentation de la rigidité aortique évaluée au moyen de la mesure de la vitesse de propagation de l'onde de pouls carotido-fémorale, suggérant que la libération basale de NO puisse contribuer à la régulation fonctionnelle des propriétés mécaniques artérielles (255). Cependant, l'élévation de la pression artérielle qui accompagne l'administration systémique de LNMMA pourrait être en grande partie responsable de cette augmentation de la vitesse de propagation de l'onde de pouls, même si il

a pu être montré que l'administration intra-artérielle locale de LNMMA s'accompagne d'une augmentation de la rigidité sans modification de la pression artérielle (256, 257).

Si le NO peut avoir un effet immédiat sur les propriétés mécaniques artérielles, il est aussi impliqué dans le remodelage de la paroi artérielle. Il conduit l'angiogenèse sous le contrôle de HIF, la mobilisation de cellules endothéliales progénitrices, la production de VEGF (238).

En plus de ses propriétés vasodilatatrices, le NO exerce de nombreuses fonctions au niveau vasculaire et notamment, une action inhibitrice sur l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium, sur l'agrégation plaquettaire, et sur la prolifération des cellules musculaires lisses qui lui permet de s'opposer au développement de l'athérosclérose (238).

4.2.3. Autres facteurs vasodilatateurs dérivés de l'endothélium

La prostacycline (PGI_2) et les facteurs hyperpolarisant dérivés de l'endothélium (EDHF) sont les deux autres facteurs vasodilatateurs dérivés de l'endothélium. La nature exacte de l'EDHF est controversée et différents EDHF pourraient être libérés par l'endothélium afin de réguler l'activité vasodilatatrice non-NO et non- PGI_2 -dépendante.

4.2.4. Sources non endothéliales de NO au niveau vasculaire, implication de l'hémoglobine

Indépendamment du NO libéré par l'endothélium, l'hémoglobine constitue une source de NO au niveau vasculaire. Dès la description de l'EDRF, il avait été constaté une perte de la relaxation du muscle lisse induite par ce facteur en présence d'hémoglobine, l'hémoglobine se comportant comme un *scavenger* du NO.

Le mécanisme principal de ce phénomène est lié à la S-nitrosylation de l'hémoglobine (qui génère de la SNO-Hb) (258). La S-nitrosylation correspond à une modification des résidus cystéine des protéines conduisant à la génération de S-nitrosothiol. Il s'agit d'un mécanisme de régulation post transcriptionnel de nombreuses protéines. La denitrosylation est possible par plusieurs enzymes comme la S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) ou les thioredoxines.

L'hémoglobine existe sous deux conformations : R (*relaxed*) avec une affinité forte pour l'oxygène, et T (*tense*) avec une affinité faible pour l'oxygène (259). La conformation de l'hémoglobine contrôle la réactivité du résidu cystéine β et sa capacité à fixer le NO. La formation de SNO-Hb est favorisée par la condition oxygénée R alors qu'en configuration T (hypoxie), le groupe NO est libéré au niveau du tissu environnant en induisant une vasodilatation. Ainsi, la perfusion de SNO-Hb n'induit pas de vasodilatation en condition normoxique, alors que la vasodilatation est induite en hypoxie. L'hémoglobine participe à la vasodilatation hypoxique qui constitue une réponse physiologique à la diminution de la

saturation de l'hémoglobine au niveau artériel périphérique au fur et à mesure que l'O₂ est consommé par les tissus (260). La perte de cette vasodilatation hypoxique médiée par l'hémoglobine pourrait participer à certaines situations pathologiques (261).

Par ailleurs, l'hémoglobine pourrait être impliquée dans la production de NO en raison de la présence d'une eNOS érythrocytaire qui module la déformabilité des érythrocytes et inhibe l'activation plaquettaire (262). Elle est située dans la membrane plasmique et le cytoplasme.

4.2.5. Définition de la dysfonction endothéliale et implication dans les pathologies cardiovasculaires

La dysfonction endothéliale correspond à l'altération des fonctions de l'endothélium et la perte ou diminution des capacités d'adaptation du tonus vasculaire en fonction du débit sanguin. Les méthodes cliniques d'évaluation de la fonction endothéliale se sont considérablement développées et il est démontré que la dysfonction endothéliale contribue à la morbidité des maladies cardiovasculaires. De plus, il a été montré de façon prospective que la dysfonction endothéliale constitue un facteur prédictif des accidents cardiovasculaires en particulier chez l'homme hypertendu, coronarien ou insuffisant cardiaque.

4.2.6. Evaluation clinique de la dysfonction endothéliale

La découverte de l'importance de l'endothélium dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire a entraîné le développement des méthodes cliniques de la fonction endothéliale. Ces méthodes ont permis de mettre en évidence la place importante que joue la dysfonction endothéliale dans le développement des maladies cardiovasculaires.

4.2.6.1. Utilisation d'un outil pharmacologique

Elles consistent à étudier le fonctionnement de l'endothélium en mesurant les effets vasomoteurs qui accompagnent l'administration locale de substances agissant par son intermédiaire. Ces dernières, acétylcholine, substance P ou bradykinine, se fixent sur des récepteurs spécifiques situés à la surface de l'endothélium et entraînent la libération dans la lumière vasculaire et au sein de la paroi de facteurs, dont le NO, qui agissent sur les cellules musculaires lisses sous-jacentes en les relaxant. Cette réponse vasomotrice endothélium-dépendante est comparée à celle obtenue après administration d'un donneur exogène de NO comme le nitroprussiate de sodium qui agit directement sur les cellules musculaires lisses. L'administration de ces substances de façon locale, réalisée à des doses qui ne s'accompagnent pas d'effets hémodynamiques systémiques ou de stimulation du système

nerveux central, permet l'étude de l'endothélium dans son environnement physiologique et en l'absence d'éventuels effets confondant liés aux modifications de la pression artérielle ou du tonus neurogène central.

La fonction endothéliale vasomotrice des artères de résistance périphériques est ainsi généralement évaluée par l'effet de ces substances pharmacologiques sur la résistance vasculaire de l'avant bras, calculée au moyen de la mesure du débit local et de la pression artérielle systémique. La mesure du débit sanguin de l'avant-bras est généralement réalisée par pléthysmographie (263, 264). Son principe repose sur la mesure de l'augmentation du volume de l'avant-bras après un arrêt momentané du retour veineux au moyen d'un brassard pneumatique placé au niveau du bras et gonflé à une pression de 40 à 50 mmHg. Cette pression permet l'occlusion veineuse sans modifier la perfusion artérielle. Ainsi, en procédant par brèves occlusions, il est possible d'enregistrer des augmentations de volume du bras qui sont proportionnelles à son débit de perfusion. Le lit vasculaire de la main est exclu par gonflage, à une pression supra systolique, d'un second brassard placé au niveau du poignet, durant la période de mesure du débit de l'avant-bras. Les substances vasodilatatrices sont perfusées grâce à un cathéter disposé dans l'artère radiale. La mesure des variations de volume de l'avant-bras est actuellement réalisée au moyen d'appareils à jauges de mercure permettant la mesure des variations de diamètre de l'avant bras, et le calcul des variations correspondantes de volume.

4.2.6.2. Utilisation d'un stimulus physiologique : la dilatation flux induite (FMD)

Cette méthode repose sur le principe de la dilatation débit dépendante. L'augmentation du débit local est obtenue en abaissant la résistance vasculaire régionale en aval du site de mesure de conductance étudiée.

La mesure la plus utilisée pour la mesure de ces réponses repose sur l'échotracking vasculaire haute résolution car sa précision de mesure est la plus importante (10 μ m).

L'hyperhémie post-ischémique repose sur la diminution de la résistance vasculaire régionale lors de l'ischémie et sur l'hyperhémie qui accompagne sa brusque suppression. La mesure concomitante de diamètre de l'artère de conduction, en amont de la zone ischémique, permet l'étude de la dilatation débit dépendante de ces artères au niveau périphérique chez l'homme. Cette méthode est essentiellement appliquée à l'étude de la dilatation débit-dépendante des artères de conductance des membres supérieurs et inférieurs (265, 266). L'ischémie, réalisée en aval du site de mesure de la dilatation débit-dépendante, est généralement provoquée par la mise en place d'un brassard pneumatique qui est gonflé à une pression supérieure à la pression systolique. Le brassard est disposé au niveau du poignet lors de la dilatation débit-dépendante radiale. Le gonflage du brassard s'accompagne d'une ischémie, responsable d'un

effondrement de la résistance en aval de ce dernier. La tolérance de cette manœuvre est généralement bonne en dépit de durées d'ischémies importantes pouvant atteindre 15 minutes. A la fin de la période d'ischémie, le dégonflage rapide du brassard restaure la continuité entre les segments vasculaires d'amont, à haute résistance, et s'accompagne d'une élévation du débit, caractéristique de l'hyperémie post-ischémique. Le pourcentage maximum d'augmentation du diamètre artériel suivant cette augmentation de débit correspond au pourcentage de dilatation flux induite.

Des représentations photographiques de ces deux méthodes sont disponibles en annexe 1.

Synthèse 5 : Il est depuis longtemps démontré le rôle majeur du NO et de l'endothélium dans le contrôle du tonus vasculaire. Les forces de cisaillement qui s'exercent à la surface de l'endothélium induisent une stimulation de la eNOS conduisant à la production de NO et à une relaxation du muscle lisse. L'altération de cette fonction endothéliale survient précocement dans le développement de l'athérosclérose. La dysfonction endothéliale constitue un facteur prédictif des accidents cardiovasculaires. Son impact au cours de la BPCO et de ses complications cardiovasculaire pourrait être important.

4.3. NO et physiologie du système respiratoire

Depuis la découverte de l'implication du NO dans le contrôle du tonus vasculaire, il a été montré que le NO participait à de nombreux autres processus biologiques, en particulier au niveau du système respiratoire (225).

4.3.1. NO et développement pulmonaire

Une expression spécifique pour eNOS et nNOS survient au cours du développement pulmonaire (267, 268). Dans le poumon fœtal de mouton, l'expression d'eNOS était évidente dans les bronches et l'épithélium proximal, mais était absente dans les bronchioles terminales et respiratoires ainsi que dans l'épithélium alvéolaire (269). L'augmentation d'eNOS dans le poumon fœtal est impliquée dans la croissance pulmonaire et l'angiogenèse qui survient pendant la même période.

Le rôle joué par le monoxyde d'azote (NO) produit par la NO synthase endothéliale (eNOS) au cours de l'angiogenèse a conduit par ailleurs à suspecter un rôle de cette enzyme dans l'alvéologénèse et les processus de réparation à l'âge adulte. L'expression au niveau protéique

de eNOS s'élève d'un facteur 2 dans le poumon restant après pneumonectomie, et les souris dont le gène de eNOS a été inactivé sont caractérisées dans ce modèle par une absence de prolifération cellulaire, un défaut de croissance compensatoire du poumon et une surface alvéolaire inférieure à celle des souris sauvages (270). Ces résultats indiquent qu'eNOS est nécessaire à l'alvéologénèse observée à l'âge adulte chez la souris pneumonectomisée.

4.3.2. NO et iNANC

Le NO est un neurotransmetteur du système iNANC, impliqué dans la relaxation du muscle lisse bronchique. Ainsi, des études d'immunohistochimie ont mis en évidence une expression de nNOS dans les nerfs des voies aériennes humaines (226). Le NO est libéré par les nerfs périphériques par nNOS et il est activé par l'entrée de calcium quand le nerf est dépolarisé (217). Le NO est responsable d'environ la moitié de la réponse bronchodilatatrice du système iNANC, l'autre moitié étant assurée par le neuropeptide VIP (271).

4.3.3. NO et Relaxation du muscle lisse bronchique

La capacité du NO à induire une relaxation du muscle lisse a été décrite dans de multiples modèles et types musculaires, incluant le muscle lisse bronchique. Cependant, l'inhalation de NO n'a pas d'effet bronchodilatateur chez des sujets normaux et atteints de BPCO, alors qu'un faible effet bronchodilatateur existe chez les asthmatiques (272). Cet effet relaxant est lié à l'inhibition de la libération de calcium et à l'activation des canaux Kca via la guanylate cyclase et PKG (273).

4.3.4. NO et circulation pulmonaire

La libération de NO par les cellules endothéliales de la circulation pulmonaire régule le tonus vasculaire et s'oppose à la vasoconstriction hypoxique. Ainsi, la production de NO est diminuée en cas d'hypoxie chronique (274). Le rôle du NO endogène dans le contrôle du tonus vasculaire est confirmé par l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires par la perfusion intra veineuse de LNMMA chez des adultes normaux (275). Chez l'homme, eNOS est présent dans l'endothélium des vaisseaux pulmonaires, mais leur expression diminue chez les patients ayant une hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (276). De manière intéressante, il existe une altération de la libération de NO endothélium dépendante dans les vaisseaux pulmonaires chez les patients atteints de BPCO (277). Il a ainsi été démontré que la surproduction de NO dérivé d'eNOS peut inhiber non seulement l'augmentation de pression ventriculaire droite associée à l'hypertension artérielle, mais aussi le remodelage des vaisseaux pulmonaires et l'hypertrophie ventriculaire droite induites par l'hypoxie chronique (278). De plus, le poumon des

souris caveoline-1 $-/-$ montre un épaississement des septas alvéolaires secondaires à une prolifération incontrôlée des cellules endothéliales, suggérant un rôle important de la caveoline-1 dans relaxation endothélium-dépendent de la vascularisation pulmonaire (279).

4.3.5. NO et sécrétion de mucus

Plusieurs arguments montrent que le NO stimule la sécrétion de mucus par les glandes sous muqueuses (280). De plus, il semblerait que le NO soit nécessaire à l'induction d'une sécrétion de mucine induite par l'histamine et le TNF α (281). De même, la voie des NOS et du NO est impliquée dans la mobilité ciliaire, qui constitue un mécanisme important de défense de l'hôte (282). De manière intéressante, les niveaux de NO expiré et nasal sont bas chez les patients ayant une dyskinésie ciliaire, et sont corrélés avec la dysfonction mucociliaire ; le traitement avec la L arginine, un substrat des NOS, augmente le transport muco ciliaire chez les patients ayant une dyskinésie ciliaire (283). Ces effets du NO sont en particulier liés à son rôle de régulateur des mouvements transépithéliaux d'ions. Le NO active à la fois les canaux apico et baso latéraux via une voie dépendante du CGMP (284).

4.4. Effets physiopathologiques du NO : rôle du peroxy-nitrite.

Ainsi, le NO est un messenger intercellulaire omniprésent au niveau pulmonaire, impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Quoique le NO ait souvent été décrit comme étant très réactif et toxique, ce n'est pas le cas. L'inhalation de NO est recommandée pour traiter l'hypertension pulmonaire persistante chez les nouveaux nés. De même, le NO peut être produit pendant 80 ans par les neurones dans le cerveau humain sans induire aucune toxicité. Paradoxalement, la production de la même molécule peut devenir hautement délétère pour les mêmes neurones en quelques minutes lors de situation pathologiques survenant après une ischémie. Comment cela est-il possible ? La réaction du NO avec l'anion superoxide (O_2^-) conduisant à la production de peroxy-nitrite ($ONOO^-$) est un élément clé pour comprendre ces rôles contrastés du NO en physiologie et pathologie. Ce mécanisme semble particulièrement important au cours des pathologies respiratoires.

4.4.1. Définitions

Nitration : réaction chimique qui permet d'introduire un ou plusieurs groupements nitro $-NO_2$ dans une molécule. Ainsi la nitration de la tyrosine est une modification covalente de la protéine correspondant à l'addition d'un groupement $-NO_2$ à proximité du groupe hydroxyl sur l'anneau

aromatique des résidus tyrosine. La nitration de la tyrosine induit une modification de la structure et de sa fonction de la protéine.

Nitrosylation : modification protéique au cours de laquelle un groupe nitrosyl (R-N=O) est ajouté post-translotionnellement à la protéine. La **S-nitrosylation** est une réaction biologique importante du NO ; elle correspond à la conversion d'un groupe thiol, incluant les résidus cystéines des protéines, pour former du S-nitrosothiols (RSNOs).

4.4.2. Toxicité du NO

A forte concentration, le NO produit par iNOS possède une activité cytotoxique. L'exemple le plus représentatif en conditions physiologiques de cette activité cytotoxique est l'implication du NO dans le *killing* des pathogènes par les macrophages (285) mais celle-ci participe également à de nombreuses situations pathologiques aiguës et chroniques. De même, il a été montré l'importance de cette voie sur la dysfonction diaphragmatique au cours du sepsis dans un modèle animal (286) et chez l'homme (287).

L'implication des NOS et du NO a été démontrée dans plusieurs maladies chroniques dégénératives. On peut citer l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson (243).

4.4.2.1. Mécanisme de la cytotoxicité du NO : le peroxy-nitrite

La réaction du NO avec l'anion superoxide (O_2^-) pour former le peroxy-nitrite ($ONOO^-$), un très puissant oxydant, est l'élément clé pour comprendre le rôle contrasté du NO en physiologie et en pathologie (figure 5).

Ni l'anion superoxide ni le NO ne sont particulièrement toxiques *in vivo* puisqu'il existe des moyens efficaces pour réduire leur accumulation. L'anion superoxide est rapidement dégradé par les superoxides dismutases (SOD) qui sont présentes dans les mitochondries, le cytoplasme et le compartiment extra-cellulaire. Le NO est évacué par une diffusion passive vers les globules rouges où il est converti en nitrate par sa réaction avec l'oxyhémoglobine.

Quand le NO et l'anion superoxide sont produits à proximité, une augmentation modeste de NO et d'anion superoxide d'environ 10 fois chacun multiplie par 100 la formation de peroxy-nitrite. Dans les situations inflammatoires, une augmentation d'un facteur 100 de la production d'anion superoxide et de NO peut être observée, d'où des productions très importantes de peroxy-nitrite (243). Le NO amplifie de plus cette réaction en inhibant la chaîne respiratoire mitochondriale ce qui empêche le transfert des électrons du cytochrome c à la sous-unité I de la cytochrome

oxydase (Cox1), avant leur transfert à l'O₂ comme accepteur final. Cela aboutit à une production accrue d'anion superoxyde et de fait de peroxy-nitrites (288).

La réaction du NO avec l'oxygène produit les composés N₂O₃ et N₂O₄ dégradés secondairement en nitrates et en nitrites. La réaction du NO avec l'anion superoxyde pour produire du peroxy-nitrite serait prioritaire par rapport à la réaction du NO avec l'oxygène (289).

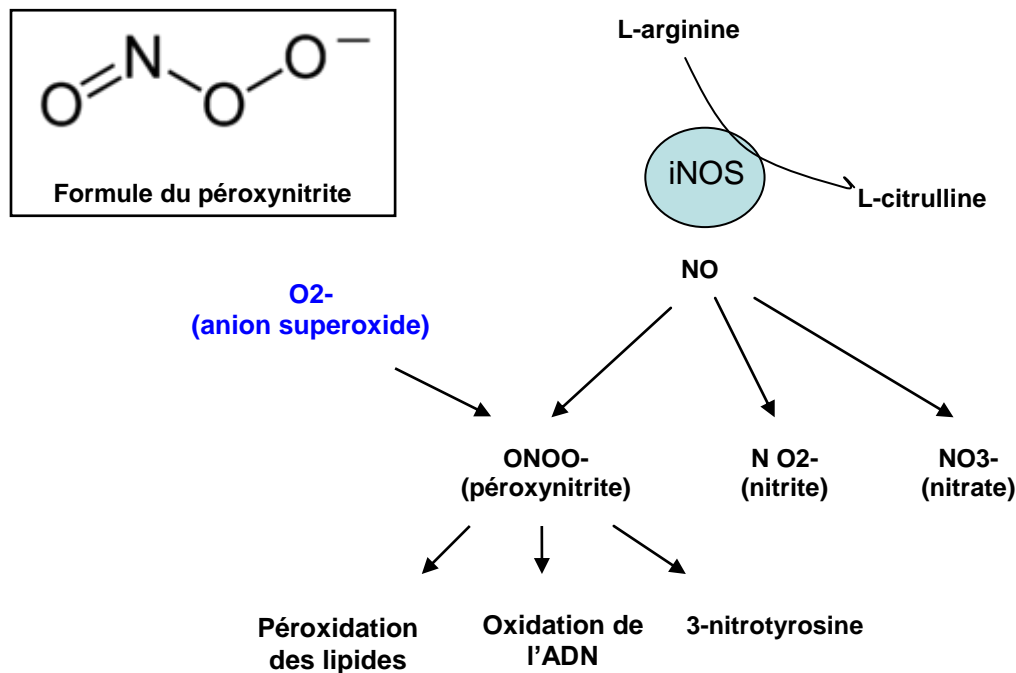


Figure 5: Nitric oxide (NO) et ses dérivés. iNOS = NO synthase inducible.

Les cibles moléculaires du peroxy-nitrite sont les lipides, les acides nucléiques et les protéines. La peroxydation des lipides a surtout une importance au niveau des membranes biologiques dont elle augmente la perméabilité (243). Au niveau de l'ADN, la réaction de la guanine avec les peroxy-nitrites produit la 8 oxo-guanine impliquée dans les processus de mutagénèse et de carcinogénèse (290).

L'interaction du peroxy-nitrite avec les protéines a été la plus étudiée. La dégradation du peroxy-nitrite donne le radical hydroxyl (OH) et le dioxyde d'azote (NO₂) qui réagit avec les résidus tyrosine des protéines pour produire de la 3-nitrotyrosine. La nitration de la tyrosine modifie la structure et la fonction de la protéine. Par exemple, la nitration du résidu tyrosine de la Mn-SOD mitochondriale induit une inactivation complète de cette enzyme (291), diminuant la dégradation de l'anion superoxyde et favorisant encore la génération de peroxy-nitrites dans les mitochondries (figure x).

4.4.2.2. Conséquences de la nitration des protéines

Une implication de la nitration des protéines dans l'inflammation, la dégradation de la matrice extracellulaire et la mort cellulaire a été démontrée *in vitro*, chacun de ces processus étant impliqués dans le développement l'emphysème.

L'effet pro-inflammatoire de la nitration des protéines passe par l'activation de NFκB, un facteur de transcription crucial dans l'activation des gènes de l'inflammation. Matata et al. rapportent une activation de NFκB dans des cellules mononuclées exposées à de faibles doses de peroxy-nitrites, suivie de la production de TNF-α et d'IL-6. La nitration de la tyrosine-42 sur IκB pourrait augmenter sa dégradation et libérer ainsi NFκBn (292).

La nitration des MMP induit l'activation de MMP-9 dans les neurones (293) et de MMP-2 dans les cellules musculaires lisses vasculaires (294). Ainsi, la toxicité des peroxy-nitrites sur le myocarde implique l'activation de MMP-2 (295). De même, comme les radicaux libres de l'oxygène, la nitration de la tropoélastine empêche l'assemblage des fibres élastiques (95).

La nitration des protéines a aussi été impliquée dans les phénomènes de mort cellulaire programmée et d'apoptose. La nitrosylation du cytochrome c entraînerait sa libération des mitochondries vers le cytosol, activant la voie intrinsèque de l'apoptose. Cependant, le rôle de la nitrosylation protéique est controversé dans l'apoptose, la nitrosylation des caspases pouvant avoir des effets pro- ou anti-apoptotiques (296).

Synthèse 6 : Le NO produit par les NOS est un messenger intercellulaire omniprésent au niveau pulmonaire, impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Il régule notamment le développement pulmonaire, la circulation pulmonaire, le tonus musculaire lisse bronchique et module la sécrétion de mucus. Cependant, il est aussi consommé dans la réaction conduisant la formation de peroxy-nitrites à partir de l'anion superoxyde et du NO. La nitration des protéines secondaire à la formation de peroxy-nitrite participe à de nombreux processus pathologiques et elle pourrait participer au déséquilibre de la balance protéase/antiprotéase, à l'excès d'inflammation et d'apoptose induite par la fumée de cigarette et participant au développement de l'emphysème. Il semble donc difficile de prédire le rôle des NOS et du NO lors de situation pathologique comme l'emphysème.

4.5. Rôle du NO au cours de la BPCO

4.5.1. Rôle du NO et des NOS dans l'atteinte pulmonaire de la BPCO

Si le NO et les NO synthases sont particulièrement impliqués dans la physiologie respiratoire ou la genèse de certaines pathologies respiratoires, ils existent plusieurs arguments en faveur d'une modulation de ces différents mécanismes au cours de la BPCO et d'une mise en jeu des différentes NOS, sans que nous puissions d'emblée définir leurs rôles respectifs.

4.5.1.1. NO exhalé

L'air exhalé chez l'homme contient des quantités décelables de NO, mesurées avec des analyseurs de chemiluminescence. Les niveaux de NO exhalé sont déterminés par 1) la production de NO par les diverses cellules des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire, 2) la diffusion du NO à l'intérieur de la circulation capillaire 3) la ventilation alvéolaire et les débits bronchiques. Il est possible de déterminer le niveau de NO de ces deux compartiments, bronchiques ou alvéolaire.

Contrairement à ce qui est observé dans l'asthme, les niveaux de NO exhalés sont moins élevés au cours de la BPCO et peuvent être réduits par la fumée de cigarette (225, 297). Les fumeurs actifs (298) et les patients présentant une BPCO sévère (particulièrement avec un cœur pulmonaire chronique) (299) montrent des niveaux de NO expirés inférieurs à ceux des anciens fumeurs et des formes modérées. Cependant, une augmentation du NO expiré a été rapportée chez des patients hospitalisés pour une exacerbation (300). Le NO expiré n'est pas modifié par le traitement par corticoïdes inhalés, confirmant que l'induction du NO implique des voies probablement différentes de celles impliquées au cours de la maladie asthmatique (301).

Une étude plus récente suggère que les sources de NO expiré sont situées dans le poumon périphérique. En effet, quoique le NO bronchique soit normal ou bas chez les patients présentant une BPCO, il y a une augmentation du NO généré par les voies aériennes distales et les alvéoles, corrélée à la sévérité de la maladie (5). Les sources de production du NO périphérique sont encore peu connues, même si l'induction des NO synthases paraît une explication logique.

4.5.1.2. Péroxynitrites et nitrosylation des protéines chez l'homme

Des protéines nitrosylées sont détectées par immunomarquage dans les leucocytes obtenus par expectoration induite chez les sujets emphysémateux par rapport aux asthmatiques et aux

sujets sains (302). Le taux de nitrotyrosine mesuré par ELISA dans le lavage bronchoalvéolaire est plus élevée chez les sujets BPCO par rapport aux fumeurs sans trouble ventilatoire obstructif et aux non fumeurs (303). Directement, le peroxy-nitrite mesuré dans le condensat d'air expiré est plus élevé chez les patients avec BPCO que chez des fumeurs ou des volontaires sains (304).

4.5.1.3. Expression et localisation spécifiques des NOS dans le poumon des patients emphysémateux

Peu d'études décrivent la localisation des NO synthases dans le poumon des patients présentant une BPCO ou un emphysème. Une première a montré une augmentation de l'expression d'iNOS dans les cellules de la paroi alvéolaire des patients présentant un emphysème sévère, ces cellules correspondant à aux pneumocytes de type 2 (6). La corrélation entre la nitration des protéines et l'expression d'iNOS pouvait suggérer qu'iNOS était à l'origine du NO nécessaire à la production de peroxy-nitrite. Une étude plus récente a montré que l'expression en ARN et en protéine de iNOS et nNOS dans le tissu pulmonaire périphérique était augmenté chez les sujets présentant une BPCO, contrairement à l'expression d'eNOS qui était effondrée (305). Contrairement à ce qui aurait pu être attendu, l'expression d'nNOS était inversement corrélée au VEMS.

4.5.1.4. Apport des modèles animaux

Peu d'études animales se sont intéressées au rôle des NOS et du NO dans les modèles animaux d'emphysème. Le 1400W, un inhibiteur spécifique d'iNOS prévient l'afflux de cellules inflammatoire dans le poumon des souris SpD^{-/-} qui présentent un emphysème spontané. Cependant, l'effet du 1400W sur les lésions d'emphysème n'est pas décrit dans cette étude (306). De manière plus intéressante, les souris caveoline^{-/-}, qui devrait présenter une activité d'eNOS plus importante, sont protégées de l'emphysème induit par la fumée de cigarette (307), quoique le rôle d'eNOS ne soit pas exploré dans cette étude.

De même, le traitement par statines est associé à une augmentation de l'expression d'eNOS et à une prolifération des cellules épithéliales alvéolaires chez les souris présentant un emphysème induit par l'élastase (308).

Synthèse 7 : Plusieurs éléments suggèrent un rôle pour le NO et pour les NOS dans le développement de l'emphysème pulmonaire. Une augmentation du niveau de NO alvéolaire expiré a été observée chez les patients présentant une BPCO sévère, alors qu'un excès de nitration des protéines a été observé dans les voies aériennes de ces patients. De même,

l'expression d'iNOS est augmentée et corrélée avec le niveau de nitration des protéines dans les parois alvéolaires des patients avec un emphysème pulmonaire. Cependant, quoiqu'il existe une augmentation de ces marqueurs de stress nitrosatif dans le poumon des patients emphysémateux, la relation entre la production d'espèces réactives de l'azote et le développement de l'emphysème n'a pas été démontrée. Aucune étude n'a été conduite dans des modèles animaux pour le mettre en évidence.

4.5.2. Rôle du NO et des NOS au niveau vasculaire au cours de la BPCO

Contrairement à ce qui a pu être réalisé dans d'autres pathologies respiratoire (309), l'expression et l'activité des NOS dans l'endothélium systémique n'a jamais été évaluée chez les patients BPCO à notre connaissance. Au niveau vasculaire, la libération de NO par eNOS a été évaluée de manière indirecte en mesurant la dysfonction endothéliale avec différentes techniques. Peu d'études sont disponibles sur l'expression des NOS au niveau endothélial, la disponibilité en NO et la genèse de l'athérosclérose chez la souris exposées à la fumée de cigarette ou à l'élastase (310) (311).

4.5.2.1. BPCO et FMD

La FMD rend compte de manière plus évidente de la dysfonction endothéliale et de la disponibilité en NO au niveau de l'endothélium. Il existe clairement une altération de la FMD au cours de la BPCO (9-11). Cette dysfonction est corrélée à la sévérité de l'obstruction bronchique (9) et au degré d'emphysème (10). L'inflammation systémique, la glycémie et le niveau du VEMS sont les facteurs déterminants de la FMD chez ces patients (10). L'impact de l'hémoglobine n'a pas été évalué dans cette étude.

4.5.2.2. BPCO et Plethysmographie d'occlusion veineuse

A l'inverse, la réponse aux facteurs endothélium dépendant et endothélium indépendants en pléthysmographie d'occlusion veineuse n'est pas altérée chez les patients présentant une BPCO par rapport à des sujets contrôles fumeurs (12).

4.5.2.1. Une rigidité artérielle accrue

Le NO intervient sur les propriétés mécaniques artérielles. Celles-ci peuvent être évaluées par la vitesse de propagation de l'onde pouls qui rend compte de la rigidité artérielle. L'augmentation de la rigidité artérielle évaluée est bien établie au cours de la BPCO (312, 313) (314). Elle n'est

pas seulement attribuable au tabagisme, les patients BPCO étant comparés à des témoins fumeurs sans BPCO. Cependant, elle n'est pas nécessairement liée à une dysfonction endothéliale et d'autres mécanismes peuvent en être à l'origine. Ainsi, la corrélation de la vitesse de propagation de l'onde de pouls avec le degré d'emphysème évalué sur des coupes scannographiques a pu faire évoquer une susceptibilité commune à la dégradation de du tissu conjonctif et de l'élastine au niveau alvéolaire et au niveau vasculaire (314).

4.5.2.2. Apport des modèles expérimentaux

Talukder et al. ont montré récemment que l'exposition à la fumée de cigarette induisait chez la souris une dysfonction endothéliale, une hypertension artérielle, une production accrue d'anion superoxide, une diminution de la disponibilité en NO, mais cette étude ne montre pas le rôle respectif des différentes NOS dans ce processus (311). Une autre étude montre que l'exposition à la fumée de cigarette des souris induit iNOS dans l'endothélium de la carotide, associé à une production accrue d'anion superoxide. L'inactivation d'iNOS pharmacologique ou génétique prévient l'augmentation de production d'anion superoxide et le développement de l'athérosclérose (310). In vitro, eNOS préviendrait l'apoptose de cellules endothéliales aortiques de l'apoptose induite par la fumée de cigarette (315). Cependant, ces études ne montrent pas l'effet propre du remodelage bronchique ou de l'emphysème sur ces processus vasculaires.

Synthèse 8 : Il existe une dysfonction endothéliale bien documentée au cours de la BPCO, corrélée à la sévérité de la maladie et au degré d'emphysème. Cependant le rôle de l'hémoglobine et l'impact de la polyglobulie sur la fonction endothéliale n'ont jamais été évalués chez les patients BPCO. Notre hypothèse est que la polyglobulie pourrait améliorer la fonction endothéliale chez ces patients. Elle induit une augmentation de la viscosité sanguine et les forces de cisaillement qui est le principal déterminant de la libération basale de NO par l'endothélium.

Au total, quoique plusieurs arguments suggèrent une mise en jeu de la voie des NOS et du NO au cours de l'emphysème, il n'a pas été déterminé si il s'agit d'un d'un épiphénomène ou d'un phénomène déterminant dans le développement des lésions pulmonaires qui caractérisent cette maladie. En ce qui concerne l'atteinte vasculaire périphérique associée à la maladie pulmonaire, ses mécanismes physiopathologiques restent encore méconnus, même si une dysfonction endothéliale a clairement été démontrée au cours de la BPCO. Le rôle de la polyglobulie, complication de la maladie à son stade hypoxique, et de l'augmentation de la viscosité sanguine associée, sur la libération de NO par l'endothélium et la fonction endothéliale n'est à ce jour pas connu.

5. Hypothèses et objectifs

La première hypothèse de ce travail est que les NOS, le NO et la nitration des protéines moduleraient le développement de l'emphysème en interagissant avec les mécanismes à l'origine de cette maladie, comme l'inflammation, l'activité des protéases et l'excès de stress oxydatif.

La deuxième hypothèse est que la polyglobulie induirait une augmentation de la libération de NO par eNOS au niveau de l'endothélium ce qui permettrait d'adapter le tonus vasculaire à l'augmentation de viscosité sanguine et des forces de cisaillement qu'elle induit chez des patients BPCO hypoxiques.

5.1. Etude 1, *in vivo*

Le premier objectif de ce travail était de déterminer dans le modèle d'emphysème induit par l'instillation trachéale d'élastase chez la souris si les différentes NOS avait un rôle dans le développement de l'emphysème:

- Déterminer le niveau d'expression et la localisation cellulaire de nNOS, iNOS, eNOS ainsi que l'extension de la nitration des protéines au sein de la paroi alvéolaire après une instillation d'élastase
- Déterminer si l'inactivation d'iNOS ou d'eNOS influençait les marqueurs de stress oxydant ou nitré, l'inflammation, l'activité protéasique et le développement de l'emphysème suivant l'instillation d'élastase

5.2. Etude 2, clinique

Le deuxième objectif de ce travail était de déterminer si la polyglobulie secondaire à l'hypoxémie en modifiant la viscosité sanguine, les forces de cisaillement et la libération de NO par l'endothélium pouvait influencer la fonction endothéliale chez des patients BPCO.

Il s'agissait de déterminer chez des patients polyglobuliques comparés à des non polyglobuliques de même degré d'obstruction et d'hypoxémie si :

- La viscosité sanguine, les forces de cisaillement et le diamètre artériel au repos était modifiés chez les patients polyglobuliques
- La vasodilatation endothélium dépendante évaluée par le test d'hyperhémie était plus importante chez les patients polyglobuliques

- La réponse du flux sanguin de l'avant bras mesuré par pléthysmographie d'occlusion veineuse aux vasodilatateurs dépendants et indépendants de l'endothélium était modulée par le niveau d'hémoglobine
- La perfusion d'un inhibiteur des NO synthase, le L-arginine analog N-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) permettait de déterminer l'effet vasculaire de la libération de NO basal.

Par ailleurs, nous avons examiné une plus large cohorte de patients avec BPCO pour déterminer l'effet de la polyglobulie sur le statut fonctionnel.

6. Résultats

6.1. Rôle des NO synthases au cours de l'emphysème induit par l'élastase

Publication

Laurent Boyer, Laurent Plantier, Maylis Dagouassat, Sophie Lanone, Delphine Goven, Philippe Caramelle, François Berrehar, Stéphane Kerbrat, Anh-Tuan Dinh-Xuan, Bruno Crestani, Sabine Le Gouvello, Jorge Boczkowski,

Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema.

Lab Invest. 2011 Mar;91(3):353-62. PMID:20956973

Résumé

Introduction

Le NO en combinaison avec l'anion superoxide produit du peroxy-nitrite et induit la nitration des protéines, qui participe à la physiopathologie de nombreuses maladies dégénératives. Le NO est produit à un niveau important dans le poumon emphysémateux, mais son rôle dans la maladie n'est pas connu. L'objectif de cette étude était de déterminer si les NO synthases contribuaient au développement de l'emphysème induit par l'élastase chez la souris.

Méthodes

nNOS, iNOS et eNOS ont été quantifiées et immuno localisées dans le poumon après instillation d'élastase. Pour déterminer si eNOS ou iNOS avait un rôle dans le développement de l'emphysème, des souris présentant une délétion du gène d'iNOS ou d'eNOS et des souris traitées avec un inhibiteur pharmacologique d'iNOS ont reçu de l'élastase. La nitration protéique a été déterminée par immunofluorescence, l'oxydation des protéines par ELISA. L'inflammation et l'activité des MMP ont été quantifiées par comptage cellulaire, RT-PCR et zymographie dans le lavage broncho alvéolaire. La prolifération cellulaire a été déterminée par un immunomarquage pour Ki67. L'emphysème a été quantifié morphométriquement.

Résultats

iNOS et eNOS étaient surexprimées de manière diffuse dans le poumon des souris élastase et une augmentation de 12 fois du nombre de cellules exprimant la 3-nitrotyrosine était observé. Plus de 80% de ces cellules étaient des pneumocytes de type 2. Dans le poumon des souris instillées par de l'élastase, l'inactivation d'iNOS réduisait la nitration des protéines et augmentait l'oxydation des protéines, mais n'avait pas d'effet sur l'inflammation, l'activité des MMP, la prolifération cellulaire ou le développement de l'emphysème. L'inactivation d'eNOS n'avait pas d'effet.

Conclusion

Dans le poumon lésé par l'élastase, iNOS induit la nitration des protéines dans les pneumocytes de type 2 et tempère l'agression oxydative. Ni eNOS ni iNOS ne sont nécessaires pour le développement de l'emphysème induit par l'élastase.

Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema

Laurent Boyer^{1,2,3}, Laurent Plantier^{4,5}, Maylis Dagouassat¹, Sophie Lanone¹, Delphine Goven⁴, Philippe Caramelle¹, François Berrehar⁶, Stéphane Kerbrat¹, Anh-Tuan Dinh-Xuan⁷, Bruno Crestani^{4,5,8}, Sabine Le Gouvello^{1,2,6} and Jorge Boczkowski^{1,2,9}

Nitric oxide (NO) in combination with superoxide produces peroxynitrites and induces protein nitration, which participates in a number of chronic degenerative diseases. NO is produced at high levels in the human emphysematous lung, but its role in this disease is unknown. The aim of this study was to determine whether the NO synthases contribute to the development of elastase-induced emphysema in mice. nNOS, iNOS, and eNOS were quantified and immunolocalized in the lung after a tracheal instillation of elastase in mice. To determine whether eNOS or iNOS had a role in the development of emphysema, mice bearing a germline deletion of the eNOS and iNOS genes and mice treated with a pharmacological iNOS inhibitor were exposed to elastase. Protein nitration was determined by immunofluorescence, protein oxidation was determined by ELISA. Inflammation and MMP activity were quantified by cell counts, RT-PCR and zymography in bronchoalveolar lavage fluid. Cell proliferation was determined by Ki67 immunostaining. Emphysema was quantified morphometrically. iNOS and eNOS were diffusely upregulated in the lung of elastase-treated mice and a 12-fold increase in the number of 3-nitrotyrosine-expressing cells was observed. Over 80% of these cells were alveolar type 2 cells. In elastase-instilled mice, iNOS inactivation reduced protein nitration and increased protein oxidation but had no effect on inflammation, MMP activity, cell proliferation or the subsequent development of emphysema. eNOS inactivation had no effect. In conclusion, in the elastase-injured lung, iNOS mediates protein nitration in alveolar type 2 cells and alleviates oxidative injury. Neither eNOS nor iNOS are required for the development of elastase-induced emphysema.

Laboratory Investigation (2011) 91, 353–362; doi:10.1038/labinvest.2010.169; published online 18 October 2010

KEYWORDS: inflammation; nitrosative stress; oxidative stress; pulmonary emphysema

Free radical toxicity is one of the main contributors to the development of pulmonary emphysema, a frequent chronic degenerative disease of the lung characterized by reduced maximal expiratory flow, increased lung volume, and alveolar wall destruction. This phenomenon has been well demonstrated with regard to the role of reactive oxygen species, and in particular the superoxide anion^{1–3} pertaining to the concept of oxidative stress. By analogy, a similar role has been suspected to be played by nitrogen reactive species, and in particular by nitric oxide (NO), pertaining to the concept of nitrosative stress.

NO is the principal reactive nitrogen species encountered *in vivo*. It is produced from L-arginine by the neuronal,

endothelial, and inducible isoforms of the NO synthase (nNOS, iNOS, and eNOS). In addition to its multiple physiological properties, NO at high concentrations exerts toxicity through its combination with superoxide anion to form peroxynitrite (ONOO^{•-}). ONOO^{•-} in turn induces nitration of lipids, nucleic acids, and proteins, distorting their structure and altering their function. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity has a key role in the pathogenesis of a number of chronic degenerative diseases of the brain, heart, and liver.⁴

Several clues suggest a role for NO and the NOS in the course of pulmonary emphysema. Increased levels of alveolar NO are measured in patients with severe chronic obstructive

¹INSERM, Unité U955, Créteil, France; ²Université Paris Est, Faculté de Médecine, UMR U955, Créteil, France; ³AP-HP, Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, Service de Physiologie Explorations Fonctionnelles, Créteil, France; ⁴INSERM, Unité U700, Paris, France; ⁵Université Paris 7, Faculté de Médecine Xavier Bichat, UMR U700, Paris, France; ⁶AP-HP, Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, Service d'Immunologie Biologique, Créteil, France; ⁷AP-HP, Groupe Cochin Saint Vincent de Paul, Service de Physiologie Explorations Fonctionnelles, Université Paris Descartes, Paris, France; ⁸AP-HP, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie, Paris, France and ⁹Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service de Pneumologie, Créteil, France

Correspondence: Dr L Boyer, MD, INSERM, Unité U955, Faculté de Médecine, 8 rue du Général Sarrail, Créteil 94000, France.

E-mail: laurent.boyer@hmn.aphp.fr

Received 4 November 2009; revised 13 August 2010; accepted 30 August 2010

pulmonary disease,⁵ whereas protein nitration is detected in the airway of such patients.⁶ In line with these results, the expression of iNOS is exaggerated and is correlated with the extent of protein nitration in the alveolar walls of patients with pulmonary emphysema.⁷ However, although markers of nitrosative stress are present in the lung of patients with emphysema, leading some authors to suggest a role for this phenomenon in the process of disease^{6,8–10}; the relationship between nitrosative stress and the development of emphysema is unknown.

To clarify this point, we sought to determine whether NOS isoforms had a role in an animal model of emphysema. First, we determined the level of nNOS, iNOS, and eNOS expression as well as the extent of protein nitration in the lung of mice after a tracheal instillation of elastase, a well-documented model of experimental emphysema. Second, we determined whether inactivation of iNOS or eNOS influenced markers of nitrosative and oxidative stress, inflammation, protease activity and the development of emphysema in the lung following elastase instillation.

MATERIALS AND METHODS

Animal Model

Male 8-week-old mice of C57BL/6 background were anesthetized and received a tracheal instillation of saline or 5 U of porcine pancreatic elastase (EC134, Elastin Products, Owensville, MO, USA) as previously described.¹¹ In some experiments, iNOS^{-/-} and eNOS^{-/-} animals were used, with wild-type C57BL/6 mice as controls (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). In other experiments, wild-type mice (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) were treated subcutaneously with two injections of 10 mg/kg (20 mg/kg/day) *N*-3-aminomethyl-benzyl-acetamidine-dihydrochloride (1400W, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), a specific iNOS inhibitor,¹² from the day before tracheal instillation to the day they were killed, whereas control mice received saline injections. Another experiment was conducted with daily 1400W at 1 mg/kg/day. In other experiments, Balb/c mice (Janvier) were used. Studies were conducted in compliance with INSERM guidelines regarding the fair treatment of animals, under a license from the French administration to conduct animal research as described in the protocol.

Determination of nNOS, iNOS, and eNOS mRNA and Protein Levels in Lung Homogenate

Total mRNA was prepared from the crushed lung of the different mice, using RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, ZA Courtaboeuf, France) following the manufacturer's protocol. First-strand cDNA was synthesized in RT samples, each containing: 2.5 µg total RNA isolated from cells, 8 U/µl M-MLV reverse transcriptase (Gibco-BRL, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 4 µM Oligo-(dT) 12–18 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), and 0.8 mM mixed dNTP (GE Healthcare, Saclay, France). Quantitative PCR was performed in a 7900HT Real-Time PCR system (Applied

Biosystems, ZA Courtaboeuf, France), using Fast SYBR Master Mix from Applied Biosystems. The sequences of primers are indicated in Supplementary Table 1. Normalization was achieved by quantification of the expression of either CXXC1 or ribosomal protein 13 mRNA (RPL13) as described previously,¹¹ chosen as control housekeeping genes (HKG) among four HKG tested because of their stable expression in the different conditions of the experiment (KO iNOS and 1400W-treated mice with or without tracheal instillation of elastase), and/or their adequate expression level as compared with the considered target gene. All PCR conditions were adjusted in order to obtain equivalent optimal amplification efficiency between the different assays. Mice's lung mRNA expression were quantified by relative quantification ($\Delta\Delta$ CT method) according to Pfaffl *et al*¹³ using an equal mix of each cDNA sample from the different mice's lung, as calibrator sample. All PCR experiments were done in triplicate.

iNOS, nNOS, and eNOS lung protein levels were determined at day 7 after instillation by western blot analysis using 100 µg protein with antibodies binding iNOS (VPA5382 Abcys, Paris, France), eNOS and nNOS (610296 and 610309, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA) diluted 1/1000. β -Actin (A2228, Sigma, St Louis, MO, USA) was used as an internal control.

Localization of iNOS and eNOS Expression in the Lung

The expression of iNOS and eNOS was localized by confocal microscopy on 5 µm-thick frozen lung sections permeabilized with 0.1% Triton \times 100 (Sigma) using rabbit anti-iNOS (VPA5382, Abcys, diluted 1/500 for 1 h at 37°C) and anti-eNOS (610298, BD Transduction Laboratories, diluted 1/25 for 1 h at 37°C) antibodies, with normal rabbit serum (Vector, Peterborough, UK) as a control, revealed with a goat Alexa fluor 546-conjugated anti-rabbit secondary antibody (A11010, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Alveolar type 2 cells were localized with a rabbit anti-proSFTPC antibody (AB3786, Chemicon, Temecula, CA, USA, diluted 1/250 for 1 h at 37°C) and revealed with the Zenon Rabbit IgG Labeling Kit Alexa fluor 488 (Z-25302, Molecular Probes). Macrophages were detected with a rat anti-MAC3 antibody (550292, BD Pharmingen, diluted 1/750 for 1 h at room temperature) and revealed with a goat Alexa fluor 488-conjugated anti-rat secondary antibody (A-11006, Molecular Probes). Nuclei were stained with TO-PRO-3 (Molecular Probes). Slides were examined with an LSM-510-META confocal laser scanning microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Quantification and Localization of Nitrated Proteins in the Lung

The accumulation in the lung of 3-nitrotyrosine, a marker of protein nitration, was determined by immunofluorescence microscopy on frozen lung sections using a rabbit anti-3-nitrotyrosine polyclonal antibody (05-233, Upstate

biotechnology, Temecula, CA, USA, diluted to 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 1 h at 37°C) and revealed with a goat Alexa fluor 546-conjugated anti-rabbit secondary antibody (A11010, Molecular Probes). The accumulation of 3-nitrotyrosine in the lung was quantified by counting the number of 3-nitrotyrosine-expressing cells in 10 microscopic fields per slide at $\times 20$ magnification using a Zeiss Axiophot fluorescence microscope.

Double immunostaining confocal microscopy experiments were performed as described above to determine the type of 3-nitrotyrosine-expressing cells. The number of double-stained cells was reported to the number of proSFTPC-positive or MAC3-positive cells and was expressed as a percentage.

Quantification of Oxidative Stress Markers in the Lung

Oxidized protein levels were determined in total lung homogenate by ELISA using the OxiSelect Protein Carbonyl ELISA kit (STA-310, Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). Heme Oxygenase 1 (HO1) mRNA was quantified in lung homogenate by RT-PCR as described above. The sequences of primers are indicated in Supplementary Table 1.

Quantification of Pulmonary Inflammation and Protease Activity

The intensity of the pulmonary inflammatory reaction was assessed in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Lungs were lavaged with 2 ml saline, and cells were differentially counted with the Diff-Quick stain (Baxter-Dade AG, Dudinggen, Germany). The concentration in BALF of the chemo-attractant chemokine CCL2 was determined by ELISA (R&D Systems, Lille, France). Gelatin zymography was performed on BALF as described previously.¹¹ To explore the effect of iNOS inactivation on the mechanisms driving lung inflammation in this model, we quantified the expression of CCL2, CXCL2, tumor necrosis factor- α (TNF α), and interleukin-6 (IL6) mRNAs normalized by CXXC1 mRNA, as described above. The sequences of primers are indicated in Supplementary Table 1. CCL2 protein levels were determined in BALF by ELISA (R&D Systems).

Determination of Ki67 Expression in the Lung

The accumulation in the lung of Ki67, a cell cycle related nuclear protein expressed by proliferating cells, was determined by immunohistochemistry on frozen lung sections using a rabbit ki67 polyclonal antibody (Ab66155, Abcam, MA, USA, diluted 1/300, overnight at 4°C) and revealed with the Vectastain ABC-peroxydase kit system (PK 4001, Vector Laboratories, CA, USA). The number of Ki67-positive cells was counted in 10 microscopic fields at $\times 20$ magnification and expressed as a percentage.

Morphological Analysis

The lungs were fixed with 2.5% glutaraldehyde at a transpleural pressure of 25 cmH₂O for 3 h and held in 4%

paraformaldehyde (Sigma). Great-axis sagittal sections (5 μm) of the left lung were cut in a systematic manner and were stained with hematoxylin and eosin. Five black-and-white digital photomicrographs were acquired from the cranial, medial, and caudal regions of each slide at $\times 100$ magnification, excluding areas where large bronchi or vessels predominated, resulting in a total of 15 images per lung. Emphysema was then quantified by measurement of the mean chord length of alveoli with Analysis software (Soft Imaging System, Münster, Germany) at a 5- μm interval. This automated analysis was made vertically and horizontally on each photomicrograph. The mean chord length of alveoli was obtained by averaging those measurements.¹¹

Statistical Analysis

Data were expressed as means \pm s.e. and were analyzed with GraphPad Prism 4.0 (La Jolla, CA, USA). Comparisons between multiple groups were performed with Kruskal–Wallis' non-parametric analysis of variance test followed when a difference was detected by two-by-two comparisons with Mann–Whitney's *U* test. *P*-values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Elastase Induced the Pulmonary Expression of iNOS and eNOS

Elastase instillation induced a marked increase in lung iNOS mRNA (Figure 1a). This increase was present from day 1 post-instillation, reached a maximum on day 7, and persisted to day 20. This increase in iNOS mRNA in elastase-treated mice translated into a 433% increase in the pulmonary content of iNOS protein as assessed by western blotting in lung homogenate at day 7 ($P = 0.002$).

In comparison to control mice, eNOS mRNA was significantly increased in the lungs of elastase-treated mice from day 1 to day 20, peaking at day 1 and decreasing thereafter (Figure 1b). Accordingly, a 380% increase in eNOS protein was observed in the lung of those animals at day 7 ($P = 0.016$).

Lung nNOS mRNA was decreased at days 1 and 7 following elastase instillation (Figure 1c). nNOS protein levels in lung homogenate of those mice were similar to those observed in control animals.

Confocal microscopy analysis was performed to determine which cell types were responsible for the increased expression of eNOS and iNOS in the elastase-injured lung. iNOS and eNOS were expressed at low levels in the lungs of control mice. In elastase-induced mice, iNOS was diffusely expressed in alveolar walls. Colocalization experiments showed that iNOS was expressed by $80.5 \pm 7.8\%$ of macrophages, identified by MAC3 staining, as well as $42.3 \pm 8.6\%$ of alveolar type 2 cells, identified by proSFTPC staining (Figure 2). Likewise, eNOS expression was diffuse and involved both macrophages and alveolar type 2 cells (respectively, $81.5 \pm 0.7\%$ and $14.7 \pm 4.8\%$ of these cells expressed eNOS).

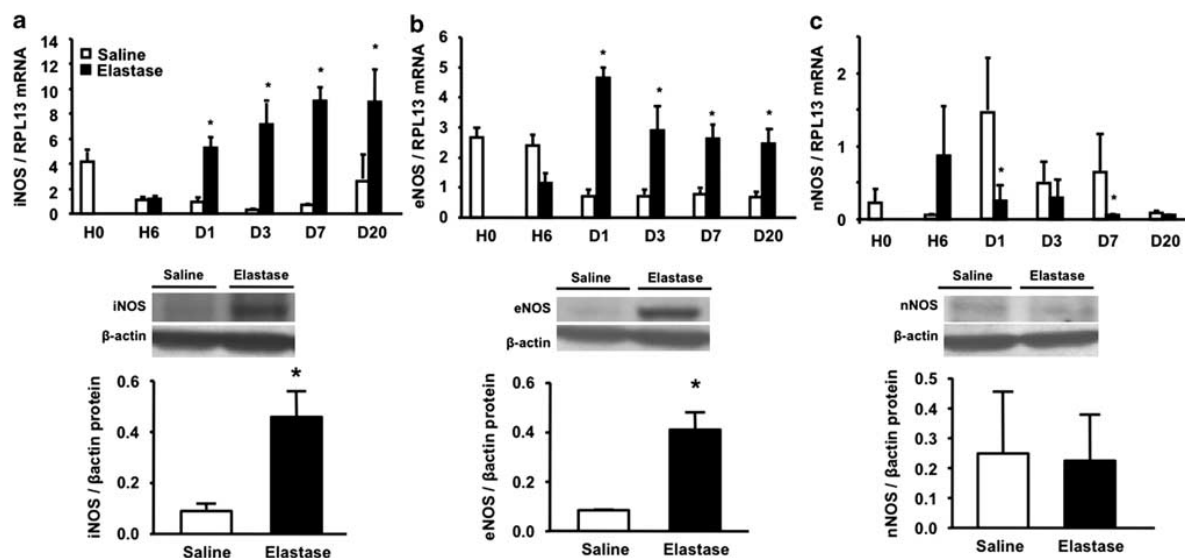


Figure 1 Pulmonary expression of iNOS, eNOS, and nNOS at day 7 after elastase instillation. Expression of iNOS (a), eNOS (b), and nNOS (c). (Upper panels) iNOS, eNOS, and nNOS mRNA in lung homogenate before (H0), 6 h (H6), and 1, 3, 7, and 20 days (D1, D3, D7, and D20) after a tracheal instillation of saline solution (open bars) or elastase (filled bars), reported to RPL13 mRNA, $n = 5$. (Lower panels) iNOS, eNOS, and nNOS protein reported to β -actin protein in lung homogenate at day 7 after elastase instillation. Representative western blot experiment and densitometric measurements, $n = 5$. Mean \pm s.e. * $P < 0.05$ vs saline.

Elastase Induced the Accumulation of Nitrated Proteins in Alveolar Type 2 Cells

To determine whether pulmonary overexpression of NO synthase was accompanied by nitrosative stress in this model, nitration of lung proteins was detected by immunofluorescence at day 7 after elastase instillation. Quantitatively, elastase induced a 1100% increase in the number of 3-nitrotyrosine-positive cells in the lung ($P = 0.029$, Figure 3a and b). In elastase-instilled mice, 3-nitrotyrosine was detected mainly in the cytoplasm of cells bearing the morphological characteristics of alveolar type 2 cells, and colocalization experiments by laser confocal microscopy confirmed that the majority of 3-nitrotyrosine-positive cells ($83.4 \pm 6\%$, $P = 0.03$ vs negative cells) also expressed proSFTPC, whereas only $21 \pm 5.6\%$ of nitrotyrosine-positive cells expressed MAC-3 ($P = 0.03$ vs negative cells) (Figure 3c and d).

iNOS Deletion Abolished Elastase-Induced Lung Protein Nitration but Did Not Prevent Emphysema

We then aimed to determine whether eNOS or iNOS were required for the accumulation of nitrated proteins and the development of emphysema in the elastase-injured lung. Protein nitration and emphysema were not attenuated in eNOS^{-/-} mice compared with wild-type mice at day 7 after elastase instillation. In iNOS^{-/-} mice, the number of 3-nitrotyrosine-positive cells was reduced by 62% compared with wild-type animals ($P = 0.04$); this effect was not associated with a reduction in the severity of emphysema in iNOS^{-/-} mice. Although the mean chord length of alveoli

was markedly increased in elastase mice compared with the control group ($33.2 \mu\text{m} \pm 4.6$ vs $21.5 \mu\text{m} \pm 0.9$; $P = 0.04$), iNOS inactivation did not modify the elastase-induced increase in this parameter ($32.5 \mu\text{m} \pm 5.9$, $P = 0.99$ vs elastase) (Figure 4a–c).

Pharmacological Inhibition of iNOS Reproduced the Phenotype of iNOS^{-/-} Mice

To control for compensatory mechanisms induced during development by germline deletion of the iNOS gene, wild-type mice were treated with 1400W, a specific iNOS inhibitor. At a dose of 20 mg/kg/day, 1400W reduced by 72% the number of 3-nitrotyrosine-positive cells in the lung of elastase-instilled mice ($P = 0.042$, Figure 4d). However, as was observed with iNOS^{-/-} mice, this major reduction in lung protein nitration did not translate into a reduction in elastase-induced emphysematous changes ($42.6 \mu\text{m} \pm 3.5$ vs $38.0 \mu\text{m} \pm 2.9$, $P = 0.45$) (Figure 4e). Similarly, 1400W at a dose of 1 mg/kg/day did not reduce emphysema in elastase-instilled C57B/6 mice (results not shown). To control bias relative to the choice of the C57B/6 strain for our experiments, Balb/c mice were used. As was observed in C57B/6 mice, 1400W had no protective effect against emphysema in Balb/c mice (results not shown).

iNOS Inhibition Increased Markers of Oxidative Stress After Elastase Instillation

As iNOS-derived peroxynitrite increases superoxide production in mitochondria,¹⁴ we determined whether iNOS inhibition would modulate the level of oxidative stress in the

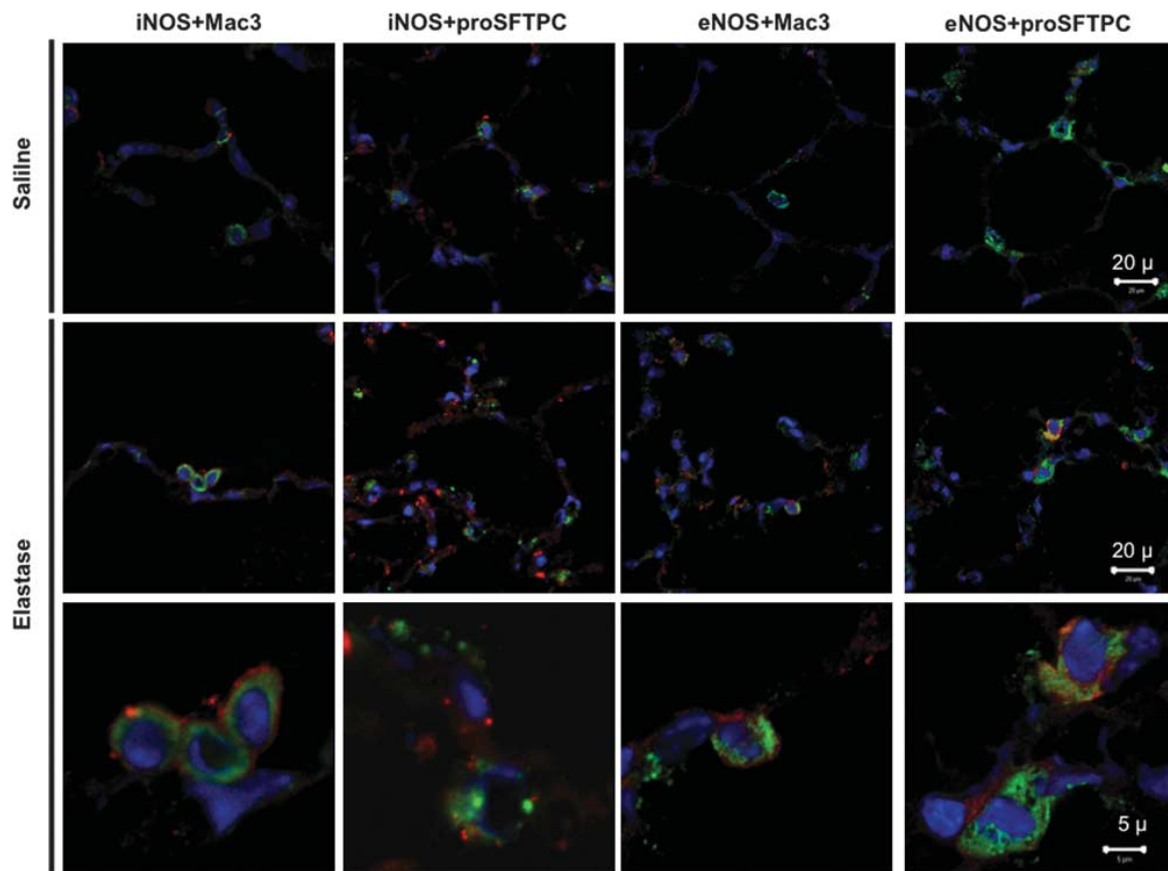


Figure 2 Immunolocalization of iNOS and eNOS in the lung at day 7 after elastase instillation. Colocalization of iNOS or eNOS expression (red signal) in the lung of saline and elastase-instilled mice with proSFTPC and Mac3 (alveolar type 2 cell marker and macrophage marker, respectively, green signal). Nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue signal). First and second rows: $\times 63$ original magnification. Third row: $\times 252$ magnification of delimited area.

lung at day 7 after elastase instillation. Although elastase exposure alone did not increase protein carbonylation in the lung, a 141% increase in protein carbonylation was observed in $iNOS^{-/-}$ compared with wild-type mice after elastase instillation ($P=0.032$, Figure 5a). Consistently with this result, 1400W induced a 229% increase in protein carbonylation at day 7 after elastase instillation ($P=0.002$, Figure 5b). By contrast, the induction at day 1 after elastase instillation of HO1 gene expression, another marker of oxidative stress, was not influenced by iNOS deletion (Figure 5c) or pharmacological inhibition (Figure 5d).

iNOS Inhibition Did Not Reduce Inflammation, MMP Activity or Alveolar Cell Proliferation After Elastase Instillation

Nitrotyrosine accumulation can be induced by neutrophil myeloperoxidase,¹⁵ and the inactivation of iNOS has been shown to reduce inflammation in models of lung injury.^{16,17} Thus, we tested the hypothesis that 1400W may have reduced the accumulation of nitrotyrosine-positive material in the

lung through a reduction in pulmonary inflammation. The influx in BALF of neutrophils (Figure 6a) or macrophages (Figure 6b) were not reduced in $iNOS^{-/-}$ compared with wild-type mice at day 1 or day 7 after elastase instillation. Consistently with the lack of an anti-inflammatory effect of iNOS deletion, the pulmonary levels of CCL2, CXCL2, TNF α , and IL6mRNAs were not different in elastase-instilled $iNOS^{-/-}$ and wild-type animals (Figure 6c–f). Similarly, pharmacological inhibition of iNOS neither reduced inflammatory cell counts, cytokine mRNAs (Supplementary Figure 1), or BALF CCL2 protein levels after elastase instillation (Supplementary Figure 2a), nor influenced the activity of MMP2 and MMP9, the main MMPs expressed, respectively, by macrophages and neutrophils, in BALF of elastase-instilled mice (Supplementary Figure 2b, c, and d). An 85% increase in alveolar cell proliferation was observed in the lung of elastase-instilled wild-type animals compared with saline-instilled mice. Treatment with 1400W did not increase or decrease elastase-induced alveolar cell proliferation (Supplementary Figure 3).

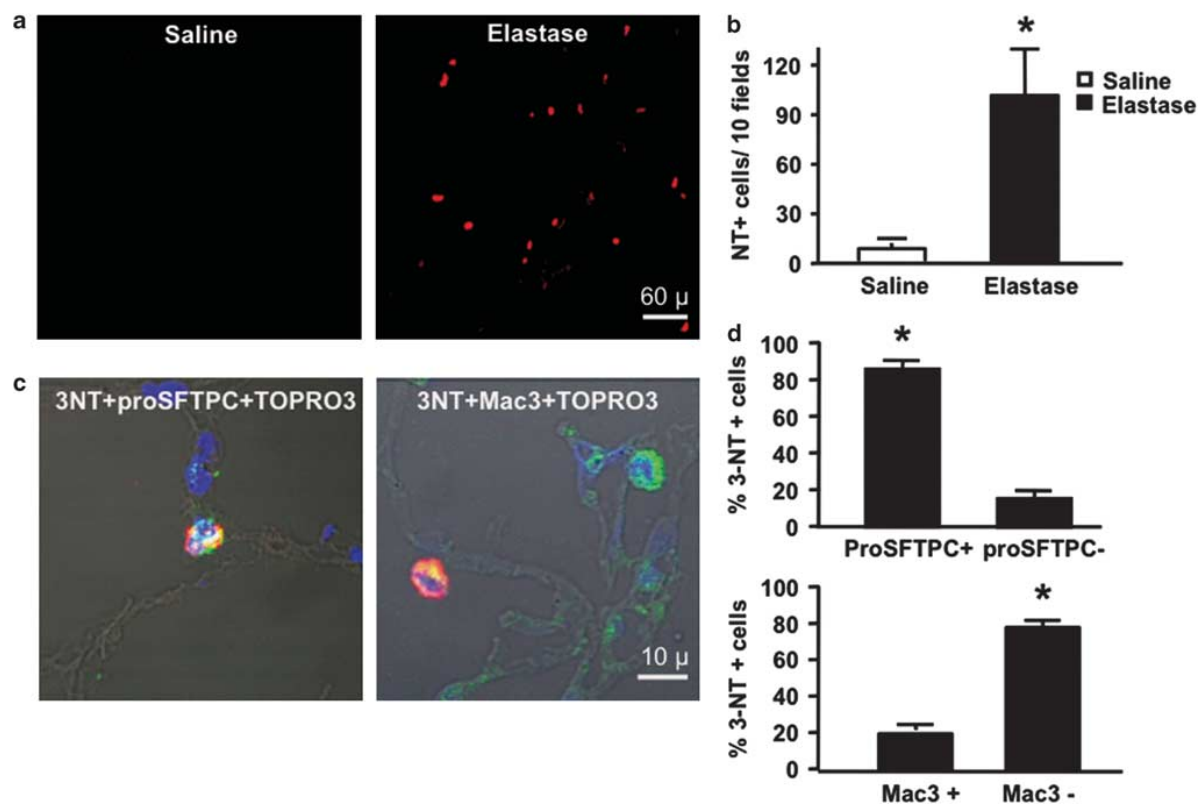


Figure 3 Elastase instillation induced the accumulation of nitrated proteins in alveolar type 2 cells. (a) Detection of 3-nitrotyrosine by fluorescence microscopy (red signal) in the lung of C57BL/6J mice at day 7 after saline or elastase instillation. $\times 20$ original magnification. (b) Number of 3-nitrotyrosine-positive cells per 10 microscopic fields in saline (open bars) or elastase (closed bars)-instilled mice, $n = 4$. $*P < 0.05$ vs saline. (c) Colocalization of 3-nitrotyrosine (red signal) with proSFTPC and Mac3 (both green signal) in the lung of elastase-instilled mice. Nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue signal). $\times 63$ original magnification. (d) Percentage of 3-nitrotyrosine-positive cells expressing proSFTPC or Mac3 in the lung of elastase-instilled mice, $n = 3$. Mean \pm s.e.

DISCUSSION

The main results of this study are (1) that iNOS and eNOS were diffusely induced in the mouse lung following a tracheal instillation of elastase, (2) that the induction of iNOS in the lung caused the accumulation of nitrated proteins in alveolar type 2 cells and to a lesser extent in macrophages, (3) that iNOS activity was not required for elastase-induced pulmonary inflammation, (4) that iNOS inactivation increased the level of oxidative stress in the elastase-instilled lung, and (5) that inactivation of eNOS or iNOS did not protect against elastase-induced emphysema. These findings provide evidence that iNOS-dependent protein nitration in alveolar type 2 cells accompanies but is not necessary for the development of elastase-induced pulmonary emphysema in mice.

Increases in lung iNOS expression and protein nitration were previously described in the lungs of patients with COPD⁷ as well as in experimental emphysema induced by inhibition of the VEGF receptor or surfactant protein D deficiency^{18,19}; whether these phenomena contributed to airspace enlargement in these models was not reported, but

could be suspected as iNOS contributes to inflammation and tissue remodeling in other models of lung injury such as endotoxin-induced pneumonitis,¹⁷ ventilator-induced lung injury,¹⁶ and silica-induced pulmonary fibrosis.²⁰ In contrast with these observations, we observed that, whereas iNOS was strongly induced in the lung following elastase instillation, iNOS inhibition had no evident impact on pulmonary inflammation or emphysema development in this model. eNOS was not implicated neither in lung protein nitration nor in the development of emphysema following a tracheal instillation of elastase; deletion of eNOS was not deleterious either, although eNOS promotes compensatory alveologenesis after pneumonectomy.²¹ nNOS has been reported to be induced and/or to contribute to pulmonary inflammation in experimental models of lung disease,^{22,23} and it was surprising that this isoform was not induced in our model.

Elastase-induced emphysema is an artificial model that does not reproduce any and all features of smoke-induced COPD. Bronchial and small airway alterations, which are observed in the development of centrilobular emphysema in

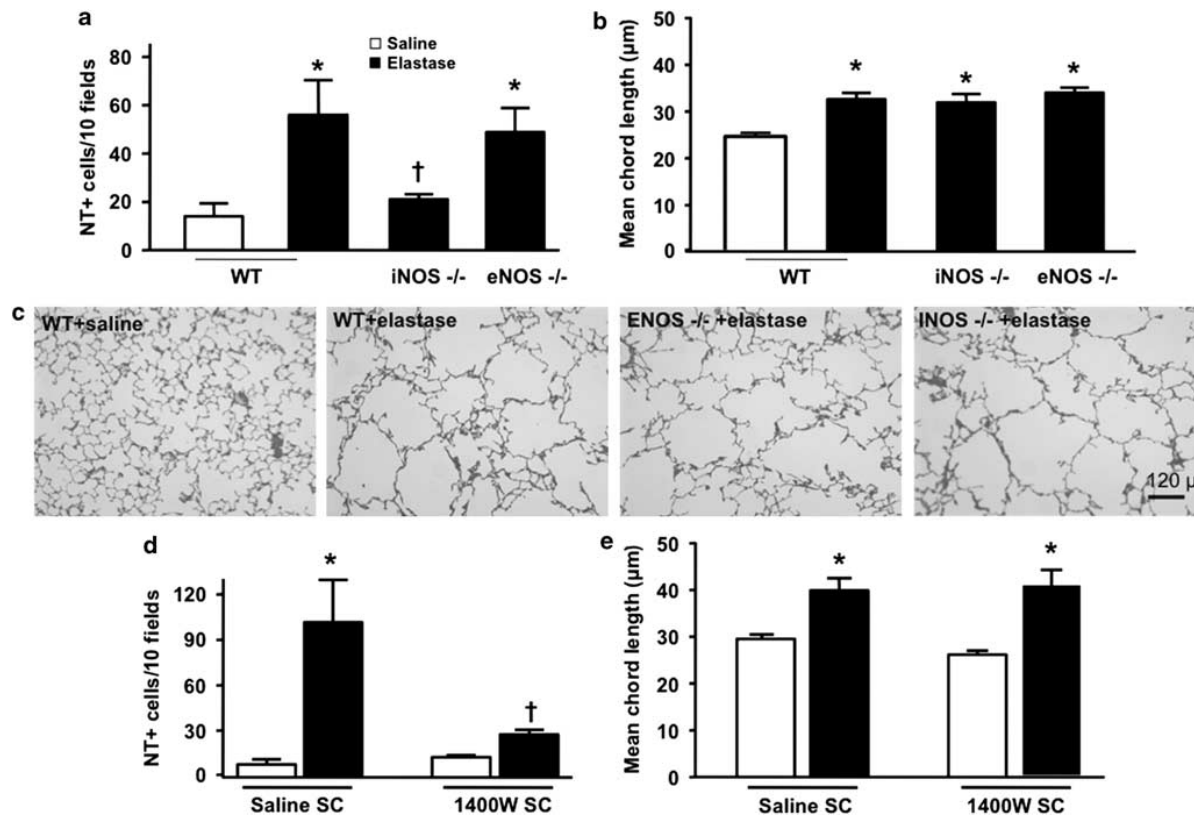


Figure 4 Inactivation of iNOS greatly reduced protein nitrosylation but did not prevent emphysema after elastase instillation. (a) Number of 3-nitrotyrosine-positive cells per 10 microscopic fields in the lung at day 7 after a tracheal instillation of saline (open bars) or elastase (closed bars) in wild-type, iNOS^{-/-}, or eNOS^{-/-} mice. $n = 4$. * $P < 0.05$ vs wild-type/saline. † $P < 0.05$ vs wild-type/elastase. (b) Severity of emphysema assessed by the mean chord length of airspaces in wild-type, iNOS^{-/-}, and eNOS^{-/-} mice at day 20 after a tracheal instillation of saline (open bars) or elastase (closed bars). * $P < 0.05$ vs wild-type/saline. (c) Representative photomicrographs of the lung of wild-type, iNOS^{-/-}, or eNOS^{-/-} mice at day 20 after saline or elastase instillation. $\times 10$ original magnification. (d) Number of 3-nitrotyrosine-positive cells per 10 microscopic fields in the lung at day 7 after a saline (open bars) or elastase (closed bars) instillation in mice treated with daily injections of saline or 20 mg/kg 1400W, $n = 4$. * $P < 0.05$ vs saline/saline. † $P < 0.05$ vs saline/elastase. (e) Mean chord length of airspaces in the lung at day 20 after a tracheal instillation of saline or elastase in mice treated with subcutaneous saline or 20 mg/kg 1400W. * $P < 0.05$ vs saline/saline. $n = 10$. Mean \pm s.e.

humans,²⁴ are not reproduced by this model. However, elastase instillation in rodents reproduces key phenomena conducting to alveolar walls destruction and air space enlargement, which define lesions of emphysema.²⁵ In our experiments, elastase instillation in mice reproduced the pattern of iNOS induction and protein nitration observed in the lung of patients with emphysema.^{7,26} Our observation that eNOS was also induced in the lung after elastase instillation was in line with the expression in COPD of constitutive NOS isoforms, as evidenced by the partial inhibition of alveolar NO production by inhaled aminoguanidine, a specific iNOS inhibitor, in these patients.¹⁰ Strengthening the relevancy of our model, the NOS expression profile induced by elastase instillation in our experiments was identical to that induced by cigarette smoke exposure in rats.²⁷

Activity of all NOS isoforms can be regulated post-translationally,^{10,28} and it might be hypothesized that the lack of

effect of eNOS or iNOS inactivation be related to already low levels of eNOS or iNOS activity. This question is of particular concern in the case of eNOS because we did not observe any morphological or biochemical effect of eNOS deletion. Our results, however, suggest that iNOS was indeed active in the elastase-injured lung, as iNOS inactivation was consistently associated with reduced nitration of lung proteins, a phenomenon directly linked to NO production.⁴ Neutrophil myeloperoxidase can induce protein nitration in the presence of nitrite and hydrogen peroxide.¹⁵ The fact that iNOS inactivation reduced elastase-induced protein nitration in the absence of a reduction in neutrophil counts pleads against the hypothesis that myeloperoxidase was a major contributor to protein nitration in our experiments.

The role of NO synthases in the distal lung remains unclear. The observation that protein carbonyls, a marker of oxidative stress, were increased in the lungs of iNOS^{-/-} and

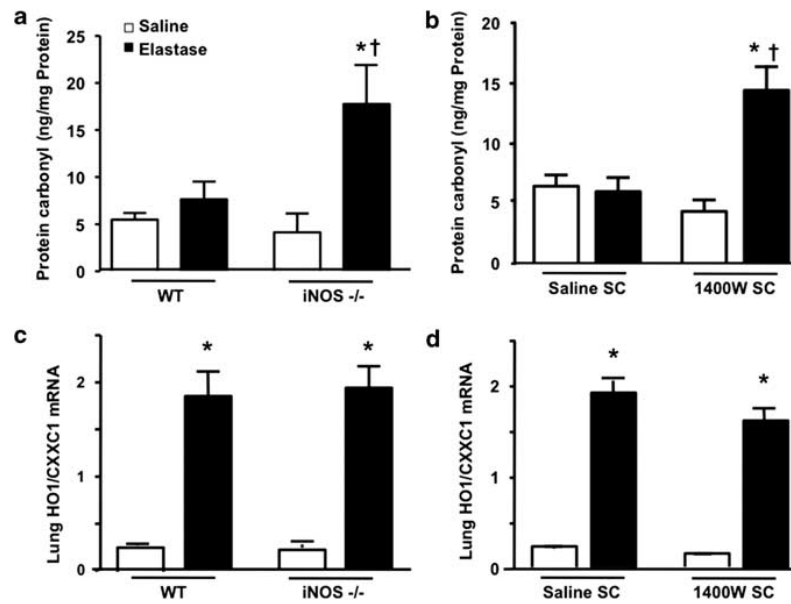


Figure 5 iNOS deletion or pharmacological inactivation increased oxidative stress in the lung of elastase-instilled mice. Lung protein carbonyl content quantified by ELISA at day 7 after saline (open bars) or elastase (closed bars) instillation in (a) wild-type and iNOS^{-/-} mice and (b) mice treated with daily injection of saline or 20 mg/kg 1400W. HO1 mRNA in lung homogenate at day after saline (open bars) or elastase (closed bars) in (c) wild-type and iNOS^{-/-} mice, and (d) mice treated with daily injection of saline or 20 mg/kg 1400W. **P* < 0.05 vs saline-instilled mice, †*P* < 0.05 vs saline/elastase or WT/elastase. *n* = 5. Mean ± s.e.

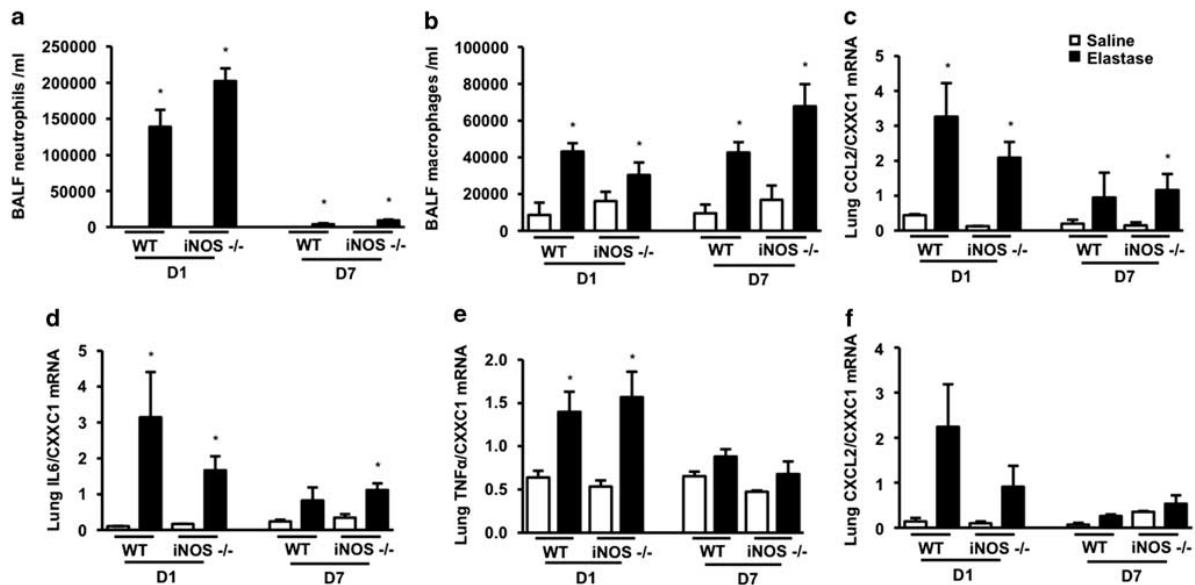


Figure 6 Inflammation was not reduced in iNOS^{-/-} mice at day 1 and day 7 after elastase instillation. (a) BALF neutrophil counts, (b) BALF macrophage counts, (c) lung CCL2 mRNA, (d) lung IL6 mRNA, (e) lung TNFα mRNA, and (f) lung CXCL2 mRNA, in wild-type and iNOS^{-/-} mice at day 1 and day 7 after a tracheal instillation of saline (empty bars) or elastase (closed bars). **P* < 0.05 vs saline-instilled mice. *n* = 5. Mean ± s.e.

1400W-treated animals suggested that iNOS had an anti-oxidative role. Whether this effect was exerted through quenching of superoxide by NO or through a reduction in superoxide production was beyond the scope of this study,

although the identical levels of HO1 gene expression in iNOS^{-/-} and 1400W-treated animals compared with controls suggested that the production of oxygen reactive species was similar in all groups of animals. A detrimental increase in

oxidative stress may have counterbalanced a putatively beneficial reduction in nitrosative stress in our model, resulting in a net null effect of iNOS deletion and inhibition. The preservation of alveolar cell proliferation in iNOS^{-/-} and 1400W-treated animals suggests that iNOS is not critical to alveolar repair.

In contrast with iNOS expression, which was diffuse in the alveolar wall, 3-nitrotyrosine staining mostly involved alveolar type 2 cells. Given that protein nitration reflects not only NO but also superoxide production, this finding indicates alveolar type 2 cells as the main cellular source of superoxide in alveolar walls in this model. Indeed, alveolar type 2 cells express NADPH oxidase and xanthine oxidase and are an important source of superoxide in the lung.^{29,30} Alternatively, the accumulation of nitrated proteins in alveolar type 2 cells may reflect a constitutive or elastase-induced vulnerability of these cells to nitrosative stress.

Interestingly, the absence of a cause and effect relationship between iNOS-dependent protein nitration and tissue destruction may be a general feature of models of elastase-induced disease in elastin-rich organs, as similar results were reported in the elastase-induced abdominal aortic aneurysm model. iNOS and 3-nitrotyrosine expression are increased in human abdominal aortic aneurysms,³¹ as well as in the aorta of mice after elastase exposure. Similarly to our findings, elastase-induced aneurysmal dilatation of the aorta is not reduced in iNOS^{-/-} mice, even though accumulation of 3-nitrotyrosine is greatly reduced.³² Pulmonary emphysema and aortic aneurysms may be closely related diseases from a pathophysiological standpoint.

Strong data support a critical role of excess oxygen reactive species, or oxidative stress, in the course of experimental emphysema,^{1-3,33} which led to ask whether other reactive species would have a similar role in this disease. This study showed that iNOS, eNOS, and nitration of lung proteins were not required for the development of elastase-induced emphysema, suggesting that excess nitrogen reactive species may not be important players in the development of pulmonary emphysema.

Supplementary Information accompanies the paper on the Laboratory Investigation website (<http://www.laboratoryinvestigation.org>)

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Olivier Thibaudeau (Plate-Forme de Morphologie, IFR 02, Hôpital Bichat) for his assistance with preparing anatomic specimens, Xavier Decrouy (Palte-Forme Imagerie, IMRB, Université Paris Est) for his assistance with confocal microscopy, Indoumady Baskara (Service d'Immunologie Biologique, Inserm U955) for her technical assistance with RT-PCRs, and Christophe Delhomme (UMR 1019/UR454, Inra de Clermont Ferrand-Theix, France) for his assistance with breeding iNOS^{-/-} mice needed for the revised version of this work. Laurent Boyer was the recipient of a grant by the Société de Pneumologie de Langue Française.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

1. reKinoshita T, Hoshino T, Imaoka H, *et al*. Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:712-719.
2. Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, *et al*. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest* 2004;125:1500-1506.
3. Foronjy RF, Mirochnitchenko O, Propokenko O, *et al*. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:623-631.
4. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-424.
5. Brindicci C, Ito K, Resta O, *et al*. Exhaled nitric oxide from lung periphery is increased in COPD. *Eur Respir J* 2005;26:52-59.
6. Ricciardolo FL, Caramori G, Ito K, *et al*. Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1028-1035.
7. Maestrelli P, Paska C, Saetta M, *et al*. Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. *Eur Respir J* 2003;21:971-976.
8. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, *et al*. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(2 Part 1):701-706.
9. Yang SR, Chida AS, Bauter MR, *et al*. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L46-L57.
10. Brindicci C, Ito K, Torre O, *et al*. 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;135:353-367.
11. Plantier L. Keratinocytes growth factor protects against elastase-induced emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:1230-1239.
12. Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, *et al*. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 1997;272:4959-4963.
13. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
14. Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, *et al*. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med* 2004;25:125-139.
15. Burner U, Furtmuller PG, Kettle AJ, *et al*. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *J Biol Chem* 2000;275:20597-20601.
16. Peng X, Abdounour RE, Sammani S, *et al*. Inducible nitric oxide synthase contributes to ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:470-479.
17. Okamoto T, Gohil K, Finkelstein EI, *et al*. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L198-L209.
18. Petrache I, Fijalkowska I, Zhen L, *et al*. A novel antiapoptotic role for alpha1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1222-1228.
19. Atochina-Vasserman EN, Beers MF, Kadire H, *et al*. Selective inhibition of inducible NO synthase activity *in vivo* reverses inflammatory abnormalities in surfactant protein D-deficient mice. *J Immunol* 2007;179:8090-8097.
20. Zeidler P, Hubbs A, Battelli L, *et al*. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J Toxicol Environ Health A* 2004;67:1001-1026.
21. Leuwerke SM, Kaza AK, Tribble CG, *et al*. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L1272-L1278.
22. De Sanctis GT, MacLean JA, Hamada K, *et al*. Contribution of nitric oxide synthases 1, 2, and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. *J Exp Med* 1999;189:1621-1630.
23. Demchenko IT, Atochin DN, Gutsaeva DR, *et al*. Contributions of nitric oxide synthase isoforms to pulmonary oxygen toxicity, local vs. mediated effects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L984-L990.
24. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004;364:709-721.
25. Wright JL, Cosio M, Chung A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L1-15.

NO synthases in elastase-induced emphysema

L Boyer *et al*

26. Brindicci C, Kharitonov SA, Ito M, *et al*. 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.
27. Wright JL, Dai J, Zay K, *et al*. Effects of cigarette smoke on nitric oxide synthase expression in the rat lung. *Lab Invest* 1999;79:975–983.
28. Lanone S, Manivet P, Callebert J, *et al*. Inducible nitric oxide synthase (NOS2) expressed in septic patients is nitrated on selected tyrosine residues: implications for enzymic activity. *Biochem J* 2002;366 (Part 2):399–404.
29. Saito S, Ogawa J, Minamiya Y. Pulmonary reexpansion causes xanthine oxidase-induced apoptosis in rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L400–L406.
30. Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, *et al*. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289: L834–L841.
31. Zhang J, Schmidt J, Ryschich E, *et al*. Inducible nitric oxide synthase is present in human abdominal aortic aneurysm and promotes oxidative vascular injury. *J Vasc Surg* 2003;38:360–367.
32. Lee JK, Borhani M, Ennis TL, *et al*. Experimental abdominal aortic aneurysms in mice lacking expression of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1393–1401.
33. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, *et al*. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 2004;114:1248–1259.

Supplementary information

Titles and Legends to figure

Figure 1. Inflammation was not reduced in 1400W treated mice at Day 1 and Day 7 after elastase instillation. (A) BALF neutrophil counts, (B) BALF macrophage counts, (C) lung CCL2 mRNA, (D) lung IL6 mRNA, (E) lung TNF α mRNA and (F) lung CXCL2 mRNA in wild-type and iNOS^{-/-} mice at Day 1 and Day 7 after a tracheal instillation of saline (empty bars) or elastase (closed bars). *: $p < 0.05$ vs saline-instilled mice. $n=5$. Mean \pm standard error.

Figure 2. Inactivation of iNOS did not reduce CCL2 protein level and MMP activity in BALF one day after elastase instillation. (A) CCL2 protein levels (B) Representative gelatin zymography. (C) Densitometric quantification of MMP-2 and (D) MMP-9 activity in mice instilled with saline (open bars) or elastase (closed bars) and treated with daily injections of saline or 20mg/kg 1400W. * $P < 0.05$ versus saline instilled mice $n = 5$ in each group. AU: arbitrary units. Data are mean \pm standard error.

Figure 3. Pharmacological inhibition of iNOS did not influence alveolar cell proliferation at Day 7 after elastase instillation. (A) Representative immunostaining for Ki67 and (B) number of Ki67-positive cells in the lung of mice at Day 7 after a saline (open bars) or elastase (closed bars) instillation in mice treated with daily injections of saline or 20mg/kg 1400W, $n=4$. Data are mean \pm standard error.

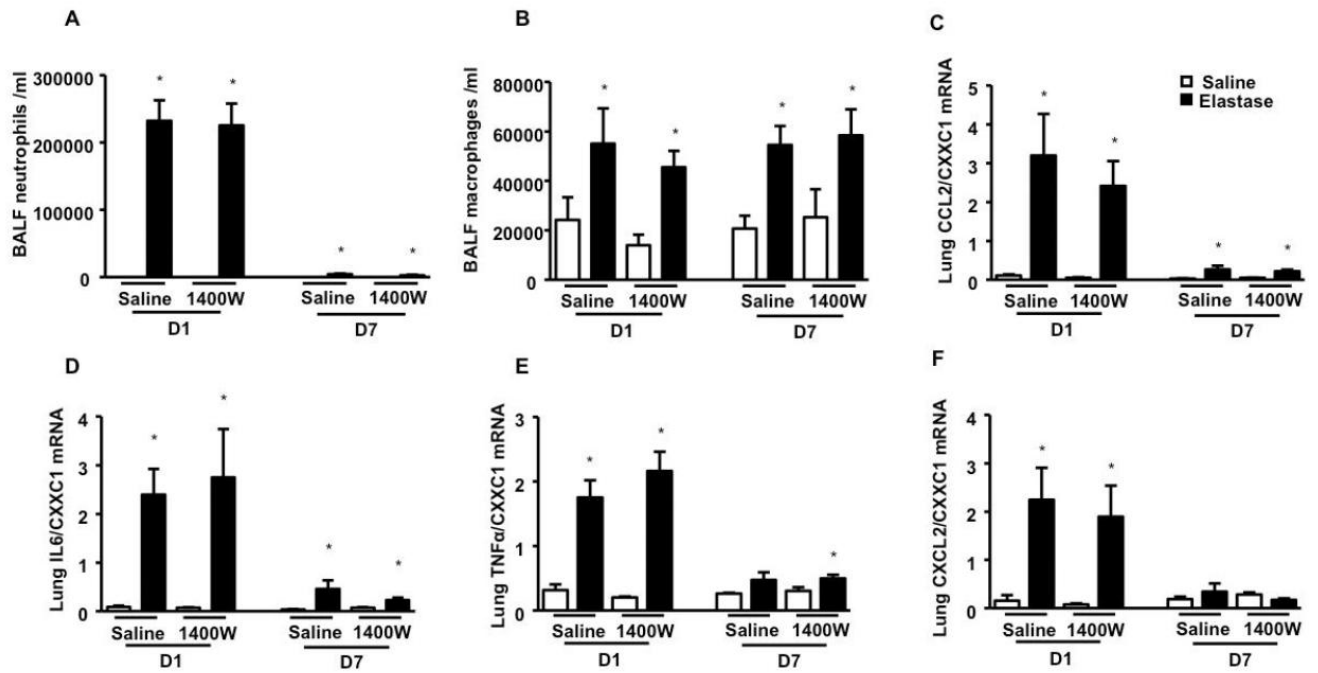
Tables

Table 1. Sequence of PCR primers

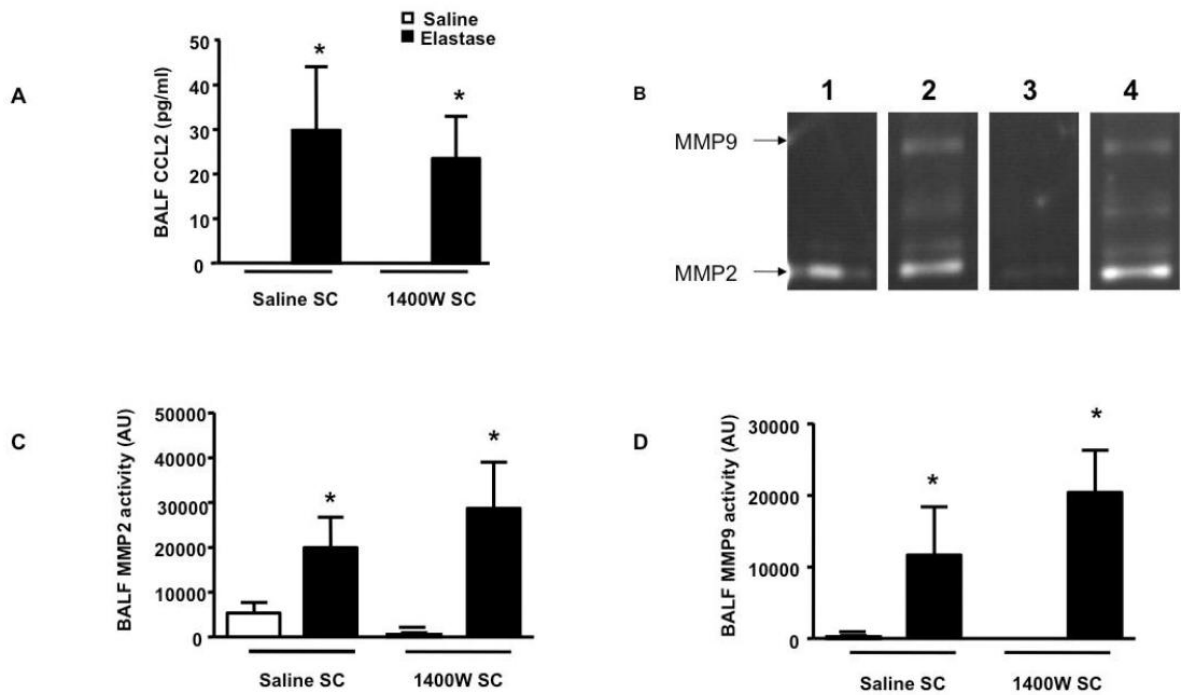
| Name | Genbank Accession Number | Sequences |
|---------------|--------------------------|---|
| nNOS | NM_008712 | Forward : GCTGAGAGCCTGCAATTACTACCA Reverse : CGGAATTGTAGCCTGGAACATCTTCCG |
| iNOS | NM_010927 | Forward : CGGGCAAACATCACATTCAGATCCCG Reverse : TATATTGCTGTGGCTCCCATGTT |
| eNOS | NM_008713 | Forward : CCACGTCAAGTACGCCACCAAC Reverse : CGGCTGAGGGGAATATAGTGATGGCCG |
| CCL2 (MCP-1) | NM_011333 | Forward : AGCAGCAGGTGTCCCAAAGA Reverse : ACGGGTCAACTTCACATTCAA |
| CXCL2 (MIP-2) | NM_009140 | Forward : CTCTCAAGGGCGGTCAAAAA Reverse : CAGTTAGCCTTGCCTTTGTTCA |
| CXXC1 | NM_028868 | Forward : ATGGCTCAGACCTGGAACCT Reverse : GCGGTAACGAATCTCCAGCTT |
| HO-1 | NM_010442 | Forward : GGCCACCAAGGAGGTACACAT Reverse : TGGGGCATAGACTGGGTTCT |
| IL-6 | NM_031168 | Forward : ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGAGATACAG Reverse : TGAATTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCCAC |
| TNF- α | NM_013693 | Forward : CCACCACGCTCTTCTGTCTACTGAACTT Reverse : GTGGGCTACAGGCTTGTCACTCG |

Figures

Supplemental figure 1

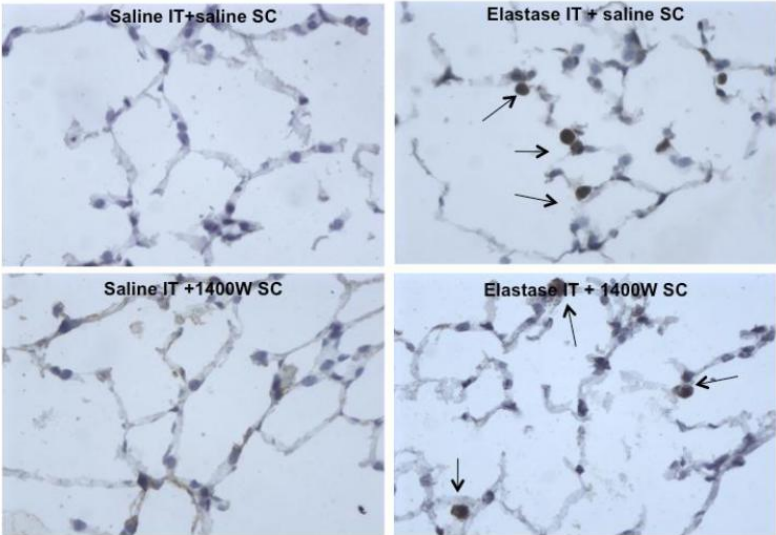


Supplemental figure 2

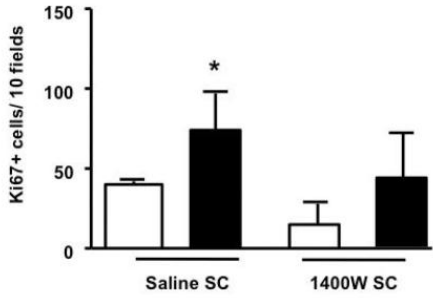


Supplemental figure 3

A



B



6.2. Effet de la polyglobulie sur la fonction endothéliale systémique au cours des maladies chroniques hypoxiques

Publication

Laurent Boyer, Vicky Chaar, Gabriel Pelle, Bernard Maitre, Christos Chouaid, Ala Covali-Noroc, Françoise Zerah, Catherine Bucherer, Catherine Lacombe, Bruno Housset, Jean-Luc Dubois-Randé, Jorge Boczkowski, Serge Adnot.

Effect of polycythemia on systemic endothelial function in chronic hypoxic lung disease

J Appl Physiol. 2011 May;110(5):1196-203. PMID: 21252221

Cet article a fait l'objet d'un éditorial, d'une lettre à l'éditeur et d'une réponse qui sont jointes à la suite de l'article :

Giuseppe Mancia and Cristina Giannattasio.

Endothelium in polycythemia secondary to obstructive lung disease.

J Appl Physiol. 2011 May;110(5):1158-1159

Andreotti F, Pafundi T, Crea F, Coluzzi G, Maseri A.

Polycythemia, vascular function, and hemoglobin-nitric oxide reactions.

J Appl Physiol. 2011 doi:10.1152/jappphysiol.00365.

Reply to Andreotti, Pafundi, Crea, Coluzzi, and Maseri:

Laurent Boyer and Serge Adnot

Role of hemoglobin in systemic endothelial function.

J Appl Physiol. 2011 ; 111: 000–000

Résumé

Introduction

La BPCO constitue un facteur de risque majeur pour les maladies cardiovasculaires. La polyglobulie, une complication de la BPCO hypoxique, pourrait affecter la fonction systémique vasculaire en augmentant la viscosité sanguine et les forces de cisaillement et la libération de NO dérivé de l'endothélium. Nous avons évalué les effets de la polyglobulie secondaire à l'hypoxie sur la fonction endothéliale chez des patients présentant une BPCO.

Méthodes

Nous avons exploré la viscosité sanguine, les forces de cisaillement, et la fonction endothéliale chez 15 patients polyglobuliques et 13 normoglobuliques atteints de BPCO de sévérité égale, en mesurant les variations de diamètre de l'artère brachiale en réponse à l'hyperhémie et en utilisant la plethysmographie d'occlusion veineuse (VOP) pour mesurer le flux sanguin de l'avant bras (FBF) en réponse à une perfusion au niveau de l'artère brachiale d'acétylcholine (ACh), de bradykinine (BK), de sodium nitroprusside (SNP), de substance P (SP), d'isoptine et de N-monométhyl-L-arginine (L-NMMA).

Résultats

De base, les patients polyglobuliques avaient une viscosité sanguine plus élevée et un diamètre artériel brachial plus important que les patients normoglobuliques, mais avec des forces de cisaillement calculées similaires. La vasodilatation induite par le flux de l'artère brachiale augmentait chez les patients polyglobuliques, de manière proportionnée au niveau d'hémoglobine. La vasodilatation induite par l'ACh était nettement altérée chez les patients polyglobuliques et corrélée négativement au niveau d'hémoglobine. La réponse du FBF aux facteurs vasodilatateurs dépendant (BK, SP) ou indépendants (SNP, isoptine) de l'endothélium n'était pas significativement différente entre les deux groupes. La perfusion de L-NMMA induisait une réponse vasoconstrictrice similaire dans les deux groupes, en accord avec leurs niveaux similaires de force de cisaillement à l'état de base.

Conclusion

Les artères systémiques des patients polyglobuliques ajustent leur diamètre aux forces de cisaillement aiguës et chroniques de manière adaptée grâce à une libération adaptée de NO. De plus, nos résultats suggèrent que la polyglobulie modérée n'a pas d'effet délétère sur la fonction vasculaire chez les patients BPCO.

Effects of polycythemia on systemic endothelial function in chronic hypoxic lung disease

Laurent Boyer,^{1,2} Vicky Chaar,² Gabriel Pelle,^{1,2} Bernard Maitre,^{2,3} Christos Chouaid,⁴ Ala Covali-Noroc,¹ Françoise Zerah,¹ Catherine Bucherer,¹ Catherine Lacombe,¹ Bruno Housset,^{2,3} Jean-Luc Dubois-Randé,^{2,5} Jorge Boczkowski,^{2,3} and Serge Adnot^{1,2}

¹Hôpital Henri Mondor, Service de Physiologie Explorations Fonctionnelles, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris-Est Créteil Val de Marne, Créteil; ²INSERM, Unité U955, Créteil; ³Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service de Pneumologie et de Pathologie Professionnelle, Créteil; ⁴Hôpital Saint Antoine, Service de Pneumologie, Paris;; and ⁵Hôpital Henri Mondor, Service de Cardiologie, Créteil, France

Submitted 12 October 2010; accepted in final form 13 January 2011

Boyer L, Chaar V, Pelle G, Maitre B, Chouaid C, Covali-Noroc A, Zerah F, Bucherer C, Lacombe C, Housset B, Dubois-Randé J, Boczkowski J, Adnot S. Effects of polycythemia on systemic endothelial function in chronic hypoxic lung disease. *J Appl Physiol* 110: 1196–1203, 2011. First published January 20, 2011; doi:10.1152/jappphysiol.01204.2010.—Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major risk factor for cardiovascular disease. Polycythemia, a common complication of hypoxic COPD, may affect systemic vascular function by altering blood viscosity, vessel wall shear stress (WSS), and endothelium-derived nitric oxide (NO) release. Here, we evaluated the effects of hypoxia-related polycythemia on systemic endothelial function in patients with COPD. We investigated blood viscosity, WSS, and endothelial function in 15 polycythemic and 13 normocythemic patients with COPD of equal severity, by recording brachial artery diameter variations in response to hyperemia and by using venous occlusion plethysmography (VOP) to measure forearm blood flow (FBF) responses to a brachial artery infusion of acetylcholine (ACh), bradykinin (BK), sodium nitroprusside (SNP), substance P (SP), isoptin, and *N*-monomethyl-L-arginine (L-NMMA). At baseline, polycythemic patients had higher blood viscosity and larger brachial artery diameter than normocythemic patients but similar calculated WSS. Flow-mediated brachial artery vasodilation was increased in the polycythemic patients, in proportion to the hemoglobin levels. ACh-induced vasodilation was markedly impaired in the polycythemic patients and negatively correlated with hemoglobin levels. FBF responses to endothelium- (BK, SP) and non-endothelium-dependent (SNP, isoptin) vasodilators were not significantly different between the two groups. L-NMMA infusion induced a similar vasoconstrictor response in both groups, in accordance with their similar baseline WSS. In conclusion, systemic arteries in polycythemic patients adjust appropriately to chronic or acute WSS elevations by appropriate basal and stimulated NO release. Overall, our results suggest that moderate polycythemia has no adverse effect on vascular function in COPD.

endothelium; chronic obstructive pulmonary disease

POLYCYTHEMIA occurs in the course of hypoxemic lung disease to maintain oxygen delivery despite the impaired gas exchange. The hematocrit is moderately elevated in ~20% of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (8). Because COPD is becoming increasingly prevalent in most countries and is now recognized as a major risk factor for

atherosclerosis and cardiovascular complications (6, 29), understanding the effects of polycythemia on vascular function in patients with COPD is crucial.

One consequence of polycythemia is increased whole blood viscosity, which may promote circulatory disturbances including systemic arterial hypertension, thrombotic events, and stroke (18). Convincing data indicate that marked hematocrit elevation is associated with adverse vascular effects, including increased resistance and decreased blood flow to the brain or other organs (18). In patients with severe polycythemia, therapeutic interventions to lower the hematocrit improve cerebral blood flow, limb blood flow, and limb oxygen transport (31, 32). On the opposite side, moderate hematocrit elevation improves exercise tolerance and exercise capacity in athletes, as well as in individuals living in high altitudes (4, 13). The incidence of coronary artery disease also seems lower in hypoxemic polycythemic individuals living in high altitudes and in adults with congenital cyanotic heart disease compared with appropriate normocythemic controls (13, 14). Thus the clinical impact of polycythemia in patients with chronic hypoxemia is debated, and the mechanisms by which polycythemia may affect the vasculature are incompletely understood.

Polycythemia is associated with increases in whole blood viscosity and vessel wall shear stress (WSS), which affect endothelial function (19). WSS is the main determinant of basal endothelium-derived nitric oxide (NO) release (24). In normocythemic patients, lower hematocrit levels were associated with decreased flow-mediated vasodilation (FMD), in accordance with the shear stress reduction (15). In apparent contradiction to this finding, FMD was impaired in patients with polycythemia vera (21). Endothelial function in systemic arteries as assessed by measuring the vasodilator response to an acetylcholine infusion was severely altered in adults with congenital cyanotic heart disease (22), in keeping with our previous findings in the pulmonary circulation of polycythemic patients with COPD (11). In these studies, however, neither WSS nor FMD was measured, which hinders the interpretation of the results. Thus, whether polycythemia per se causes endothelial dysfunction is still controversial. Another point is that polycythemia occurring in response to chronic hypoxemia is often associated with pathological conditions such as inflammation, smoking, sleep apnea syndrome, and systemic hypertension, which may contribute to alterations in systemic vascular function.

Address for reprint requests and other correspondence: S. Adnot, Service de Physiologie Explorations Fonctionnelles, Hôpital Henri Mondor, 51, Ave. du Mal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France (e-mail: serge.adnot@inserm.fr).

Table 1. Population characteristics, brachial artery diameter, blood flow, and wall shear stress at baseline and during hyperemia in normocythemic and polycythemic patients

| | Normocythemic | Polycythemic | P Value |
|-----------------------------------|---------------|--------------|---------|
| N | 13 | 15 | |
| Age, yr | 63.2 ± 2.1 | 59.0 ± 2.5 | NS |
| F/M | 1/12 | 0/15 | NS |
| Pack-yr | 52.3 ± 7.2 | 58.4 ± 5.2 | NS |
| BMI, kg/m ² | 25.6 ± 1.7 | 31.5 ± 1.8 | <0.05 |
| Heart rate, beats/min | 79 ± 5 | 82 ± 5 | NS |
| SBP, mmHg | 134 ± 4 | 138 ± 4 | NS |
| DBP, mmHg | 77 ± 2 | 77 ± 3 | NS |
| Lung function | | | |
| FEV ₁ , %predicted | 35.8 ± 4.4 | 45.4 ± 4.9 | NS |
| FVC, %predicted | 53.5 ± 4.4 | 65.3 ± 6.5 | NS |
| FEV ₁ /FVC | 53.6 ± 3.7 | 55.4 ± 3.4 | NS |
| PaO ₂ , mmHg | 64.2 ± 3.2 | 58.1 ± 2.6 | NS |
| Paco ₂ , mmHg | 46.0 ± 2.0 | 47.4 ± 1.9 | NS |
| SaO ₂ , % | 91.9 ± 1.1 | 90.4 ± 0.9 | NS |
| Hb, g/dl | 14.3 ± 0.2 | 17.4 ± 0.3 | <0.001 |
| Hct, % | 43.3 ± 0.7 | 52.8 ± 0.9 | <0.001 |
| Viscosity, mPa·s | 4.3 ± 0.1 | 5.3 ± 0.2 | <0.001 |
| Viscosity/Hct | 9.8 ± 0.1 | 10.1 ± 0.4 | NS |
| Baseline flow, ml/min | 67 ± 13 | 108 ± 15 | NS |
| Brachial artery diameter, mm | 4.5 ± 0.2 | 5.2 ± 0.2 | <0.02 |
| Maximal flow, ml/min | 203 ± 30 | 258 ± 41 | NS |
| Baseline WSS, dyn/cm ² | 5.2 ± 0.7 | 7.0 ± 1.1 | NS |
| Maximal WSS, dyn/cm ² | 16.3 ± 2.0 | 13.9 ± 1.5 | NS |

Data are means ± SE unless otherwise specified. F, females; M, males; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity; PaO₂, arterial PO₂; Paco₂, arterial PCO₂; SaO₂, arterial oxygen saturation; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; WSS, wall shear stress; NS, not significant.

We therefore designed the present study to assess endothelium-dependent vasodilation in 15 polycythemic and 13 non-polycythemic patients with COPD responsible for similar degrees of hypoxia and airway obstruction. Endothelium-dependent vasodilation was evaluated by recording brachial artery diameter variations in response to hyperemia and by using venous occlusion plethysmography to measure the forearm blood flow (FBF) response to brachial artery infusions of endothelium- and non-endothelium-dependent vasodilators. Infusion of the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-arginine analog N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) was performed to assess the vascular effect of basal NO release. In addition, we examined a larger cohort of patients with COPD to investigate whether polycythemia affected functional status.

METHODS

Study Population

We included 28 patients seen for COPD at the Henri Mondor Teaching Hospital pulmonology outpatient clinic. Inclusion criteria were an at least 10-pack-yr history of cigarette smoking, history of chronic bronchitis, evidence of chronic airflow limitation on standard pulmonary function tests (Table 1), and stable phase of COPD defined as no requirement for antibiotic or oral corticosteroid therapy and no change in respiratory symptoms within the last month. Patients were excluded if they had known heart disease, malignancy, other inflammatory or metabolic conditions, or anemia defined, as <12 g/dl of hemoglobin. Before study inclusion, we checked the absence of electrocardiographic abnormalities suggesting ischemic heart disease and of echocardiographic left ventricular dysfunction. All patients

were using oral and inhaled bronchodilators, six patients were treated for systemic hypertension, and seven patients had diagnosed obstructive sleep apnea (OSA). Antihypertensive drugs, inhaled bronchodilators, and corticosteroids were stopped 24 h before the study measurements. Patients were then classified into two groups based on whether their hemoglobin levels were lower or greater than 15.5 g/dl. Table 1 reports the main clinical characteristics and physiological parameters in the 13 normocythemic and 15 polycythemic patients.

We also evaluated biomarkers and functional status in 116 patients with COPD recruited prospectively at the Henri Mondor Teaching Hospital (Table 2). The data from 76 of these patients were published previously, but these earlier studies did not assess potential effects of the hemoglobin level on exercise performance (27). We defined normocythemia as a hemoglobin level between 12 and 15.5 g/dl and moderate polycythemia as a hemoglobin level between 15.5 and 19 g/dl. This study was approved by the institutional review board of the Henri Mondor Teaching Hospital. All patients and controls signed an informed consent document before study inclusion.

Measurements

Blood viscosity. Blood viscosity (η) was measured using a calibrated coaxial cylinder Couette viscometer at shear rates of 0.01 s⁻¹ to 33 s⁻¹, under atmospheric pressure, at the native hematocrit and at 37°C (2). The shear-thinning curve (viscosity decrease against shear rate) was then analyzed using Quemada's model, and viscosity at 100 s⁻¹ was derived (2).

Wall shear stress. WSS was calculated as previously described (2) from blood viscosity and brachial artery blood flow computed as $Q = V\pi r^2$, where V is the mean blood velocity measured over three cardiac cycles using pulsed-wave Doppler coupled to high-resolution B-mode ultrasound (Acuson Sequoia 512) and r is the radius of the artery at the flow measurement site. WSS was calculated using the Poiseuille formula assuming non-Newtonian fluid and laminar flow (verified by determination of the Reynolds number) as $WSS = 4\eta Q/(\pi r^3)$, where WSS is wall shear stress, η is blood viscosity, Q is local blood flow at rest, and r arterial radius at the blood flow measurement site (23). Brachial arterial diameter and blood flow were not indexed to arm size or body surface area.

Table 2. Characteristics of 93 normocythemic and 23 polycythemic patients in the study of inflammation and exercise performance

| | Normocythemic | Polycythemic | P Value |
|-------------------------------|---------------|--------------|---------|
| N | 93 | 23 | |
| Age, yr | 64.4 ± 1.0 | 61.1 ± 1.8 | NS |
| F/M | 26/67 | 3/20 | NS |
| Pack-yr | 53.3 ± 3.3 | 42.6 ± 5.2 | NS |
| BMI, kg/m ² | 25.8 ± 0.6 | 27.7 ± 0.8 | NS |
| Lung function | | | |
| FEV ₁ , %predicted | 41.8 ± 0.0 | 41.6 ± 0.0 | NS |
| FVC, % predicted | 66.9 ± 2.4 | 62.8 ± 4.3 | NS |
| FEV ₁ /FVC | 47.7 ± 1.4 | 51.4 ± 3.4 | NS |
| PaO ₂ , mmHg | 66.1 ± 0.9 | 62.9 ± 1.8 | NS |
| Paco ₂ , mmHg | 43.0 ± 0.7 | 45.7 ± 1.2 | NS |
| Hb, g/dl | 13.9 ± 0.1 | 16.5 ± 0.8 | <0.001 |
| 6-min walking distance | 384 ± 13 | 436 ± 25 | NS |
| IL-6, pg/ml | 3.7 ± 0.5 | 2.8 ± 0.4 | NS |
| IL-1 β , pg/ml | 0.8 ± 0.1 | 0.9 ± 0.3 | NS |
| IL-8, pg/ml | 12.7 ± 0.9 | 15.6 ± 3.1 | NS |
| TNF- α , pg/ml | 1.9 ± 0.1 | 2.0 ± 0.4 | NS |
| MCP-1, pg/ml | 519 ± 24 | 539 ± 65 | NS |

Values are means ± SD unless otherwise specified. Cytokines were measured in 75 normocythemic and 16 polycythemic patients. IL, interleukin; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1.

FMD. FMD was evaluated as previously described, after 30-min bed rest, in a temperature-controlled room (22°C), with continuous blood pressure monitoring (Finapres 2300, Ohmeda, Madison, NJ) (1, 2). A high-resolution ultrasound Wall Track system (Pie Medical, Maastricht, The Netherlands) with a 7.5-Hz linear probe was used to measure the systolic and diastolic internal diameters of the distal brachial artery. This echo-tracking system, which analyzes radiofrequency signals, has 30- μ m precision for diastolic diameter measurements. FMD was measured as the percentage increase in brachial artery diastolic diameter after 5 min of ischemia of the ipsilateral hand induced by inflating a wrist cuff (hyperemia test). The mean of three diastolic diameters was used as the basal diameter (D_B). The maximum diameter (D_M) was the greatest diastolic diameter following cuff deflation; measurements were made at deflation then every 30 s for 5 min. The measurement at deflation was the minimum diameter (D_B , for basal diameter). FMD was calculated as $100 \times (D_M - D_B)/D_B$. Reproducibilities of D_B and D_M values were within 3%.

FBF measurement by venous occlusion plethysmography. FBF was measured at the forearm using strain-gauge venous occlusion plethysmography (1). FMD was usually assessed 1 or 2 days before FBF assessment by venous occlusion plethysmography. A mercury-in-Silastic strain gauge placed around the widest portion of the upper third of the forearm was electrically coupled to a plethysmograph (Perivein JSI 0539/I) calibrated to measure normalized changes in volume. For each measurement, venous flow was occluded just proximal to the elbow by rapidly inflating a blood pressure cuff to 40 mmHg. A wrist cuff was inflated to suprasystolic pressures starting 1 min before each measurement to exclude the hand circulation from the blood flow determination. FBF values are reported in milliliters per minute per 100 ml of forearm volume, and each value is the mean of at least three measurements. Systolic blood pressure (BP), diastolic BP, mean arterial BP, and heart rate were monitored continuously (Finapres 2300, Ohmeda). All studies were performed in the morning in a quiet temperature-controlled (22°C) room. While the patient was in the supine position, a catheter (Seldicath, diameter 1.0, Teflon ORX, 3P, Prodimed, Le Plessis Bouchard, France) was inserted after local anesthesia (1% xylocaine) into the brachial artery of the non-dominant arm, which was elevated slightly above the right atrium. To establish resting control FBF values, we administered 0.9% saline for 30 min. Vasoactive agent infusions were then started. Between each series of drug infusions, FBF was allowed to return to the basal value (this required ~20 min). Three drugs were used to explore endothelium-dependent vasodilation: acetylcholine (250–500 nmol/min, Pharmacie Centrale des Hôpitaux, Paris, France), and bradykinin and substance P (10–30–100 pmol/min and 1.5–3.75–7.5 pmol/min respectively, Clinalfa, Bubendorf, Switzerland). Two drugs were used to explore non-endothelium-dependent vasodilation: sodium nitroprusside (4–8–12 μ mol/min, Nitriate, Laboratoires SERB, Paris, France) and isoptin (40 nmol/min). Finally, L-NMMA (Clinalfa) was infused (4–8–12 μ mol/min). Each concentration of each drug was injected into the brachial artery for 5 min. Vasodilator drugs were administered in random order except for isoptin and L-NMMA, which were infused in that order at the end of the procedure.

Plasma cytokine assays. Plasma levels of interleukins (IL)-6, -8, and -1 β ; monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1); and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were determined using ELISAs (R&D Systems, Lille, France).

Statistical Analysis

All data are reported as the means \pm SE. Normocythemic and polycythemic patients were compared using the unpaired *t*-test for quantitative variables and the chi-square test for categorical variables. When the median was equal to the mean, the distribution was considered normal. ANOVA for repeated measurements was used to assess changes in FBF induced by drug infusions. When a significant difference was found, we compared individual means using the

Scheffé test. Correlations between variables were evaluated using least-squares linear regression techniques (Pearson). Probability (*P*) values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Study Population

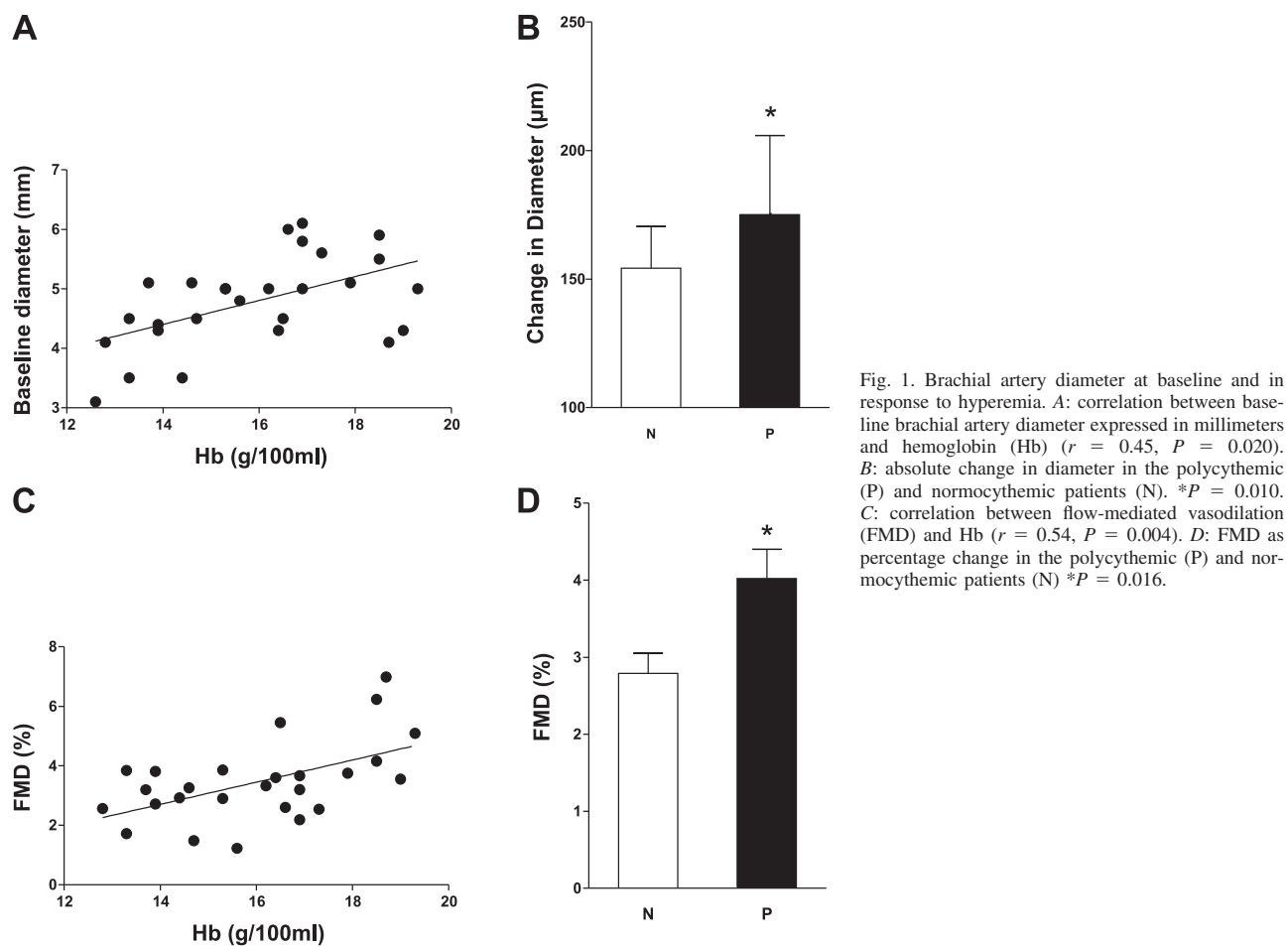
The 15 polycythemic and 13 normocythemic patients were similar regarding age, sex ratio, smoking history, blood pressure, and heart rate (Table 1). Lung function tests and arterial P_{O_2} (P_{aCO_2}) and P_{CO_2} (P_{aCO_2}) were not significantly different between the two groups. Hemoglobin concentrations ranged from 11.8 to 15.3 g/dl in the normocythemic group and from 16.0 to 19 g/dl in the polycythemic group. Compared with the normocythemic patients, polycythemic patients had higher body mass index (BMI) values, but the percentage of patients with treated systemic hypertension (3 patients in each group) or diabetes (1 patient in each group) was similar in the two groups. The two groups were subjected to a similar regimen of bronchodilator drugs. The two patients with OSA in the normocythemic group were treated at the time of the study, compared with only two of the five patients with OSA in the polycythemic group. In accordance with the higher blood hemoglobin and hematocrit levels in the polycythemic patients, this group had higher blood viscosity compared with the normocythemic group (Table 1). However, the ratio of viscosity over hematocrit was not significantly different between the two groups.

Evaluation of Endothelial Function Using Brachial Arterial Diameter Monitoring

At baseline, blood flow, and calculated WSS were not significantly different between polycythemic and normocythemic patients (Table 1). The absence of difference in WSS resulted from the larger brachial artery diameter in the polycythemic group, which compensated for the higher blood viscosity. In the overall population, brachial artery diameter correlated positively with hemoglobin levels ($P < 0.01$; Fig. 1A). Brachial artery diameter did not correlate with P_{aO_2} or oxygen saturation. In response to the hyperemia test, brachial artery flow increased to similar values in the two groups, but the accompanying increase in brachial artery diameter was greater in the polycythemic group (0.25 ± 0.02 vs. 0.15 ± 0.02 mm, respectively, $P = 0.01$, Fig. 1B; or 3.97 ± 0.39 vs. $2.85 \pm 0.25\%$, respectively, $P < 0.02$, Fig. 1D). FMD correlated positively with the hemoglobin level ($P < 0.01$; Fig. 1C). No relationship was observed between FMD and other variables including age, sex, forced expiratory volume in 1 s (FEV_1), P_{aO_2} , systolic BP, and BMI.

Pharmacological Evaluation of Forearm Blood Flow Using Venous Occlusion Plethysmography

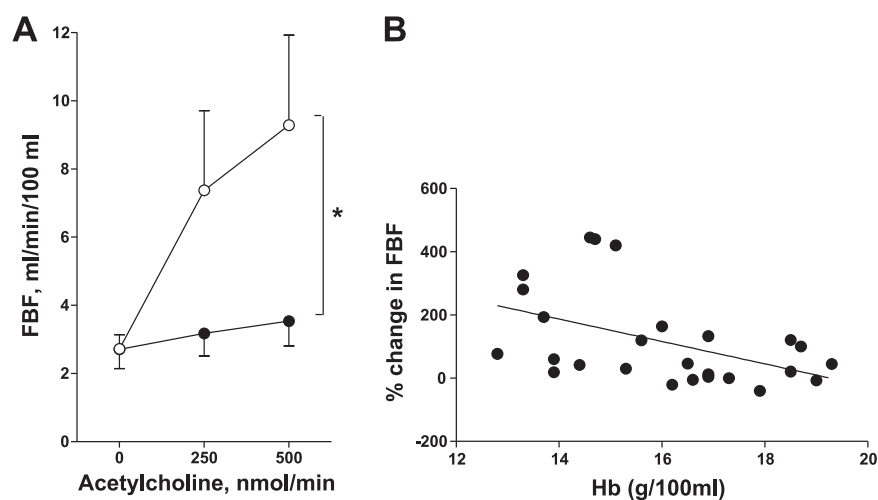
Baseline FBF values were not significantly different between the two groups. The FBF increase induced by incremental acetylcholine infusion rates was markedly blunted in the polycythemic patients compared with the normocythemic patients ($P = 0.03$, Fig. 2A). The percentage FBF increase after 80 μ g/min of acetylcholine correlated negatively with hemoglobin ($P = 0.02$; Fig. 2B). No correlation was observed between the percentage FBF increase after acetylcholine and



BMI, age, sex, FEV₁, PaO₂, or systolic BP. In contrast, the FBF increases induced by bradykinin and substance P were not significantly different between the polycythemic and normocythemic patients (Fig. 3). Neither were significant differences

found for the vasodilator response to the non-endothelium-dependent vasodilators SNP and isoptin (Fig. 4).

We then infused the specific NOS inhibitor L-NMMA to evaluate the biologic effect of basal NO on vascular tone.



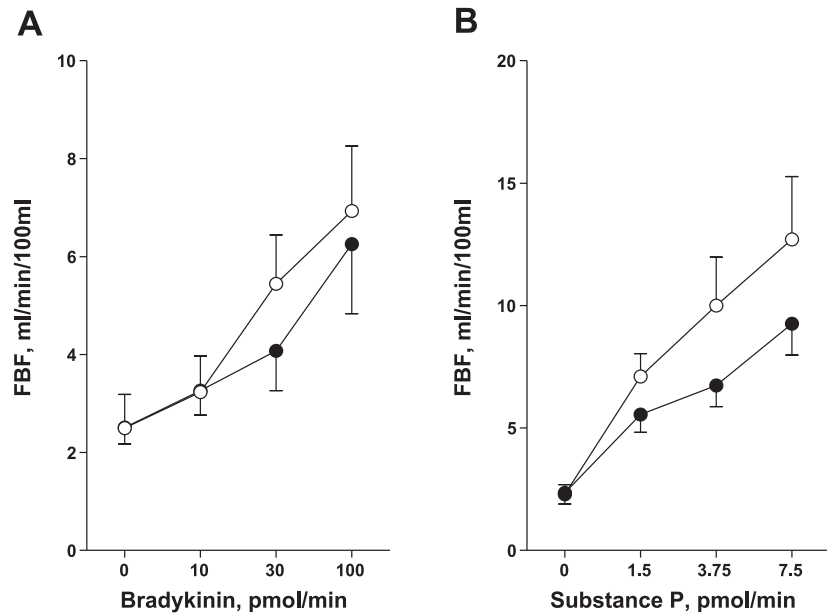


Fig. 3. FBF variations in response to bradykinin (A) and substance P (B) infusion into the brachial artery in polycythemic and normocythemic patients. ANOVA detected no significant difference between the 2 groups. ●, Polycythemic patients; ○, normocythemic patients.

Figure 5 shows that increasing L-NMMA infusion rates induced similar vasoconstrictor responses in polycythemic and normocythemic patients, as judged by the absolute or percent decrease in FBF.

Exercise Capacity in Polycythemic and Normocythemic Patients

To investigate whether polycythemia affected the functional status of the patients, we examined a larger cohort of patients with COPD investigated at our institution. We found that polycythemic patients (hemoglobin, 15.5–19 g/dl) did not

differ from normocythemic patients (hemoglobin, 12–15.5 g/dl) regarding Pa_{O_2} or 6-min walking distance (Table 2). However, the 6-min walking distance correlated positively with Pa_{O_2} ($P < 0.05$) and hemoglobin concentration ($P < 0.05$) in the overall study cohort. Plasma cytokine levels did not differ between polycythemic and normocythemic patients.

DISCUSSION

Here, we investigated the effects of moderate polycythemia on endothelial function in patients with COPD, a condition associated with a high risk of cardiovascular disease. We found

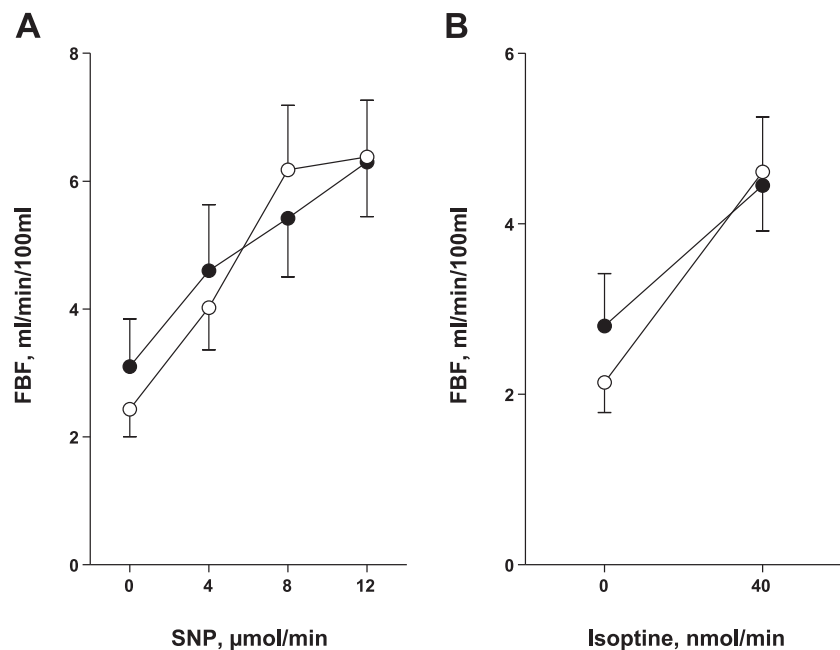


Fig. 4. FBF variations in response to sodium nitroprusside (SNP; A) and isoptin (B) infusion into the brachial artery in polycythemic and normocythemic patients. ANOVA detected no significant difference between the 2 groups. ●, Polycythemic patients; ○, normocythemic patients.

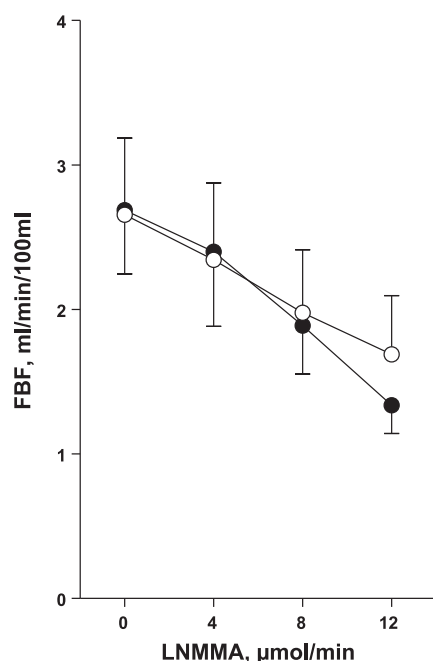


Fig. 5. FBF variations in response to *N*-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) infusion into the brachial artery in polycythemic and normocythemic patients. ANOVA detected no significant difference between the 2 groups. ●, Polycythemic patients; ○, normocythemic patients.

that polycythemic patients adapted their WSS under baseline conditions or in response to a flow increase by appropriately increasing the vessel diameter. Because vessel diameter adjustments in response to WSS variations reflect basal or stimulated NO release, and because baseline NO release as assessed by the vasoconstrictor response to L-NMMA did not differ significantly between polycythemic and normocythemic patients, we concluded that muscular arteries in patients with polycythemia exhibited both a normal response to mechanical stimulation and appropriate basal and stimulated NO release. Although acetylcholine-induced vasodilation was markedly impaired in polycythemic patients, the vasodilator responses to SNP, bradykinin, substance P, and isoptin did not differ significantly between polycythemic and normocythemic patients. Taken together, these results suggest that polycythemia induced by chronic or intermittent hypoxia may have no adverse effects on vascular function.

Endothelial function plays a critical role in protecting against platelet activation, thrombosis, and vascular remodeling. Endothelial cells respond to circulating vasoactive compounds and to variations in WSS, the dragging frictional force created by blood flow and blood viscosity (10). One consequence of an acute or chronic WSS increase in large and small arteries is vessel caliber adjustment that restores WSS to its baseline value (10, 24). We first investigated baseline brachial artery flow, blood viscosity, and brachial artery diameter in polycythemic and normocythemic patients to determine baseline WSS. We found that brachial artery flow did not differ significantly between polycythemic and normocythemic patients, although it tended to be higher in the polycythemic group. Blood viscosity was higher in the polycythemic than in the normocythemic patients, and this difference was mainly

due to a higher hematocrit level, since blood viscosity normalized for hematocrit did not differ significantly between the two groups. Because the polycythemic patients also had a larger baseline brachial artery diameter, their baseline brachial artery WSS did not differ significantly from that in the normocythemic patients. Moreover, the acute WSS increase in response to reactive hyperemia induced a larger brachial artery diameter increase in the polycythemic than in the normocythemic patients. This difference occurred despite the similar relative increase in brachial artery flow generated by hyperemia in the two groups. Of note, FMD correlated positively to the hemoglobin concentration. These results suggest tight regulation of WSS, with the blood viscosity increase due to polycythemia being associated with an arterial diameter increase that maintains WSS within the normal range.

Both acute and chronic vessel diameter increases in response to shear stress involve endothelial NO release (5, 24). The similar vasoconstrictor response to L-NMMA, as judged by the FBF decrease, in polycythemic and normocythemic patients suggests that similar amounts of NO were released by the endothelium under baseline conditions in the two groups, in keeping with the similar basal WSS values. These results also suggest structural enlargement as opposed to active vasodilation as the explanation to the increased vessel diameter in polycythemic patients under baseline conditions. Indeed, a chronic flow increase is associated with structural enlargement of systemic vessels (24). In contrast, the larger brachial artery diameter increase following hyperemia in the polycythemic patients might indicate increased NO release on stimulation. Overall, these results strongly suggest appropriate adjustment of systemic arteries to chronic or acute WSS increases via appropriate basal and stimulated NO release in polycythemic patients.

Our findings are consistent with studies in experimental animals with markedly or moderately elevated hematocrit values, in which endothelial NO maintained normotension, prevented cardiovascular dysfunction, and exerted a key influence on survival (20, 25, 26). They conflict, however, with results from patients with polycythemia vera (21), a myeloproliferative syndrome in which thromboembolism remains a major cause of mortality and morbidity despite therapeutic interventions to decrease red cell mass. Studies in patients with polycythemia vera found decreased FMD values despite normalized hematocrit levels. These results suggest that thrombosis in polycythemia vera may be partly ascribable to mechanisms other than increased blood viscosity or altered NO bioavailability, such as erythrocyte adhesion to endothelial cells and platelet function abnormalities (30).

To further evaluate vascular reactivity in polycythemic vs. normocythemic patients, we measured FBF during infusions of endothelium- and non-endothelium-dependent vasodilators. We found that the vasodilator response to acetylcholine was markedly impaired in the polycythemic patients compared with the normocythemic patients, whereas the vasodilator responses to SNP and isoptin did not differ significantly between the two groups. An impaired vasodilator response to acetylcholine coexisting with a normal vasodilator response to SNP was recently reported in polycythemic adult patients with cyanotic congenital heart disease and was interpreted as indicating endothelial dysfunction (22). We previously reported profound impairment of the acetylcholine-induced vasodilator response

in the pulmonary circulation of polycythemic patients with COPD, contrasting with a normal vasodilator response to inhaled NO (11). These results indicate clearly that polycythemia per se dramatically reduces acetylcholine-induced vasodilation, regardless of whether the cause is cardiac or pulmonary. On the other hand, we and others previously reported a major increase in acetylcholine-induced vasodilation in patients with anemia due either to sickle cell disease (SCD) or to other causes (2, 16). Here and in our previous study in patients with SCD, acetylcholine-induced vasodilation correlated negatively with the hemoglobin level. Thus the hemoglobin level may exert a major effect on acetylcholine responses in humans but not on responses to other endothelium-dependent dilators such as bradykinin and substance P. Another possible interpretation is that polycythemia is associated with improvements in the endothelial function of large arteries, which is highly dependent on shear stress, and with impaired endothelial function in the microcirculation. However, it is difficult to reconcile the fact that polycythemia impairs endothelial function in the microcirculation and at the same time increases oxygen delivery to the tissues, as seen in athletes, in whom polycythemia markedly improves exercise performance. Our findings are consistent with other studies showing impaired vasodilation in response to acetylcholine, despite preserved vasodilation induced by substance P (7, 12, 17). The mechanisms underlying these effects can only be speculated from our results, which is a limitation of our study. Changes in vascular muscarinic receptors may have played a role, as previously reported in elderly individuals (3).

Several studies found low prevalences of coronary artery disease in adults with congenital cyanotic heart disease or secondary polycythemia (13, 22). In contrast, patients with COPD are at high risk for cardiovascular disease (6, 29). Although widespread use of supplemental oxygen therapy has decreased the severity of polycythemia in patients with chronic hypoxic lung disease, hematocrit elevation remains common, especially when sleep-disordered breathing is present. In our study population, 33% of polycythemic patients had OSA, an independent risk factor for atherosclerosis. COPD and OSA, separately or in combination, are major risk factors for cardiovascular disease and often cause polycythemia. Our present findings suggest that, in patients with COPD or OSA, polycythemia may protect vascular function by increasing the vessel diameter, thereby normalizing shear stress and increasing blood supply in a situation of chronic hypoxia.

One limitation of our study is that most of our "polycythemic" patients had moderate polycythemia and that the vascular effects of hematocrit elevation may vary according to the magnitude of the increase. Exercise performance improves with hematocrit elevation in athletes and with hemodilution in patients with COPD (9). In mice chronically treated with erythropoietin, the effects of polycythemia were either beneficial or detrimental depending on the hematocrit level (28). Conceivably, the large blood viscosity increase associated with very high hematocrit levels may limit blood oxygen transport capacity, whereas smaller hematocrit increases may improve blood oxygen transport capacity and induce sustained vessel dilatation that normalizes shear stress, thereby improving exercise performance. To investigate whether polycythemia was associated with altered exercise performance in patients with COPD, we examined a prospective cohort of 116 patients. We

found that the 6-min walking distance correlated positively with both arterial PO_2 and hemoglobin levels in the overall cohort, suggesting a beneficial effect of moderate polycythemia. We cannot exclude, however, that severe polycythemia may cause adverse effects both on vascular function and on the functional status of patients with COPD. Whether polycythemia affects the long-term cardiovascular risk in patients with COPD deserves further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Liliane Forestier (Service de Physiologie, Explorations Fonctionnelles, Hôpital Henri Mondor) for assistance in the pharmacological evaluation of forearm blood flow using venous occlusion plethysmography.

GRANTS

Grants were obtained from INSERM and the Délégation à la Recherche Clinique de l'AP-HP.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

1. Belhassen L, Pelle G, Dubois-Rande JL, Adnot S. Improved endothelial function by the thromboxane A2 receptor antagonist S 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *J Am Coll Cardiol* 41: 1198–1204, 2003.
2. Belhassen L, Pelle G, Sediame S, Bachir D, Carville C, Bucherer C, Lacombe C, Galacteros F, Adnot S. Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood* 97: 1584–1589, 2001.
3. Brodde OE, Kanschak U, Becker K, Ruter F, Poller U, Jakubetz J, Radke J, Zerkowski HR. Cardiac muscarinic receptors decrease with age. In vitro and in vivo studies. *J Clin Invest* 101: 471–478, 1998.
4. Buick FJ, Gledhill N, Froese AB, Spriet L, Meyers EC. Effect of induced erythrocythemia on aerobic work capacity. *J Appl Physiol* 48: 636–642, 1980.
5. Busse R, Fleming I, Hecker M. Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. *Eur Heart J* 14, Suppl I: 2–9, 1993.
6. Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC, Vestbo J. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 356: 775–789, 2007.
7. Casino PR, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Quyyumi AA, Panza JA. Impaired endothelium-dependent vascular relaxation in patients with hypercholesterolemia extends beyond the muscarinic receptor. *Am J Cardiol* 75: 40–44, 1995.
8. Chambellan A, Chailleux E, Similowski T. Prognostic value of the hematocrit in patients with severe COPD receiving long-term oxygen therapy. *Chest* 128: 1201–1208, 2005.
9. Chetty KG, Light RW, Stansbury DW, Milne N. Exercise performance of polycythemic chronic obstructive pulmonary disease patients. Effect of phlebotomies. *Chest* 98: 1073–1077, 1990.
10. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75: 519–560, 1995.
11. Defouilloy C, Teiger E, Sediame S, Andrivet P, Roudot-Thoraval F, Chouaid C, Housset B, Adnot S. Polycythemia impairs vasodilator response to acetylcholine in patients with chronic hypoxic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1452–1460, 1998.
12. DeSouza CA, Clevenger CM, Greiner JJ, Smith DT, Hoetzer GL, Shapiro LF, Stauffer BL. Evidence for agonist-specific endothelial vasodilator dysfunction with ageing in healthy humans. *J Physiol* 542: 255–262, 2002.
13. Faeh D, Gutzwiller F, Bopp M. Lower mortality from coronary heart disease and stroke at higher altitudes in Switzerland. *Circulation* 120: 495–501, 2009.
14. Fyfe A, Perloff JK, Niwa K, Child JS, Miner PD. Cyanotic congenital heart disease and coronary artery atherogenesis. *Am J Cardiol* 96: 283–290, 2005.

15. **Giannattasio C, Piperno A, Failla M, Vergani A, Mancina G.** Effects of hematocrit changes on flow-mediated and metabolic vasodilation in humans. *Hypertension* 40: 74–77, 2002.
16. **Gladwin MT, Schechter AN, Ognibene FP, Coles WA, Reiter CD, Schenke WH, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA, Cannon RO 3rd.** Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation* 107: 271–278, 2003.
17. **Hirooka Y, Imaizumi T, Harada S, Masaki H, Momohara M, Tagawa T, Takeshita A.** Endothelium-dependent forearm vasodilation to acetylcholine but not to substance P is impaired in patients with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 20, Suppl 12: S221–S225, 1992.
18. **Humphrey PR, Du Boulay GH, Marshall J, Pearson TC, Russell RW, Symon L, Wetherley-Mein G, Zilkha E.** Cerebral blood-flow and viscosity in relative polycythaemia. *Lancet* 2: 873–877, 1979.
19. **Langille BL, O'Donnell F.** Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 231: 405–407, 1986.
20. **Martini J, Carpentier B, Negrete AC, Frangos JA, Intaglietta M.** Paradoxical hypotension following increased hematocrit and blood viscosity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2136–H2143, 2005.
21. **Neunteufl T, Heher S, Stefanelli T, Pabinger I, Gisslinger H.** Endothelial dysfunction in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol* 115: 354–359, 2001.
22. **Oechslin E, Kiowski W, Schindler R, Bernheim A, Julius B, Brunner-La Rocca HP.** Systemic endothelial dysfunction in adults with cyanotic congenital heart disease. *Circulation* 112: 1106–1112, 2005.
23. **Olesen SP, Clapham DE, Davies PF.** Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* 331: 168–170, 1988.
24. **Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC.** Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101: 731–736, 1998.
25. **Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T, Shaw S, Lindberg RL, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Luscher TF, Gassmann M.** Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11609–11613, 2000.
26. **Salazar Vazquez BY, Martini J, Chavez Negrete A, Tsai AG, Forconi S, Cabrales P, Johnson PC, Intaglietta M.** Cardiovascular benefits in moderate increases of blood and plasma viscosity surpass those associated with lowering viscosity: experimental and clinical evidence. *Clin Hemorheol Microcirc* 44: 75–85, 2010.
27. **Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, Sarni M, Housset B, Weitzenblum E, Matrat M, Le Corvoisier P, Rideau D, Boczkowski J, Dubois-Rande JL, Chouaid C, Adnot S.** Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 566–571, 2009.
28. **Schuler B, Arras M, Keller S, Rettich A, Lundby C, Vogel J, Gassmann M.** Optimal hematocrit for maximal exercise performance in acute and chronic erythropoietin-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 419–423, 2010.
29. **Sin DD, Man SF.** Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 107: 1514–1519, 2003.
30. **Wautier MP, El Nemer W, Gane P, Rain JD, Cartron JP, Colin Y, Le Van Kim C, Wautier JL.** Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythaemia vera is mediated by laminin alpha5 chain and Lu/BCAM. *Blood* 110: 894–901, 2007.
31. **Yates CJ, Berent A, Andrews V, Dormandy JA.** Increase in leg blood-flow by normovolaemic haemodilution in intermittent claudication. *Lancet* 2: 166–168, 1979.
32. **York EL, Jones RL, Menon D, Sproule BJ.** Effects of secondary polycythemia on cerebral blood flow in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 121: 813–818, 1980.

Endothelium in polycythemia secondary to obstructive lung disease

Giuseppe Mancia and Cristina Giannattasio

University of Milano-Bicocca, Clinica Medica, Ospedale San Gerardo, Monza, Milan, Italy

THE ROLE OF ENDOTHELIAL FUNCTION in the regulation of the normal and diseased cardiovascular system has been one of the most popular areas of investigation in the past decades. This is justified by the importance of the substances released from the endothelium in normal and abnormal conditions. Just to quote a few examples, nitric oxide (NO), i.e., the most important vasodilator substance released by endothelial cells, importantly contributes to maintenance of vital organ perfusion at rest and under a variety of environmental stimuli (9, 10). Also, a reduced release of NO (and perhaps an increased secretion of endothelin and other endothelial products with a vasoconstrictor effect) may be involved in the initiation of hypertension as well as in the maintenance of elevated blood pressure values after hypertension appears (5). Finally, an abnormal balance between NO and endothelin secretion represents the first step in the cascade of events that leads to atherosclerosis (7), i.e., the anatomic lesion primarily responsible for coronary heart disease, stroke, and peripheral artery disease, and thus for the leading position of cardiovascular disease as the first cause of death worldwide (11).

Studying endothelial function and dysfunction in humans has always been a demanding task, however (6). First, methods based on the vasodilator response to infusion of selective endothelial stimulators (acetylcholine, bradykinin, etc.) require cannulation of the brachial artery, which severely limits their use in conditions other than the strictly experimental ones. Second, noninvasive methods such as the forearm vasodilation or the increase in radial artery diameter in response to the hyperemia generated by release of a previous ischemia may be unable to precisely quantify the stimulus as well as to properly identify the timing of the response (which is characterized by a highly dynamic profile), with resulting limited within- and between-laboratory reproducibility (3). Third, administration of substances that block the baseline release of NO, such as *N*-monomethyl-*L*-arginine (*L*-NMMA), although addressing a crucial issue such as the tonic contribution of endothelium to cardiovascular regulation, can only be used by expert investigators, given the potential risk of generalized or local vasoconstrictor effects. Finally, in humans endothelial function when studied in skeletal muscle and skin tissues, leaves the question whether the results reflect endothelium-dependent vascular modulation in the viscera unanswered (7). These are some of the reasons that current guidelines on cardiovascular prevention do not yet include endothelial function among the markers of organ damage to search for in quantifying the baseline cardiovascular risk as well as their modifications by treatment (8).

The study of Boyer et al. (1) in this issue of the *Journal of Applied Physiology* has two merits. First, endothelial function was studied in individuals with polycythemia secondary to

obstructive lung disease, a condition not commonly addressed by cardiovascular investigators, although its presence is associated with a clearcut increase in cardiovascular risk (2). Second, the authors made use of virtually all techniques available in humans to determine endothelium-dependent modulation of vascular tone, an unusual effort that differentiates this study from most other studies so far published. The results provide evidence that in polycythemic patients with obstructive lung disease the forearm vasoconstriction induced by *L*-NMMA administration was not reduced compared with controls, while the brachial artery dilatation in response to postischemic hyperemia was increased. This suggests that in this condition the endothelium exerts a tonic and phasic vascular modulation that it is not less than that seen in individuals with normal blood cell counts and no lung disease. In other words, these patients can still count on the endothelial component of cardiovascular regulation.

Does this allow one to conclude that in patients with obstructive lung disease and polycythemia endothelial vascular modulation is not at all impaired? Our opinion, perhaps not entirely in line with that of the authors of the present study, is that this remains an open question. First of all, the present study is based on a relatively small number of subjects, which limits the statistical power to see between-group differences. Second, as pointed out by the authors, patients had a relatively mild degree of polycythemia, which does not allow one to exclude that endothelial dysfunction occurs when obstructive lung disease, and secondary alterations in hematocrit and blood viscosity, are more severe. Third, the different methods used to quantify endothelial function did not produce entirely consistent results. That is, while polycythemic subjects showed an unaltered vascular response to *L*-NMMA and a greater brachial artery vasodilation to postischemic hyperemia [possibly, however, because polycythemia is associated with a greater wall shear stress for a given increase in blood flow (4)], their ability to vasodilate during acetylcholine infusion was markedly impaired, although, surprisingly, this did not occur with other substances, such as bradykinin, also stimulating NO release from the endothelium. This inconsistency, however, has important methodological implications because it directs attention to the difficulty of studying endothelial function with current methods, and the risk of giving only a partial view when a single method is used. It is a further merit of the present study to focus investigators' attention on this important methodological issue via the data provided by a demanding protocol.

DISCLOSURES

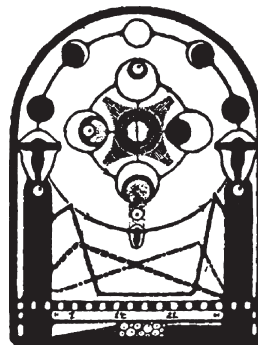
No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

1. Boyer L, Chaar V, Pelle G, Maitre B, Chouaid C, Covali-Noroc A, Zerah F, Bucherer C, Lacombe C, Housset B, Dubois-Randé J, Boczkowski J, Adnot S. Effects of polycythemia on systemic endothelial function in chronic hypoxic lung disease. *J Appl Physiol* (January 20, 2011). doi:10.1152/jappphysiol.01204.2010.

Address for reprint requests and other correspondence: C. Giannattasio, Clinica Medica, Milano-Bicocca Univ. and S.Gerardo Hospital, Monza, Italy (e-mail: cristina.giannattasio@unimib.it).

2. **Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC, Vestbo J; TORCH investigators.** Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 356: 775–789, 2007.
3. **Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ.** Endothelial function and dysfunction. I. Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 23: 7–17, 2005.
4. **Giannattasio C, Piperno A, Failla M, Vergani A, Mancia G.** Effects of hematocrit changes on flow-mediated and metabolic vasodilation in humans. *Hypertension* 20, 74–77, 2002.
5. **King AJ, Marsden PA, Brenner B.** Endothelin a potent vasoactive peptide of endothelial origin. *Hypertension Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, edited by Laragh J, Brenner BM. Raven, 1990, chapt. 42, p. 649–660.
6. **Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H.** Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues, and clinical applications. European Network for noninvasive investigation in large arteries. *Eur Heart J* 27: 2588–2605, 2006.
7. **Libby P.** The vascular biology of atherosclerosis. In: *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, edited by Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. Elsevier-Saunders, 2005, chapt. 35, p. 921–938, 2005.
8. **Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Struijker-Boudier HA, Zanchetti A.** Management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension, European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of ESH and ESC. *J Hypertens* 25: 1105–1187, 2007.
9. **Vallance P, Collier J, Moncada S.** Effects of endothelium derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2: 997–1000, 1989.
10. **Vanhoutte PM.** Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 13: 658–667, 1989.
11. **Yach D, Hawkes C, Gould CL, Hofman KJ.** The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control. *JAMA* 291: 2616–2622, 2004.



1 **Polycythemia, vascular function, and hemoglobin-nitric oxide reactions**

2
3 Felicity Andreotti, MD, PhD; Teodosio Pafundi, MD; Filippo Crea, MD; Giulio Coluzzi, MD;
4 ¹Attilio Maseri, MD.

5
6 Institute of Cardiology, Catholic University Hospital, Rome, IT and ¹Heart Care Foundation, Via La
7 Marmora 36, Florence, IT

8
9 word count of text: 389

10
11 Address for correspondence:

12 Dr. F. Andreotti, MD, PhD

13 Institute of Cardiology, Catholic University Hospital

14 Largo Gemelli 8, 00168 Rome, IT

15 Tel. +39-06-30155415

16 Fax +39-06-3055535

17 Email felicita.andreotti@iol.it

18
19 Boyer et al. carefully investigate brachial artery (BA) perfusion in 15 polycythemic (P) and 13
20 normocythemic (N) patients with chronic obstructive pulmonary disease, matched for age, gender,
21 smoking, blood pressure, heart rate, lung function and blood gases (2). P vs N had not only higher
22 mean hemoglobin concentrations ([Hb]: 17.4 vs 14.3 g/dl) but also larger mean BA diameters (5.2
23 vs 4.5 mm, $p < 0.02$), which directly correlated with [Hb] ($p < 0.01$). Wall shear was not significantly
24 higher in P vs N (despite greater blood viscosity), given the inverse relation between shear and
25 vessel radius (2). P vs N appeared to show greater brachial flow-mediated dilatation in response to
26 hyperemia (FMD), with significantly reduced dilatation to acetylcholine, and similar responses to
27 bradykinin, substance P and N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA). The Authors conclude that P
28 vs N exhibit appropriate basal and stimulated BA nitric oxide (NO) release (2).

29 We propose the following considerations to further interpret the above findings: i) the blood
30 pool of NO goes beyond the “instantaneous” endothelial capacity of NO synthesis (indirectly
31 assessed by L-NMMA inhibition of NO synthase) and comprises nitrosyl-/nitroso-proteins,
32 including intracellular Hb (5). ii) Lower NO bioavailability in blood has been reported among stable
33 anemic vs matched non-anemic patients (1). iii) The direct relation reported by Boyer et al. between
34 [Hb] and FMD conflicts with an *inverse* relation consistently described by others in hypertensive,
35 diabetic, anemic and healthy subjects (3,6). iv) DeoxyHb (but not oxyHb) releases bioactive NO
36 and is a recognised crucial mediator of physiologic hypoxic dilatation of the systemic
37 microcirculation (5) and, consequently, of upstream arteries (4). v) The physiologic deoxyHb-NO
38 reactions may explain several findings by Boyer et al. in P vs N, e.g., the larger baseline BA
39 diameter and the reduced BA response to acetylcholine. These (as well as the well-established
40 reduced FMD with increasing [Hb]) (3,6) may simply reflect a reduced dilator potential of basally
41 dilated systemic arteries and arterioles in P vs N. Bradykinin and substance P, more than
42 acetylcholine, can act independently of NO (4) and this might explain the similar vessel response to
43 these agents in P vs N.

44 While agreeing with Boyer et al.’ overall conclusions, we believe Hb’s carriage of NO in red
45 blood cells and deoxyHb’s release of NO in the systemic microcirculation need to be considered
46 when comparing systemic vascular function of P vs N individuals.

47
48 References

- 49 1. **Andreotti F, Coluzzi G, Lavorgna A, Marzo F, Di Stasio E, Carrozza C, Zuppi C, Crea**
50 **F.** Relation between nitric oxide metabolites and haemoglobin concentration in patients with
51 ischaemic heart disease. Heart 2007;93:255-257.

- 52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
2. **Boyer L, Char V, Pelle G, Maitre B, Chouaid C, Covali-Noroc A, Zerah F, Bucherer C, Lacombe C, Housset B, Dubois-Randé JL, Boczkowski J, Adnot S.** Effect of polycythemia on systemic endothelial function in chronic hypoxic lung disease. *J Appl Physiol* 2011 Jan 20 [Epub ahead of print].
 3. **Gladwin MT, Schechter AN, Ognibene FP, Coles WA, Reiter CD, Schenke WH, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA, Cannon RO.** Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation* 2003;107:271-278.
 4. **Inokuchi K, Hirooka Y, Shimokawa H, Sakai K, Kishi T, Ito K, Kimura Y, Takeshita A.** Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human forearm circulation. *Hypertension* 2003;42:919-924.
 5. **Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS.** S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ Res* 2010;106:633-646.
 6. **Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, Gulec M, Kilic S, Eyiletten T, Calgar K, Oguz Y, Vural A, Yenicesu M, Zoccali C.** Hemoglobin is inversely related to flow mediated dilatation in chronic kidney disease. *Kidney International* 2009;75:1316-1321.

Reply to Andreotti, Pafundi, Crea, Coluzzi, and Maseri

Laurent Boyer and Serge Adnot

Hôpital Henri Mondor, Service de Physiologie Explorations Fonctionnelles, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris-Est Créteil Val de Marne, Créteil; and INSERM, Unité U955, Créteil, France

ROLE OF HEMOGLOBIN IN SYSTEMIC ENDOTHELIAL FUNCTION

TO THE EDITOR: Andreotti F et al. (1) suggest that endothelium-dependent release of NO may not fully explain the results reported in our study (4). We agree that Hb's carriage of NO in red blood cells and deoxyHb's release of NO probably play a role for explaining the difference in vascular reactivity between polycythemic and normocythemic patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, we disagree with these investigators' statement that there is a well-established "inverse relation consistently described by others" between Hb and flow-mediated dilatation (FMD) in "diabetic, anemic, and healthy subjects." One of the cited references applies to patients with sickle cell disease (5) and shows similar results as those we previously reported, i.e., an increased vasodilatory response to acetylcholine and a decreased FMD in these patients (3). The other reference cited by these investigators applies to patients with chronic kidney disease in whom anemia can be associated with various confounding factors and is a marker of disease severity (7). In our experience, we always found a positive relationship between Hb and FMD in patients with various diseases, including sickle cell anemia (3), COPD (4), and, more recently atherosclerosis (2, 6). We thus agree with Andreotti F et al. (1) that further studies are needed to better understand how Hb levels can affect

systemic and pulmonary vascular reactivity in various physiological and pathological conditions.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s). AQ:6

REFERENCES

1. Andreotti F, Pafundi T, Crea F, Coluzzi G, Maseri A. Polycythemia, vascular function, and hemoglobin-nitric oxide reactions. *J Appl Physiol*. doi:10.1152/jappphysiol.00365.2011.
2. Belhassen L, Pelle G, Dubois-Randé JL, Adnot S. Improved endothelial function by the thromboxane A₂ receptor antagonist S 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *J Am Coll Cardiol* 41: 1198–1204, 2003.
3. Belhassen L, Pelle G, Sediame S, Bachir D, Carville C, Bucherer C, Lacombe C, Galacteros F, Adnot S. Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood* 97: 1584–1589, 2001.
4. Boyer L, Chaar V, Pelle G, Maitre B, Chouaid C, Covali-Noroc A, Zerah F, Bucherer C, Lacombe C, Housset B, Dubois-Randé JL, Boczkowski J, Adnot S. Effects of polycythemia on systemic endothelial function in chronic hypoxic lung disease. *J Appl Physiol* (January 20, 2011). doi:10.1152/jappphysiol.01204.2010.
5. Gladwin MT, Schechter AN, Ognibene FP, Coles WA, Reiter CD, Schenke WH, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA, Cannon RO 3rd. Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation* 107: 271–278, 2003.
6. Lesault PF, Boyer L, Pelle G, Covali-Noroc A, Rideau D, Akakpo S, Teiger E, Dubois-Randé JL, SA. Daily administration of the TP receptor antagonist terutroban improved endothelial function in high-cardiovascular-risk patients with atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol*. doi:10.1111/1365-2125.2010.03858.x.
7. Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, Gulec M, Kilic S, Eyleten T, Caglar K, Oguz Y, Vural A, Yenicesu M, Zoccali C. Hemoglobin is inversely related to flow-mediated dilatation in chronic kidney disease. *Kidney Int* 75: 1316–1321, 2009.

Address for reprint requests and other correspondence: S. Adnot, Service de Physiologie Explorations Fonctionnelles, Hôpital Henri Mondor, 51, Ave. du Mal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France (e-mail: serge.adnot@inserm.fr).

7. Discussion

Les résultats principaux de la première partie de ce travail de thèse sont les suivants : 1) iNOS et eNOS étaient induits de manière diffuse dans le poumon des souris après une instillation d'élastase 2) l'induction d'iNOS dans le poumon était responsable d'une accumulation de protéines nitrées dans les pneumocytes de type 2, et à un moindre degré dans les macrophages, 3) l'activité d'iNOS n'était pas nécessaire pour l'induction de l'inflammation pulmonaire après instillation d'élastase 4) l'inactivation d'iNOS augmentait le niveau de stress oxydatif dans le poumon après instillation d'élastase 5) l'inactivation d'iNOS et d'eNOS ne prévient pas le développement de l'emphysème induit par l'élastase. Ces résultats apportaient la preuve que la nitration des protéines induite par iNOS dans les pneumocytes de type 2 accompagnait mais n'était pas nécessaire au développement de l'emphysème induit par l'élastase chez la souris.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons exploré les effets d'une polyglobulie modérée sur la fonction endothéliale et indirectement la libération de NO par eNOS chez des patients présentant une BPCO. Nous avons montré que les patients polyglobuliques ajustaient leurs forces de cisaillement en condition de base ou en réponse à une augmentation du flux sanguin en augmentant leur diamètre artériel. Bien que la vasodilatation induite par l'acétylcholine soit altérée nettement chez les patients polyglobuliques, la réponse vasodilatatrice au SNP, BK, SP et isoptine ne différait pas de manière significative entre les groupes. L'ensemble de ces résultats suggérait que la polyglobulie modulerait la libération de NO par eNOS et pourrait ne pas avoir d'effet délétère sur la fonction vasculaire.

Dans la première étude, nous avons démontré une augmentation de l'expression de eNOS et iNOs après instillation d'élastase. Cette augmentation n'était pas d'emblée maximale atteignant un maximum 7 jours après instillation. Une augmentation de l'expression d'iNOS et une nitration accrue des protéines avaient été antérieurement décrite dans le poumon de patients atteints de BPCO aussi bien qu'au cours de l'emphysème expérimental induit par l'inhibition des récepteurs du VEGF ou le déficit en protéine D du surfactant, mais il n'avait pas été démontré si ces phénomènes contribuaient à l'élargissement des espaces aériens dans ces modèles, mais on pouvait le suspecter. En effet, iNOS contribue l'excès d'inflammation et au remodelage observé dans d'autres modèles d'agression pulmonaire comme la pneumonie induite par une endotoxine (316), les lésions induites par la ventilation (317), et la fibrose pulmonaire induite par la silice (318). Contrastant avec ses observations, nous observons que, alors qu'iNOS était fortement induite dans le poumon après instillation d'élastase, l'inactivation d'iNOS et la diminution de la nitration des protéines associées n'avaient pas d'impact sur l'inflammation

pulmonaire et le développement de l'emphysème. De manière intéressante, l'absence de relation de cause à effet entre la nitration des protéines relative à iNOS et la destruction du tissu pourrait être un fait général des modèles de maladies induites par l'élastase dans des tissus riches en élastine, puisque des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle anévrisme aortique abdominal induit par l'exposition à l'élastase (319). L'activité d'iNOS étant régulée post transcriptionnellement, on pourrait suggérer que l'absence d'effet de l'inhibition d'iNOS est liée à un faible niveau d'activité d'iNOS dans ce modèle. Cependant, les résultats suggèrent qu'iNOS est active dans le poumon ayant reçu une instillation d'élastase, puisque l'inactivation d'iNOS est associée à une réduction de la nitration des protéines pulmonaires, un phénomène directement lié à la production de NO (243). La myeloperoxydase du neutrophile peut induire une nitration protéique en présence de nitrite ou de peroxyde d'hydrogène (320). Le fait que l'inactivation d'iNOS réduise la nitration des protéines induite par l'élastase en l'absence de réduction du nombre de polynucléaires neutrophiles est plutôt contre l'hypothèse d'un rôle majeur des myeloperoxydase dans la nitration des protéines dans ce modèle.

La question de l'absence d'augmentation de l'activité d'eNOS se pose de manière plus nette car on n'observe ni modification morphologique ni biochimique avec l'inactivation d'eNOS. Nous aurions pu attendre une aggravation des lésions d'emphysème chez les souris eNOS $-/-$. En effet, eNOS et le NO stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales et jouent un rôle important dans le développement pulmonaire et l'angiogénèse (321). Ainsi, eNOS est impliquée dans l'alvéologénèse compensatrice après pneumonectomie (270). Cela est d'autant plus important que les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire et que la viabilité des cellules endothéliales est indispensable au maintien de la structure alvéolaire. Des preuves croissantes chez l'homme et l'animal établissent un lien entre la destruction tissulaire et l'apoptose des cellules alvéolaires (endothéliales et épithéliales) (53, 54, 322). L'apoptose des cellules endothéliales est elle-même suffisante pour induire une destruction alvéolaire et un emphysème chez la souris (323) (55, 56, 324). L'absence d'effet de l'inactivation d'eNOS sur l'emphysème induit par l'élastase pourrait être expliquée par le fait que ce modèle induit un dommage essentiellement alvéolaire qui concerne l'ensemble des cellules de la paroi alvéolaire. Cependant, l'induction d'un emphysème spontané par l'induction d'une apoptose des cellules endothéliales correspond à des modèles animaux très spécifiques, sans exposition au déterminant environnemental majeur de l'emphysème qui est le tabac. De même, l'induction d'un emphysème spontané suite au blocage des récepteurs au VEGF doit probablement être lié à une diminution de l'expression d'eNOS et de la disponibilité en NO car le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales via la production de NO par eNOS (321). Cependant, eNOS, le niveau d'eNOS et la nitration protéique n'ont pas été évaluées dans ces modèles (56, 324). De même, l'inactivation de la caveoline conduit à une activation d'eNOS et à une production accrue de NO; les souris caveoline $-/-$ sont protégées de l'emphysème induit par la fumée de cigarette, mais

étonnamment ce n'est pas par ce mécanisme que les auteurs expliquent l'effet protecteur, mais par une protection vis-à-vis de la sénescence des fibroblastes pulmonaires induite par la fumée de cigarette (307). Ainsi, le rôle des cellules endothéliales et de l'endothélium est sûrement important dans la genèse de l'emphysème mais il ne s'agit pas d'un mécanisme exclusif et il s'intègre dans les dommages des autres cellules constituant la paroi alvéolaire avec lesquelles il interagit.

Si la première partie de ce travail ne met pas en évidence de rôle d'eNOS dans le développement de l'emphysème induit par l'élastase, la deuxième partie montre de manière indirecte que l'activité d'eNOS est modulée au niveau de l'endothélium artériel par le niveau d'hémoglobine et les forces de cisaillement et qu'elle intervient dans la régulation du tonus vasculaire au cours de la BPCO hypoxémique. Cependant, eNOS n'est peut-être la seule source de NO au niveau de l'endothélium vasculaire et d'autres NOS pourraient être impliquées en conditions pathologiques. L'hypoxie réoxygénation au cours du SAOS est associée à une dysfonction endothéliale évaluée par la mesure de la FMD et une augmentation de l'expression non seulement d'eNOS mais aussi d'iNOS et de la nitrotyrosine est observée dans les cellules endothéliales de patients présentant un SAOS comparés à des témoins (309). Il n'est pas exclu que de telles modifications puissent être observées au niveau vasculaire chez les patients présentant une BPCO. Depuis de nombreuses années, il a été montré qu'iNOS ainsi que la nitrotyrosine était présente au niveau des macrophages, des cellules musculaires lisses dans les plaques d'athérosclérose (325). Étonnamment, iNOS pourrait moduler de manière différente le degré d'athérosclérose par rapport à eNOS (326). En effet, de nombreux arguments sont en faveur d'un effet protecteur de l'inhibition d'iNOS, en particulier dans les modèles animaux d'athérosclérose (327-331). La surexpression d'iNOS pourrait même annuler l'effet protecteur lié à la surexpression d'eNOS (328) et la surexpression d'iNOS dans des artères de lapin annule l'effet vasodilatateur de l'acétylcholine et du nitroprusside (331). L'athérosclérose est généralement considérée comme un état lié à une diminution de la disponibilité en NO et ce rôle aggravant associé à iNOS semble difficile à expliquer. La principale explication est probablement que les grandes quantités de NO produites par iNOS peuvent s'associer à l'anion superoxide pour générer du peroxy-nitrite en quantité suffisante pour annuler les effets d'eNOS sur la vasodilatation. À noter qu'iNOS elle-même peut produire de l'anion superoxide dans certaines conditions, comme l'hypoxie (332). Cependant, iNOS est fortement induite lors des processus inflammatoires et l'absence de différence observées en terme d'inflammation systémique entre les patients polyglobuliques et les normoglobuliques suggèrent que des niveaux différents d'expression et d'activité d'iNOS entre ces deux groupes ne sont pas évidentes et ne participent pas aux différences de fonction endothéliale observées.

Nous avons montré par ailleurs dans le poumon des souris ayant reçu une instillation d'élastase qu'iNOS prévenait l'augmentation des marqueurs de stress oxydant liés à un niveau accru

d'anion superoxide. Cette étude ne permettait pas de déterminer si cet effet était lié à la réaction du NO avec le superoxide ou à une diminution de production d'anion super oxide. Cependant, la diminution de la nitration des protéines, témoignant de la diminution de production de peroxy-nitrite et associée à l'inactivation d'iNOS, est plutôt en faveur de la première explication. Si nous avons pu mettre en évidence ce processus au niveau pulmonaire, il pourrait aussi être effectif au niveau systémique au cours de la BPCO. En effet, l'activation d'eNOS induite par plusieurs thérapeutiques est associée à une amélioration de la fonction endothéliale évaluée par la réponse à l'acétylcholine et à la bradykinine, sans modification de la réponse aux facteurs non endothélium dépendants. Mais surtout, elle est associée à une diminution d'anion superoxide (333) (334, 335). L'amélioration de la fonction endothéliale est non seulement due à la disponibilité accrue du NO mais aussi à une diminution de l'anion superoxide qui en lui-même peut induire une dysfonction endothéliale (336). Cependant, d'après les auteurs, le mécanisme impliqué ne serait pas lié à l'épuration des anions superoxides lors de leur réaction avec le NO pour produire du peroxy-nitrite, mais au découplage d'eNOS : en présence de ses co facteurs comme la tétrahydrobioptérine, eNOS est activée, augmente sa production de NO. En l'absence de cofacteur, il existe un découplage d'eNOS qui va diminuer sa production de NO et produire paradoxalement des anions superoxides. En faveur de cette hypothèse, la supplémentation en tétrahydrobioptérine diminue la production d'anion super oxide, mais aussi celle de peroxy-nitrites. La diminution de la concentration en folates, qui interfèrent avec la tétrahydrobioptérine, dans le sérum des sujets BPCO pourrait suggérer que ce mécanisme participe à la dysfonction endothéliale observée au cours de la BPCO. Cependant, il est difficile de déterminer s'il participe aux différences de fonction endothéliale observées entre les patients polyglobuliques et normoglobuliques.

Malgré cela, il n'est pas exclu qu'il existe des interactions entre l'hémoglobine, le nombre d'érythrocytes et les l'excès de stress oxydant, en particulier le niveau de peroxy-nitrites générés. Nous avons montré que les patients polyglobuliques adaptaient leur tonus vasculaire à l'augmentation de la viscosité sanguine induite par la polyglobulie en augmentant leur diamètre vasculaire afin de maintenir des forces de cisaillement identiques. On a pu montrer qu'à l'état de base, la réponse à un inhibiteur des NOS, le LNMMA, ne différait pas significativement entre le groupe des patients polyglobuliques et les normoglobuliques. Cela suggérerait que des quantités équivalentes de NO étaient libérées par l'endothélium entre les deux groupes, en lien avec des valeurs de force de cisaillement équivalentes. Mais ces résultats pouvaient aussi suggérer la présence d'un élargissement structurel des vaisseaux, par opposition à la vasodilatation active, pour expliquer l'augmentation du diamètre chez les patients polyglobuliques à l'état base. En effet, l'augmentation chronique du flux sanguin est associée à un élargissement du diamètre des vaisseaux systémiques (337). Notre suggestion est que les globules rouges lorsqu'ils sont soumis à un stress oxydant ou nitrosatif, comme c'est le cas lors de la BPCO, pourraient aussi contribuer au remodelage vasculaire observé.

Plusieurs arguments expérimentaux vont dans ce sens :

1) en condition normale, les globules rouges sont bien dispersés, leur adhérence à l'endothélium est insignifiante et leur déformabilité est suffisante pour passer à l'intérieur des capillaires. Cependant, lorsqu'ils sont exposés à un stress de type oxydatif, leur adhérence à l'endothélium est augmentée et leur déformabilité diminuée (338, 339), ce qui participe à la genèse de la plaque d'athérome et au remodelage vasculaire (340). Certes, ceci ne permet pas d'expliquer les différences observées entre les patients polyglobuliques et normoglobuliques, mais pourrait participer à l'athérosclérose accrue chez les BPCO. Pour corroborer cette hypothèse, les globules rouges des patients BPCO ont des anomalies morphologiques similaires à celles de globules rouges de sujets sains exposés *in vitro* aux peroxynitrites (341, 342). Ces anomalies sont réversibles après traitement *in vivo* et *in vitro* par la N-acétylcystéine (341). Contre cette hypothèse, le rapport viscosité sur hématoците n'est pas différent entre les patients polyglobuliques et normoglobuliques, suggérant qu'il n'y pas d'autres facteurs que le niveau d'hématoците pour expliquer la différence de viscosité entre les deux groupes.

2) les peroxynitrites induisent une sénescence accélérée des globules rouges caractérisée par une réduction et un réarrangement de l'expression de Band 3 à leur surface, une externalisation de la phosphatidylserine entre autres (343-345). Ces anomalies permettent la reconnaissance des globules rouges sénescents par les macrophages qui les phagocytent et les éliminent (346). Certaines de ces modifications des globules rouges ont pu être observées au cours de la BPCO ; elles pourraient s'intégrer dans le vieillissement accéléré global observé au cours de cette maladie (181, 341). De plus, la sénescence accélérée des globules rouges conduit à une diminution de leur durée de vie. Elle pourrait expliquer que certains patients hypoxémiques restent normoglobuliques par opposition aux patients polyglobuliques, malgré des niveaux d'érythropoïétine identiques (192). Cette hypothèse est attrayante car l'origine de la polyglobulie reste largement inexplicée. Par exemple, il n'a pas pu être mis en évidence de sensibilité moindre à l'érythropoïétine des cellules progénitrices érythroïdes chez les patients normoglobuliques par rapport aux polyglobuliques (192). Contre cette hypothèse, les globules rouges des souris polyglobuliques par surexpression de l'érythropoïétine présentent de critères de vieillissement accéléré et ont une durée de vie 70% plus courte que celle des souris sauvages (347).

Ainsi, l'excès de stress oxydatif ou nitrosatif pourrait expliquer que certains patients hypoxémiques n'augmentent pas leur hématoците du fait d'une durée de vie moindre de leurs globules rouges. Chez ces mêmes patients, cet excès pourrait être aussi à l'origine d'une adhésion plus importante des globules rouges à l'endothélium, participant ainsi au développement de l'athérosclérose et à la dysfonction endothéliale.

Ces deux études posent la question de l'intérêt des traitements d'une part inhibant les NOS, d'autre part majorant l'hématocrite en vue d'améliorer la fonction endothéliale. En ce qui concerne les inhibiteurs des NOS, l'aminoguanidine est inhibiteur spécifique d'iNOS qui est disponible chez l'homme, utilisé sous forme d'aérosols (348). Cet inhibiteur a été testé chez les patients BPCO ; de manière intéressante, il induit une diminution du NO expiré et du peroxy-nitrite, de la nitrotyrosine dans l'expectoration induite, mais sans modification de la fonction respiratoire à 24 heures (349). Une prise plus prolongée serait nécessaire pour déterminer l'impact de ce type de traitement sur l'évolutivité de la maladie, notamment sur la fréquence des exacerbations. L'évaluation concomitante de l'effet sur la fonction endothéliale serait par ailleurs nécessaire.

En ce qui concerne les traitements visant à augmenter l'hématocrite, l'érythropoïétine semble le traitement de choix, d'autant plus qu'elle pourrait avoir des effets bénéfiques directs sur le système vasculaire (350). Ceci serait d'autant plus intéressant lorsque les patients BPCO présentent une anémie associée, dont on connaît le pronostic défavorable dans cette maladie (14, 216). Cependant, si le traitement par érythropoïétine semble améliorer la tolérance à l'effort et les symptômes chez les patients insuffisants cardiaques anémiques, il est clair qu'il ne diminue pas la survenue d'événements cardiovasculaires et la mortalité chez les patients insuffisants rénaux ou diabétiques, voire même augmente les accidents vasculaires cérébraux (351, 352). D'autres thérapeutiques augmentant l'hématocrite sont envisageables, comme la supplémentation en fer qui améliore l'hypertension artérielle pulmonaire hypoxique d'altitude (215) et améliore les performances à l'effort, les symptômes et la qualité de vie des patients insuffisants cardiaques quel que soit le niveau d'hémoglobine initial (353).

Conclusion :

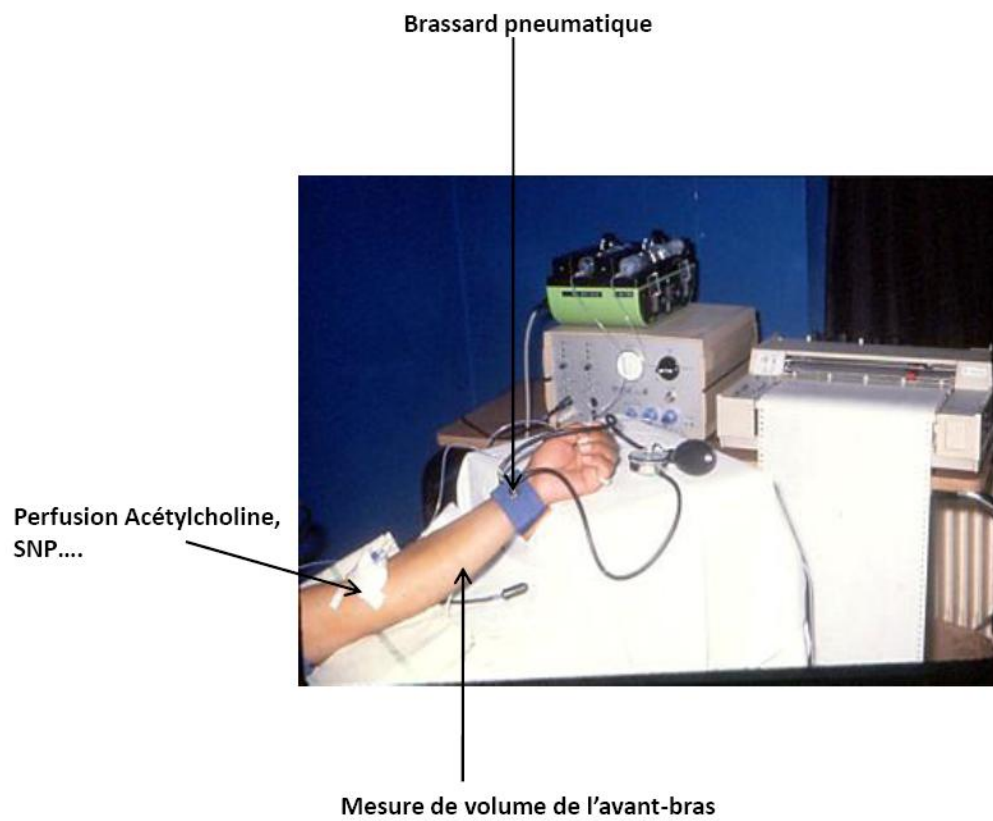
Si des données solides confirment le rôle critique d'un excès de radicaux libres de l'oxygène dans le développement de l'emphysème, la première partie de ce travail montre que ni iNOS, eNOS ou la nitration des protéines pulmonaires ne sont nécessaires pour le développement de l'emphysème induit par l'élastase, suggérant qu'un excès de radicaux libres de l'azote pourrait ne pas être un acteur important dans le développement de l'emphysème.

A l'inverse, la deuxième partie de ce travail suggère que l'endothélium des patients BPCO adapte son niveau de libération de NO par eNOS en réponse aux variations des forces de cisaillement liée aux différents niveaux d'hémoglobine. De ce fait, la polyglobulie ne semble pas avoir d'effet délétère sur la fonction endothéliale, elle pourrait même l'améliorer, même si cette étude ne permet pas de déterminer si la polyglobulie diminue le risque cardiovasculaire à long terme chez les patients souffrant de BPCO.

8. Annexes

8.1. Annexe 1 : photographies des techniques d'évaluation de la fonction endothéliale

Pléthysmographie d'occlusion veineuse



Vasodilatation flux induite (FMD)

Echotracking
vasculaire haute
résolution

Brassard
pneumatique



9. Bibliographie

1. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with copd: A summary of the ats/ers position paper. *Eur Respir J* 2004;23:932-946.
2. Pauwels RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (copd). *Lancet* 2004;364:613-620.
3. Roche N, Huchon G. [epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease]. *Rev Prat* 2004;54:1408-1413.
4. Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, Agusti AG. Mortality in copd: Role of comorbidities. *Eur Respir J* 2006;28:1245-1257.
5. Brindicci C, Ito K, Resta O, Pride NB, Barnes PJ, Kharitonov SA. Exhaled nitric oxide from lung periphery is increased in copd. *Eur Respir J* 2005;26:52-59.
6. Maestrelli P, Paska C, Saetta M, Turato G, Nowicki Y, Monti S, Formichi B, Miniati M, Fabbri LM. Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe copd patients. *Eur Respir J* 2003;21:971-976.
7. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
8. Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC, Vestbo J. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007;356:775-789.
9. Moro L, Pedone C, Scarlata S, Malafarina V, Fimognari F, Antonelli-Incalzi R. Endothelial dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Angiology* 2008;59:357-364.
10. 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;176:1200-1207.
11. Eickhoff P, Valipour A, Kiss D, Schreder M, Cekici L, Geyer K, Kohansal R, Burghuber OC. Determinants of systemic vascular function in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1211-1218.
12. Maclay JD, McAllister DA, Mills NL, Paterson FP, Ludlam CA, Drost EM, Newby DE, Macnee W. Vascular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:513-520.
13. Garcia-Aymerich J, Gomez FP, Benet M, Farrero E, Basagana X, Gayete A, Pare C, Freixa X, Ferrer J, Ferrer A, et al. Identification and prospective validation of clinically relevant chronic obstructive pulmonary disease (copd) subtypes. *Thorax*;66:430-437.
14. Chambellan A, Chailleux E, Similowski T. Prognostic value of the hematocrit in patients with severe copd receiving long-term oxygen therapy. *Chest* 2005;128:1201-1208.
15. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of

chronic obstructive pulmonary disease: Gold executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:532-555.

16. Celli B, Decramer M, Kesten S, Liu D, Mehra S, Tashkin DP. Mortality in the 4-year trial of tiotropium (uplift) in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:948-955.

17. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, Decramer M. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008;359:1543-1554.

18. Fishman A, Martinez F, Naunheim K, Piantadosi S, Wise R, Ries A, Weinmann G, Wood DE. A randomized trial comparing lung-volume-reduction surgery with medical therapy for severe emphysema. *N Engl J Med* 2003;348:2059-2073.

19. Sciruba FC, Ernst A, Herth FJ, Strange C, Criner GJ, Marquette CH, Kovitz KL, Chiacchierini RP, Goldin J, McLennan G. A randomized study of endobronchial valves for advanced emphysema. *N Engl J Med*;363:1233-1244.

20. Thabut G, Ravaud P, Christie JD, Castier Y, Fournier M, Mal H, Leseche G, Porcher R. Determinants of the survival benefit of lung transplantation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1156-1163.

21. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balmes JR. An official american thoracic society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*;182:693-718.

22. Maritz GS. Maternal nicotine exposure during gestation and lactation of rats induce microscopic emphysema in the offspring. *Exp Lung Res* 2002;28:391-403.

23. Thielen A, Klus H, Muller L. Tobacco smoke: Unraveling a controversial subject. *Exp Toxicol Pathol* 2008;60:141-156.

24. Zhang JJ, Smith KR. Household air pollution from coal and biomass fuels in china: Measurements, health impacts, and interventions. *Environ Health Perspect* 2007;115:848-855.

25. Matheson MC, Benke G, Raven J, Sim MR, Kromhout H, Vermeulen R, Johns DP, Walters EH, Abramson MJ. Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005;60:645-651.

26. Hart JE, Laden F, Schenker MB, Garshick E. Chronic obstructive pulmonary disease mortality in diesel-exposed railroad workers. *Environ Health Perspect* 2006;114:1013-1017.

27. Snider GL, Hayes JA, Korthy AL, Lewis GP. Centrilobular emphysema experimentally induced by cadmium chloride aerosol. *Am Rev Respir Dis* 1973;108:40-48.

28. Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, Chen JJ, Yang PC. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Faseb J* 2006;20:2393-2395.

29. Goldstein DS, Karpel JP, Appel D, Williams MH, Jr. Bullous pulmonary damage in users of intravenous drugs. *Chest* 1986;89:266-269.

30. Diaz PT, Clanton TL, Pacht ER. Emphysema-like pulmonary disease associated with human immunodeficiency virus infection. *Ann Intern Med* 1992;116:124-128.

31. Diaz PT, King ER, Wewers MD, Gadek JE, Neal D, Drake J, Clanton TL. Hiv infection increases susceptibility to smoking-induced emphysema. *Chest* 2000;117:285S.

32. Petrache I, Diab K, Knox KS, Twigg HL, 3rd, Stephens RS, Flores S, Tudor RM. Hiv associated pulmonary emphysema: A review of the literature and inquiry into its mechanism. *Thorax* 2008;63:463-469.
33. Coxson HO, Chan IH, Mayo JR, Hlynsky J, Nakano Y, Birmingham CL. Early emphysema in patients with anorexia nervosa. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:748-752.
34. Sahebji H, Wirman JA. Emphysema-like changes in the lungs of starved rats. *Am Rev Respir Dis* 1981;124:619-624.
35. Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:195-205.
36. McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1419-1424.
37. Lieberman J, Winter B, Sastre A. Alpha 1-antitrypsin pi-types in 965 copd patients. *Chest* 1986;89:370-373.
38. Venembre P, Boutten A, Seta N, Dehoux MS, Crestani B, Aubier M, Durand G. Secretion of alpha 1-antitrypsin by alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 1994;346:171-174.
39. Lomas DA, Parfrey H. Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology. *Thorax* 2004;59:529-535.
40. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency . 5: Intravenous augmentation therapy: Current understanding. *Thorax* 2004;59:708-712.
41. Silverman EK, Spira A, Pare PD. Genetics and genomics of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:539-542.
42. Damiano VV, Tsang A, Kucich U, Abrams WR, Rosenbloom J, Kimbel P, Fallahnejad M, Weinbaum G. Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs. *J Clin Invest* 1986;78:482-493.
43. Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, Babyak MA, Kaschak M. Experimental emphysema: Its production with papain in normal and sillicotic rats. *Arch Environ Health* 1965;11:50-58.
44. Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol* 2003;163:2329-2335.
45. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997;277:2002-2004.
46. Churg A, Wang R, Wang X, Onnervik PO, Thim K, Wright JL. Effect of an mmp-9/mmp-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. *Thorax* 2007;62:706-713.
47. Foronjy R, Nkyimbeng T, Wallace A, Thankachen J, Okada Y, Lemaitre V, D'Armiento J. Transgenic expression of matrix metalloproteinase-9 causes adult-onset emphysema in mice associated with the loss of alveolar elastin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L1149-1157.
48. Churg A, Wang RD, Xie C, Wright JL. Alpha-1-antitrypsin ameliorates cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:199-207.
49. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1666-1672.

50. Eidelman D, Saetta MP, Ghezzi H, Wang NS, Hoidal JR, King M, Cosio MG. Cellularity of the alveolar walls in smokers and its relation to alveolar destruction. Functional implications. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:1547-1552.
51. Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ, Jr., Chapman HA, Jr., Shapiro SD, Elias JA. Inducible targeting of il-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 2000;106:1081-1093.
52. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA, Jr., Shapiro SD, Elias JA. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med* 2000;192:1587-1600.
53. Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 2005;25:250-258.
54. Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 2004;125:626-632.
55. Petrache I, Natarajan V, Zhen L, Medler TR, Richter A, Berdyshev EV, Tudor RM. Ceramide causes pulmonary cell apoptosis and emphysema: A role for sphingolipid homeostasis in the maintenance of alveolar cells. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:510.
56. Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of vegf receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000;106:1311-1319.
57. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:555-562.
58. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007;130:223-233.
59. Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: Sms-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer* 2009;9:81-94.
60. Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* 2006;281:29568-29574.
61. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:886-893.
62. Muller KC, Welker L, Paasch K, Feindt B, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Krug N, Nakashima M, Branscheid D, Magnussen H, et al. Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respir Res* 2006;7:32.
63. Morissette MC, Vachon-Beaudoin G, Parent J, Chakir J, Milot J. Increased p53 level, bax/bcl-x(l) ratio, and trail receptor expression in human emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:240-247.
64. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:643-649.
65. Nyunoya T, Monick MM, Klingelhutz A, Yarovinsky TO, Cagley JR, Hunninghake GW. Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:681-688.
66. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985;64:111-126.
67. Hubbard RC, Ogushi F, Fells GA, Cantin AM, Jallat S, Courtney M, Crystal RG. Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of

- alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1987;80:1289-1295.
68. Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:473-479.
69. Wallaert B, Aerts C, Gressier B, Gosset P, Voisin C. Oxidative inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by alveolar epithelial type ii cells. *J Appl Physiol* 1993;75:2376-2382.
70. Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hassid A, Desai LP, Waters CM. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L834-841.
71. Amara N, Bachoual R, Desmard M, Golda S, Guichard C, Lanone S, Aubier M, Ogier-Denis E, Boczkowski J. Diesel exhaust particles induce matrix metalloprotease-1 in human lung epithelial cells via a nadp(h) oxidase/nox4 redox-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L170-181.
72. Saito S, Ogawa J, Minamiya Y. Pulmonary reexpansion causes xanthine oxidase-induced apoptosis in rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L400-406.
73. Cho HY, Reddy SP, Kleeberger SR. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:76-87.
74. Goven D, Boutten A, Lecon-Malas V, Marchal-Somme J, Amara N, Crestani B, Fournier M, Leseche G, Soler P, Boczkowski J, et al. Altered nrf2/keap1-bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax* 2008;63:916-924.
75. Harju T, Kaarteenaho-Wiik R, Sirvio R, Paakko P, Crapo JD, Oury TD, Soini Y, Kinnula VL. Manganese superoxide dismutase is increased in the airways of smokers' lungs. *Eur Respir J* 2004;24:765-771.
76. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tudor RM, Biswal S. Genetic ablation of nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 2004;114:1248-1259.
77. Dekhuijzen PN. Antioxidant properties of n-acetylcysteine: Their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004;23:629-636.
78. Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with copd and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1175-1177.
79. Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, De Boer WI. 4-hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:490-495.
80. Deslee G, Woods JC, Moore C, Conradi SH, Gierada DS, Atkinson JJ, Battaile JT, Liu L, Patterson GA, Adair-Kirk TL, et al. Oxidative damage to nucleic acids in severe emphysema. *Chest* 2009;135:965-974.
81. Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G, Gonzalez-Mangado N. Oral n-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest* 2004;125:1500-1506.
82. Kinoshita T, Hoshino T, Imaoka H, Ichiki H, Okamoto M, Kawayama T, Yodoi J, Kato S, Aizawa H. Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:712-719.

83. Foronjy RF, Mirochnitchenko O, Propokenko O, Lemaitre V, Jia Y, Inouye M, Okada Y, D'Armiento JM. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:623-631.
84. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2001;429:195-207.
85. MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC. The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med* 1989;321:924-928.
86. Drost EM, Selby C, Lannan S, Lowe GD, MacNee W. Changes in neutrophil deformability following in vitro smoke exposure: Mechanism and protection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;6:287-295.
87. Janssen-Heininger YM, Macara I, Mossman BT. Cooperativity between oxidants and tumor necrosis factor in the activation of nuclear factor (nf)-kappa b: Requirement of ras/mitogen-activated protein kinases in the activation of nf-kappa b by oxidants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:942-952.
88. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of nf-kappa b activation. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1115-1126.
89. Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 1998;53:601-612.
90. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, et al. Increased expression of nuclear factor-kappa b in bronchial biopsies from smokers and patients with copd. *Eur Respir J* 2002;20:556-563.
91. Adcock IM, Ito K, Barnes PJ. Histone deacetylation: An important mechanism in inflammatory lung diseases. *COPD* 2005;2:445-455.
92. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005;352:1967-1976.
93. Yao H, Arunachalam G, Hwang JW, Chung S, Sundar IK, Kinnula VL, Crapo JD, Rahman I. Extracellular superoxide dismutase protects against pulmonary emphysema by attenuating oxidative fragmentation of ecm. *Proc Natl Acad Sci U S A*;107:15571-15576.
94. Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, Mecham RP, Senior RM, Shapiro SD. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 2006;116:753-759.
95. Akhtar K, Broekelmann TJ, Miao M, Keeley FW, Starcher BC, Pierce RA, Mecham RP, Adair-Kirk TL. Oxidative and nitrosative modifications of tropoelastin prevent elastic fiber assembly in vitro. *J Biol Chem*;285:37396-37404.
96. Li Z, Alam S, Wang J, Sandstrom CS, Janciauskiene S, Mahadeva R. Oxidized {alpha}1-antitrypsin stimulates the release of monocyte chemoattractant protein-1 from lung epithelial cells: Potential role in emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L388-400.
97. Gould NS, Min E, Gauthier S, Chu HW, Martin R, Day BJ. Aging adversely affects the cigarette smoke-induced glutathione adaptive response in the lung. *Am J Respir Crit Care Med*;182:1114-1122.
98. Tanaka M, Chock PB, Stadtman ER. Oxidized messenger rna induces translation errors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:66-71.

99. Deslee G, Adair-Kirk TL, Betsuyaku T, Woods JC, Moore CH, Gierada DS, Conradi SH, Atkinson JJ, Toennies HM, Battaile JT, et al. Cigarette smoke induces nucleic-acid oxidation in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*;43:576-584.
100. Nunomura A, Moreira PI, Takeda A, Smith MA, Perry G. Oxidative rna damage and neurodegeneration. *Curr Med Chem* 2007;14:2968-2975.
101. Lu ZH, Books JT, Ley TJ. Yb-1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. *Mol Cell Biol* 2005;25:4625-4637.
102. Sin DD, Man SF. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 2003;107:1514-1519.
103. Camilli AE, Robbins DR, Lebowitz MD. Death certificate reporting of confirmed airways obstructive disease. *Am J Epidemiol* 1991;133:795-800.
104. Curkendall SM, DeLuise C, Jones JK, Lanes S, Stang MR, Goehring E, Jr., She D. Cardiovascular disease in patients with chronic obstructive pulmonary disease, saskatchewan canada cardiovascular disease in copd patients. *Ann Epidemiol* 2006;16:63-70.
105. Berger JS, Sanborn TA, Sherman W, Brown DL. Effect of chronic obstructive pulmonary disease on survival of patients with coronary heart disease having percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2004;94:649-651.
106. Salisbury AC, Reid KJ, Spertus JA. Impact of chronic obstructive pulmonary disease on post-myocardial infarction outcomes. *Am J Cardiol* 2007;99:636-641.
107. Rusinaru D, Saaidi I, Godard S, Mahjoub H, Battle C, Tribouilloy C. Impact of chronic obstructive pulmonary disease on long-term outcome of patients hospitalized for heart failure. *Am J Cardiol* 2008;101:353-358.
108. Sidney S, Sorel M, Quesenberry CP, Jr., DeLuise C, Lanes S, Eisner MD. Copd and incident cardiovascular disease hospitalizations and mortality: Kaiser permanente medical care program. *Chest* 2005;128:2068-2075.
109. Huiart L, Ernst P, Suissa S. Cardiovascular morbidity and mortality in copd. *Chest* 2005;128:2640-2646.
110. McGarvey LP, John M, Anderson JA, Zvarich M, Wise RA. Ascertainment of cause-specific mortality in copd: Operations of the torch clinical endpoint committee. *Thorax* 2007;62:411-415.
111. Anthonisen NR, Connett JE, Enright PL, Manfreda J. Hospitalizations and mortality in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:333-339.
112. Macnee W, Maclay J, McAllister D. Cardiovascular injury and repair in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:824-833.
113. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:3481-3488.
114. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-1143.
115. Wouters EF. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:26-33.
116. Noguera A, Busquets X, Sauleda J, Villaverde JM, MacNee W, Agusti AG. Expression of adhesion molecules and g proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1664-1668.

117. Aldonyte R, Jansson L, Piitulainen E, Janciauskiene S. Circulating monocytes from healthy individuals and copd patients. *Respir Res* 2003;4:11.
118. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: A systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004;59:574-580.
119. Broekhuizen R, Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Raised crp levels mark metabolic and functional impairment in advanced copd. *Thorax* 2006;61:17-22.
120. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein in the arterial intima: Role of c-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2094-2099.
121. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of c-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-1565.
122. Sinden NJ, Stockley RA. Systemic inflammation and comorbidity in copd: A result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax*;65:930-936.
123. Hubbard RC, Brantly ML, Sellers SE, Mitchell ME, Crystal RG. Anti-neutrophil-elastase defenses of the lower respiratory tract in alpha 1-antitrypsin deficiency directly augmented with an aerosol of alpha 1-antitrypsin. *Ann Intern Med* 1989;111:206-212.
124. Steiner S, Pfutzner A, Wilson BR, Harzer O, Heinemann L, Rave K. Technosphere/insulin--proof of concept study with a new insulin formulation for pulmonary delivery. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002;110:17-21.
125. Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, Frew A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:702-709.
126. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 2002;105:411-414.
127. Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Nemery B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: Systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett* 2004;149:243-253.
128. Sapey E, Bayley D, Ahmad A, Newbold P, Snell N, Stockley RA. Inter-relationships between inflammatory markers in patients with stable copd with bronchitis: Intra-patient and inter-patient variability. *Thorax* 2008;63:493-499.
129. Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TM, Donaldson GC, Wedzicha JA. Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:71-78.
130. Vernooy JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, Wouters EF. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1218-1224.
131. Sapey E, Ahmad A, Bayley D, Newbold P, Snell N, Rugman P, Stockley RA. Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonists in stable copd. *J Clin Immunol* 2009;29:508-516.

132. Hurst JR, Wilkinson TM, Perera WR, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationships among bacteria, upper airway, lower airway, and systemic inflammation in copd. *Chest* 2005;127:1219-1226.
133. Sapey E, Wood AM, Ahmad A, Stockley RA. Tumor necrosis factor- α rs361525 polymorphism is associated with increased local production and downstream inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*;182:192-199.
134. Mukae H, Vincent R, Quinlan K, English D, Hards J, Hogg JC, van Eeden SF. The effect of repeated exposure to particulate air pollution (pm10) on the bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:201-209.
135. van Eeden SF, Hogg JC. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur Respir J* 2000;15:915-921.
136. Palange P, Testa U, Huertas A, Calabro L, Antonucci R, Petrucci E, Pelosi E, Pasquini L, Satta A, Morici G, et al. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in copd. *Eur Respir J* 2006;27:529-541.
137. Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:48-54.
138. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, copd, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1055-1060.
139. Ashitani J, Mukae H, Arimura Y, Matsukura S. Elevated plasma procoagulant and fibrinolytic markers in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Intern Med* 2002;41:181-185.
140. Davi G, Basili S, Vieri M, Cipollone F, Santarone S, Alessandri C, Gazzaniga P, Cordova C, Violi F. Enhanced thromboxane biosynthesis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. The chronic obstructive bronchitis and haemostasis study group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1794-1799.
141. Maclay JD, McAllister DA, Johnston S, Raftis J, McGuinness C, Deans A, Newby DE, Mills NL, Macnee W. Increased platelet activation in patients with stable and acute exacerbation of copd. *Thorax*.
142. Ferroni P, Basili S, Martini F, Vieri M, Labbadia G, Cordova C, Alessandri C, Gazzaniga PP. Soluble p-selectin as a marker of platelet hyperactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Investig Med* 2000;48:21-27.
143. Walter RE, Wilk JB, Larson MG, Vasan RS, Keaney JF, Jr., Lipinska I, O'Connor GT, Benjamin EJ. Systemic inflammation and copd: The framingham heart study. *Chest* 2008;133:19-25.
144. de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 1992;85:2284-2290.
145. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 2001;88:756-762.
146. Schafer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation* 2004;109:1819-1822.
147. Lattimore JD, Wilcox I, Nakhla S, Langenfeld M, Jessup W, Celermajer DS. Repetitive hypoxia increases lipid loading in human macrophages-a potentially atherogenic effect. *Atherosclerosis* 2005;179:255-259.
148. Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY. Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res* 1997;81:922-931.

149. Hartmann G, Tschop M, Fischer R, Bidlingmaier C, Riepl R, Tschop K, Hautmann H, Endres S, Toepfer M. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and c-reactive protein. *Cytokine* 2000;12:246-252.
150. Savransky V, Nanayakkara A, Li J, Bevans S, Smith PL, Rodriguez A, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1290-1297.
151. Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW, Scharf SM. Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:915-920.
152. Thomson AJ, Drummond GB, Waring WS, Webb DJ, Maxwell SR. Effects of short-term isocapnic hyperoxia and hypoxia on cardiovascular function. *J Appl Physiol* 2006;101:809-816.
153. Skwarski KM, Morrison D, Barratt A, Lee M, MacNee W. Effects of hypoxia on renal hormonal balance in normal subjects and in patients with copd. *Respir Med* 1998;92:1331-1336.
154. Curtis BM, O'Keefe JH, Jr. Autonomic tone as a cardiovascular risk factor: The dangers of chronic fight or flight. *Mayo Clin Proc* 2002;77:45-54.
155. Heindl S, Lehnert M, Criege CP, Hasenfuss G, Andreas S. Marked sympathetic activation in patients with chronic respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:597-601.
156. Cook S, Togni M, Schaub MC, Wenaweser P, Hess OM. High heart rate: A cardiovascular risk factor? *Eur Heart J* 2006;27:2387-2393.
157. Tsuji H, Venditti FJ, Jr., Manders ES, Evans JC, Larson MG, Feldman CL, Levy D. Reduced heart rate variability and mortality risk in an elderly cohort. The framingham heart study. *Circulation* 1994;90:878-883.
158. Volterrani M, Scalvini S, Mazzuero G, Lanfranchi P, Colombo R, Clark AL, Levi G. Decreased heart rate variability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 1994;106:1432-1437.
159. Suissa S, Assimes T, Ernst P. Inhaled short acting beta agonist use in copd and the risk of acute myocardial infarction. *Thorax* 2003;58:43-46.
160. Au DH, Curtis JR, Every NR, McDonnell MB, Fihn SD. Association between inhaled beta-agonists and the risk of unstable angina and myocardial infarction. *Chest* 2002;121:846-851.
161. Salpeter S, Ormiston T, Salpeter E. Cardioselective beta-blockers for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD003566.
162. Dransfield MT, Rowe SM, Johnson JE, Bailey WC, Gerald LB. Use of beta blockers and the risk of death in hospitalised patients with acute exacerbations of copd. *Thorax* 2008;63:301-305.
163. Gottlieb SS, McCarter RJ, Vogel RA. Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;339:489-497.
164. van Gestel YR, Hoeks SE, Sin DD, Welten GM, Schouten O, Witteveen HJ, Simsek C, Stam H, Mertens FW, Bax JJ, et al. Impact of cardioselective beta-blockers on mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease and atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:695-700.
165. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:932-943.
166. Shifren A, Mecham RP. The stumbling block in lung repair of emphysema: Elastic fiber assembly. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:428-433.
167. Frances C, Boisnic S, Hartmann DJ, Dautzenberg B, Branchet MC, Charpentier YL, Robert L. Changes in the elastic tissue of the non-sun-exposed skin of cigarette smokers. *Br J Dermatol* 1991;125:43-47.

168. Patel BD, Loo WJ, Tasker AD, Screaton NJ, Burrows NP, Silverman EK, Lomas DA. Smoking related copd and facial wrinkling: Is there a common susceptibility? *Thorax* 2006;61:568-571.
169. Luttun A, Lutgens E, Manderveld A, Maris K, Collen D, Carmeliet P, Moons L. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein e-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation* 2004;109:1408-1414.
170. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009;360:2445-2454.
171. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007;13:567-569.
172. Cudkowicz L, Armstrong JB. The bronchial arteries in pulmonary emphysema. *Thorax* 1953;8:46-58.
173. Deffebach ME, Charan NB, Lakshminarayan S, Butler J. The bronchial circulation. Small, but a vital attribute of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:463-481.
174. Wagner EM, Foster WM. Importance of airway blood flow on particle clearance from the lung. *J Appl Physiol* 1996;81:1878-1883.
175. Wagner EM, Foster WM. The role of the bronchial vasculature in soluble particle clearance. *Environ Health Perspect* 2001;109 Suppl 4:563-565.
176. Wagner EM. Tnf-alpha induced bronchial vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H946-951.
177. Hashimoto M, Tanaka H, Abe S. Quantitative analysis of bronchial wall vascularity in the medium and small airways of patients with asthma and copd. *Chest* 2005;127:965-972.
178. Tanaka H, Yamada G, Saikai T, Hashimoto M, Tanaka S, Suzuki K, Fujii M, Takahashi H, Abe S. Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:1495-1499.
179. Paredi P, Ward S, Cramer D, Barnes PJ, Kharitonov SA. Normal bronchial blood flow in copd is unaffected by inhaled corticosteroids and correlates with exhaled nitric oxide. *Chest* 2007;131:1075-1081.
180. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 1999;13:197-205.
181. Ito K, Barnes PJ. Copd as a disease of accelerated lung aging. *Chest* 2009;135:173-180.
182. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, Sarni M, Housset B, Weitzenblum E, Matrat M, et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:566-571.
183. van der Harst P, van Veldhuisen DJ, Samani NJ. Expanding the concept of telomere dysfunction in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:807-808.
184. Samani NJ, Boulby R, Butler R, Thompson JR, Goodall AH. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 2001;358:472-473.
185. Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, Labat C, Bean K, Aviv A. Telomere length as an indicator of biological aging: The gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 2001;37:381-385.

186. Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, Matsuo T, Kayo S, Yoshimi N, Hai E, Shirai N, Ehara S, Komatsu R, et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:546-550.
187. Minamino T, Kourembanas S. Mechanisms of telomerase induction during vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 2001;89:237-243.
188. Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, Baesso I, Facco M, Miorin M, Tassinato M, de Kreutzenberg SV, Avogaro A, Agostini C. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. *Stem Cells* 2006;24:1806-1813.
189. Eckardt KU, Boutellier U, Kurtz A, Schopen M, Koller EA, Bauer C. Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 1989;66:1785-1788.
190. Eckardt KU, Kurtz A. Regulation of erythropoietin production. *Eur J Clin Invest* 2005;35 Suppl 3:13-19.
191. Graudal N, Galloe AM, Nielsen OJ. Erythropoietin in chronic obstructive pulmonary disease. Relationship between serum erythropoietin, blood hemoglobin and lung function--effect of the calcium antagonist isradipine on serum erythropoietin. *Respiration* 1991;58:141-144.
192. Guidet B, Offenstadt G, Boffa G, Najman A, Baillou C, Hatzfeld C, Amstutz P. Polycythemia in chronic obstructive pulmonary disease. A study of serum and urine erythropoietin and medullary erythroid progenitors. *Chest* 1987;92:867-870.
193. Smith JR, Landaw SA. Smokers' polycythemia. *N Engl J Med* 1978;298:6-10.
194. Spiers AS, Levine M. Smokers' polycythaemia. *Lancet* 1983;1:120.
195. Ernst E, Matrai A, Schmolzl C, Magyarosy I. Dose-effect relationship between smoking and blood rheology. *Br J Haematol* 1987;65:485-487.
196. Kurata C. Medical check-up findings characteristic of smokers: Aimed at improving smoking cessation interventions by physicians. *Intern Med* 2006;45:1027-1032.
197. Tanabe N, Ohnishi K, Fukui H, Ohno R. Effect of smoking on the serum concentration of erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor. *Intern Med* 1997;36:680-684.
198. Kanstrup IL, Ekblom B. Blood volume and hemoglobin concentration as determinants of maximal aerobic power. *Med Sci Sports Exerc* 1984;16:256-262.
199. Robertson RJ, Gilcher R, Metz KF, Caspersen CJ, Allison TG, Abbott RA, Skrinar GS, Krause JR, Nixon PA. Effect of simulated altitude erythrocythemia in women on hemoglobin flow rate during exercise. *J Appl Physiol* 1988;64:1644-1649.
200. Broberg CS, Bax BE, Okonko DO, Rampling MW, Bayne S, Harries C, Davidson SJ, Uebing A, Khan AA, Thein S, et al. Blood viscosity and its relationship to iron deficiency, symptoms, and exercise capacity in adults with cyanotic congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:356-365.
201. Connes P, Yalcin O, Baskurt O, Brun JF, Hardeman M. In health and in a normoxic environment, $\dot{V}O_2$ max is/is not limited primarily by cardiac output and locomotor muscle blood flow. *J Appl Physiol* 2006;100:2099.
202. Guyton AC, Richardson TQ. Effect of hematocrit on venous return. *Circ Res* 1961;9:157-164.
203. Chetty KG, Light RW, Stansbury DW, Milne N. Exercise performance of polycythemic chronic obstructive pulmonary disease patients. Effect of phlebotomies. *Chest* 1990;98:1073-1077.
204. Humphrey PR, Du Boulay GH, Marshall J, Pearson TC, Russell RW, Symon L, Wetherley-Mein G, Zilkha E. Cerebral blood-flow and viscosity in relative polycythaemia. *Lancet* 1979;2:873-877.

205. Yates CJ, Berent A, Andrews V, Dormandy JA. Increase in leg blood-flow by normovolaemic haemodilution in intermittent claudication. *Lancet* 1979;2:166-168.
206. Schwarcz TH, Hogan LA, Endean ED, Roitman IT, Kazmers A, Hyde GL. Thromboembolic complications of polycythemia: Polycythemia vera versus smokers' polycythemia. *J Vasc Surg* 1993;17:518-522; discussion 522-513.
207. Faeh D, Gutzwiller F, Bopp M. Lower mortality from coronary heart disease and stroke at higher altitudes in Switzerland. *Circulation* 2009;120:495-501.
208. Fyfe A, Perloff JK, Niwa K, Child JS, Miner PD. Cyanotic congenital heart disease and coronary artery atherogenesis. *Am J Cardiol* 2005;96:283-290.
209. Lubarsky DA, Gallagher CJ, Berend JL. Secondary polycythemia does not increase the risk of perioperative hemorrhagic or thrombotic complications. *J Clin Anesth* 1991;3:99-103.
210. Martini J, Carpentier B, Negrete AC, Frangos JA, Intaglietta M. Paradoxical hypotension following increased hematocrit and blood viscosity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H2136-2143.
211. Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T, et al. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11609-11613.
212. Vogel J, Gassmann M. Erythropoietic and non-erythropoietic functions of erythropoietin in mouse models. *J Physiol*;589:1259-1264.
213. E. Sala, B.G. Cosio, A. Jahn, C. Balaguer, A. Rios, A. Iglesias, C. Villena, Agusti A. The expression of erythropoietin receptor in circulating endothelial progenitor cells is reduced in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183.
214. Defouilloy C, Teiger E, Sediame S, Andrivet P, Roudot-Thoraval F, Chouaid C, Housset B, Adnot S. Polycythemia impairs vasodilator response to acetylcholine in patients with chronic hypoxemic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1452-1460.
215. Smith TG, Talbot NP, Privat C, Rivera-Ch M, Nickol AH, Ratcliffe PJ, Dorrington KL, Leon-Velarde F, Robbins PA. Effects of iron supplementation and depletion on hypoxic pulmonary hypertension: Two randomized controlled trials. *Jama* 2009;302:1444-1450.
216. Cote C, Zilberberg MD, Mody SH, Dordelly LJ, Celli B. Haemoglobin level and its clinical impact in a cohort of patients with COPD. *Eur Respir J* 2007;29:923-929.
217. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:682-685.
218. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992;256:225-228.
219. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298 (Pt 2):249-258.
220. Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10089-10093.
221. 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;154:209-216.

222. Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol* 1992;210:221-222.
223. 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;12:649-661.
224. 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;197:372-379.
225. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-765.
226. 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;9:371-377.
227. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994;372:546-548.
228. 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;94:2231-2236.
229. 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:L684-692.
230. Daff S. No synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide*;23:1-11.
231. Klatt P, Schmidt K, Lehner D, Glatter O, Bachinger HP, Mayer B. Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and l-arginine in the formation of an sds-resistant dimer. *EMBO J* 1995;14:3687-3695.
232. Robbins RA, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, Wilson AJ, Adcock IM, Riveros-Moreno V, Moncada S, Polak J, et al. Inducible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:835-843.
233. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:9730-9734.
234. Guo FH, Uetani K, Haque SJ, Williams BR, Dweik RA, Thunnissen FB, Calhoun W, Erzurum SC. Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. *J Clin Invest* 1997;100:829-838.
235. Guo FH, Comhair SA, Zheng S, Dweik RA, Eissa NT, Thomassen MJ, Calhoun W, Erzurum SC. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (no) in asthma: Evidence for transcriptional and post-translational regulation of no synthesis. *J Immunol* 2000;164:5970-5980.
236. Tadie JM, Henno P, Leroy I, Danel C, Naline E, Faisy C, Riquet M, Levy M, Israel-Biet D, Delclaux C. Role of nitric oxide synthase/arginase balance in bronchial reactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L489-497.

237. 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.
238. Balligand JL, Feron O, Dessy C. Enos activation by physical forces: From short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* 2009;89:481-534.
239. Potente M, Urbich C, Sasaki K, Hofmann WK, Heeschen C, Aicher A, Kollipara R, DePinho RA, Zeiher AM, Dimmeler S. Involvement of foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2005;115:2382-2392.
240. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of pecam-1 in the shear-stress-induced activation of akt and the endothelial nitric oxide synthase (enos) in endothelial cells. *J Cell Sci* 2005;118:4103-4111.
241. Ravi K, Brennan LA, Levic S, Ross PA, Black SM. S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2619-2624.
242. Desjardins F, Lobysheva I, Pelat M, Gallez B, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Control of blood pressure variability in caveolin-1-deficient mice: Role of nitric oxide identified in vivo through spectral analysis. *Cardiovasc Res* 2008;79:527-536.
243. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-424.
244. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Jo H. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at ser1179 by akt-independent mechanisms: Role of protein kinase a. *J Biol Chem* 2002;277:3388-3396.
245. Chu A, Chambers DE, Lin CC, Kuehl WD, Palmer RM, Moncada S, Cobb FR. Effects of inhibition of nitric oxide formation on basal vasomotion and endothelium-dependent responses of the coronary arteries in awake dogs. *J Clin Invest* 1991;87:1964-1968.
246. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, et al. Defective smooth muscle regulation in cgmp kinase i-deficient mice. *Embo J* 1998;17:3045-3051.
247. Hirata M, Kohse KP, Chang CH, Ikebe T, Murad F. Mechanism of cyclic gmp inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1990;265:1268-1273.
248. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of irag, ip3 receptor and cgmp kinase ibeta. *Nature* 2000;404:197-201.
249. Trepakova ES, Cohen RA, Bolotina VM. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum ca²⁺-atpase-dependent refilling of ca²⁺ stores. *Circ Res* 1999;84:201-209.
250. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996;76:967-1003.
251. Moore PK, al-Swayeh OA, Chong NW, Evans RA, Gibson A. L-ng-nitro arginine (l-noarg), a novel, l-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br J Pharmacol* 1990;99:408-412.

252. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990;101:746-752.
253. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989;2:997-1000.
254. Hansen J, Jacobsen TN, Victor RG. Is nitric oxide involved in the tonic inhibition of central sympathetic outflow in humans? *Hypertension* 1994;24:439-444.
255. Wilkinson IB, MacCallum H, Cockcroft JR, Webb DJ. Inhibition of basal nitric oxide synthesis increases aortic augmentation index and pulse wave velocity in vivo. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53:189-192.
256. Kinlay S, Creager MA, Fukumoto M, Hikita H, Fang JC, Selwyn AP, Ganz P. Endothelium-derived nitric oxide regulates arterial elasticity in human arteries in vivo. *Hypertension* 2001;38:1049-1053.
257. Schmitt M, Avolio A, Qasem A, McEniery CM, Butlin M, Wilkinson IB, Cockcroft JR. Basal nitric oxide locally modulates human iliac artery function in vivo. *Hypertension* 2005;46:227-231.
258. Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ Res* 2006;106:633-646.
259. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996;380:221-226.
260. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by s-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997;276:2034-2037.
261. McMahon TJ, Ahearn GS, Moya MP, Gow AJ, Huang YC, Luchsinger BP, Nudelman R, Yan Y, Krichman AD, Bashore TM, et al. A nitric oxide processing defect of red blood cells created by hypoxia: Deficiency of s-nitrosohemoglobin in pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:14801-14806.
262. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozuyaman B, et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006;107:2943-2951.
263. Levy BI, Valladares WR, Ghaem A, Martineaud JP. Comparison of plethysmographic methods with pulsed doppler blood flowmetry. *Am J Physiol* 1979;236:H899-903.
264. Benjamin N, Calver A, Collier J, Robinson B, Vallance P, Webb D. Measuring forearm blood flow and interpreting the responses to drugs and mediators. *Hypertension* 1995;25:918-923.
265. Laurent S, Lacolley P, Brunel P, Laloux B, Pannier B, Safar M. Flow-dependent vasodilation of brachial artery in essential hypertension. *Am J Physiol* 1990;258:H1004-1011.
266. Anderson EA, Mark AL. Flow-mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans. *Circulation* 1989;79:93-100.
267. 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:L589-595.
268. 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.
269. 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:L383-390.

270. Leuwerke SM, Kaza AK, Tribble CG, Kron IL, Laubach VE. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L1272-1278.
271. 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;102:91-94.
272. Hogman M, Frostell CG, Hedenstrom H, Hedenstierna G. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1474-1478.
273. Yamakage M, Hirshman CA, Croxton TL. Sodium nitroprusside stimulates ca^{2+} -activated k^{+} channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1996;270:L338-345.
274. 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;87:155-162.
275. Cooper CJ, Landzberg MJ, Anderson TJ, Charbonneau F, Creager MA, Ganz P, Selwyn AP. Role of nitric oxide in the local regulation of pulmonary vascular resistance in humans. *Circulation* 1996;93:266-271.
276. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995;333:214-221.
277. 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;324:1539-1547.
278. 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;37:322-327.
279. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001;293:2449-2452.
280. 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.
281. Adler KB, Fischer BM, Li H, Choe NH, Wright DT. Hypersecretion of mucin in response to inflammatory mediators by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro is blocked by inhibition of nitric oxide synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:526-530.
282. 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;191:83-88.
283. Loukides S, Kharitonov S, Wodehouse T, Cole PJ, Barnes PJ. Effect of arginine on mucociliary function in primary ciliary dyskinesia. *Lancet* 1998;352:371-372.
284. Duszyk M. Regulation of anion secretion by nitric oxide in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L450-457.
285. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001;2:907-916.
286. Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris A, Aubier M, Poderoso JJ. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *Faseb J* 1999;13:1637-1646.

287. Lanone S, Mebazaa A, Heymes C, Henin D, Poderoso JJ, Panis Y, Zedda C, Billiar T, Payen D, Aubier M, et al. Muscular contractile failure in septic patients: Role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2308-2315.
288. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996;328:85-92.
289. Liochev SI, Fridovich I. Superoxide and nitric oxide: Consequences of varying rates of production and consumption: A theoretical treatment. *Free Radic Biol Med* 2002;33:137-141.
290. Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide* 2006;14:109-121.
291. MacMillan-Crow LA, Thompson JA. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (y34f) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1999;366:82-88.
292. Matata BM, Galinanes M. Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa b DNA binding activity. *J Biol Chem* 2002;277:2330-2335.
293. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: Signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002;297:1186-1190.
294. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996;98:2572-2579.
295. Wang W, Sawicki G, Schulz R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res* 2002;53:165-174.
296. Mannick JB, Schonhoff C, Papeta N, Ghafourifar P, Szibor M, Fang K, Gaston B. S-nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol* 2001;154:1111-1116.
297. Sterk PJ, De Gouw HW, Ricciardolo FL, Rabe KF. Exhaled nitric oxide in copd: Glancing through a smoke screen. *Thorax* 1999;54:565-567.
298. Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:609-612.
299. Clini E, Cremona G, Campana M, Scotti C, Pagani M, Bianchi L, Giordano A, Ambrosino N. Production of endogenous nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease and patients with cor pulmonale. Correlates with echo-doppler assessment. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:446-450.
300. Agusti AG, Villaverde JM, Toghiani B, Bosch M. Serial measurements of exhaled nitric oxide during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;14:523-528.
301. Paredi P, Kharitonov SA, Leak D, Ward S, Cramer D, Barnes PJ. Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:369-373.
302. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:701-706.

303. Ricciardolo FL, Caramori G, Ito K, Capelli A, Brun P, Abatangelo G, Papi A, Chung KF, Adcock I, Barnes PJ, et al. Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1028-1035.
304. Osoata GO, Hanazawa T, Brindicci C, Ito M, Barnes PJ, Kharitonov S, Ito K. Peroxynitrite elevation in exhaled breath condensate of copd and its inhibition by fudosteine. *Chest* 2009;135:1513-1520.
305. 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.
306. Atochina-Vasserman EN, Beers MF, Kadire H, Tomer Y, Inch A, Scott P, Guo CJ, Gow AJ. Selective inhibition of inducible no synthase activity in vivo reverses inflammatory abnormalities in surfactant protein d-deficient mice. *J Immunol* 2007;179:8090-8097.
307. Volonte D, Kahkonen B, Shapiro S, Di Y, Galbiati F. Caveolin-1 expression is required for the development of pulmonary emphysema through activation of the atm-p53-p21 pathway. *J Biol Chem* 2009;284:5462-5466.
308. Takahashi S, Nakamura H, Seki M, Shiraishi Y, Yamamoto M, Furuuchi M, Nakajima T, Tsujimura S, Shirahata T, Nakamura M, et al. Reversal of elastase-induced pulmonary emphysema and promotion of alveolar epithelial cell proliferation by simvastatin in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L882-890.
309. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, Colombo PC, Basner RC, Factor P, LeJemtel TH. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 2008;117:2270-2278.
310. Anazawa T, Dimayuga PC, Li H, Tani S, Bradfield J, Chyu KY, Kaul S, Shah PK, Cercek B. Effect of exposure to cigarette smoke on carotid artery intimal thickening: The role of inducible no synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1652-1658.
311. Talukder MA, Johnson WM, Varadharaj S, Lian J, Kearns PN, El-Mahdy MA, Liu X, Zweier JL. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired no bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;300:H388-396.
312. Sabit R, Bolton CE, Edwards PH, Pettit RJ, Evans WD, McEniery CM, Wilkinson IB, Cockcroft JR, Shale DJ. Arterial stiffness and osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1259-1265.
313. Mills NL, Miller JJ, Anand A, Robinson SD, Frazer GA, Anderson D, Breen L, Wilkinson IB, McEniery CM, Donaldson K, et al. Increased arterial stiffness in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A mechanism for increased cardiovascular risk. *Thorax* 2008;63:306-311.
314. 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;176:1208-1214.
315. Raveendran M, Wang J, Senthil D, Wang J, Utama B, Shen Y, Dudley D, Zhang Y, Wang XL. Endogenous nitric oxide activation protects against cigarette smoking induced apoptosis in endothelial cells. *FEBS Lett* 2005;579:733-740.

316. Okamoto T, Gohil K, Finkelstein EI, Bove P, Akaike T, van der Vliet A. Multiple contributing roles for nos2 in lps-induced acute airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L198-209.
317. Peng X, Abdulnour RE, Sammani S, Ma SF, Han EJ, Hasan EJ, Tudor R, Garcia JG, Hassoun PM. Inducible nitric oxide synthase contributes to ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:470-479.
318. Zeidler P, Hubbs A, Battelli L, Castranova V. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J Toxicol Environ Health A* 2004;67:1001-1026.
319. Zhang J, Schmidt J, Ryschich E, Mueller-Schilling M, Schumacher H, Allenberg JR. Inducible nitric oxide synthase is present in human abdominal aortic aneurysm and promotes oxidative vascular injury. *J Vasc Surg* 2003;38:360-367.
320. Burner U, Furtmuller PG, Kettle AJ, Koppenol WH, Obinger C. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *J Biol Chem* 2000;275:20597-20601.
321. Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of vegf on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 1996;270:H411-415.
322. Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, Moore M, Sullivan A, Nicolls MR, Fontenot AP, Tudor RM, Voelkel NF. An animal model of autoimmune emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:734-742.
323. Petrache I, Fijalkowska I, Zhen L, Medler TR, Brown E, Cruz P, Choe KH, Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Shapiro L, et al. A novel antiapoptotic role for alpha1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1222-1228.
324. Giordano RJ, Lahdenranta J, Zhen L, Chukwueke U, Petrache I, Langley RR, Fidler IJ, Pasqualini R, Tudor RM, Arap W. Targeted induction of lung endothelial cell apoptosis causes emphysema-like changes in the mouse. *J Biol Chem* 2008;283:29447-29460.
325. Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996;75:77-85.
326. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein e/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 2001;104:448-454.
327. Ponnuswamy P, Ostermeier E, Schrottle A, Chen J, Huang PL, Ertl G, Nieswandt B, Kuhlencordt PJ. Oxidative stress and compartment of gene expression determine proatherosclerotic effects of inducible nitric oxide synthase. *Am J Pathol* 2009;174:2400-2410.
328. Hayashi T, Sumi D, Juliet PA, Matsui-Hirai H, Asai-Tanaka Y, Kano H, Fukatsu A, Tsunekawa T, Miyazaki A, Iguchi A, et al. Gene transfer of endothelial no synthase, but not enos plus inducible nos, regressed atherosclerosis in rabbits. *Cardiovasc Res* 2004;61:339-351.
329. Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J, Hassing H, Burton C, Mundt S, Chun S, Fletcher D, Card DJ, Lisnock J, et al. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *J Immunol* 2000;165:3430-3435.

330. Hayashi T, Matsui-Hirai H, Fukatsu A, Sumi D, Kano-Hayashi H, Rani PJ, Iguchi A. Selective inos inhibitor, ono1714 successfully retards the development of high-cholesterol diet induced atherosclerosis by novel mechanism. *Atherosclerosis* 2006;187:316-324.
331. Gunnett CA, Lund DD, Chu Y, Brooks RM, 2nd, Faraci FM, Heistad DD. No-dependent vasorelaxation is impaired after gene transfer of inducible no-synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1281-1287.
332. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6954-6958.
333. Antoniadou C, Shirodaria C, Warrick N, Cai S, de Bono J, Lee J, Leeson P, Neubauer S, Ratnatunga C, Pillai R, et al. 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels: Effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation* 2006;114:1193-1201.
334. Shirodaria C, Antoniadou C, Lee J, Jackson CE, Robson MD, Francis JM, Moat SJ, Ratnatunga C, Pillai R, Refsum H, et al. Global improvement of vascular function and redox state with low-dose folic acid: Implications for folate therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2007;115:2262-2270.
335. Antoniadou C, Shirodaria C, Crabtree M, Rinze R, Alp N, Cunningham C, Diesch J, Tousoulis D, Stefanadis C, Leeson P, et al. Altered plasma versus vascular biopterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inflammation. *Circulation* 2007;116:2851-2859.
336. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Lang D, Newcombe RG, Kredan MB, Lewis MJ, Goodfellow J. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: An effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1196-1202.
337. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 1998;101:731-736.
338. Kaul DK, Koshkaryev A, Artmann G, Barshtein G, Yedgar S. Additive effect of red blood cell rigidity and adherence to endothelial cells in inducing vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1788-1793.
339. Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ. Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radic Biol Med* 1998;24:102-110.
340. Nagy E, Eaton JW, Jeney V, Soares MP, Varga Z, Galajda Z, Szentmiklosi J, Mehes G, Csonka T, Smith A, et al. Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;30:1347-1353.
341. Lucantoni G, Pietraforte D, Matarrese P, Gambardella L, Metere A, Paone G, Bianchi EL, Straface E. The red blood cell as a biosensor for monitoring oxidative imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: An ex vivo and in vitro study. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1171-1182.
342. Santini MT, Straface E, Cipri A, Peverini M, Santulli M, Malorni W. Structural alterations in erythrocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Haemostasis* 1997;27:201-210.
343. Matarrese P, Straface E, Pietraforte D, Gambardella L, Vona R, Maccaglia A, Minetti M, Malorni W. Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *Faseb J* 2005;19:416-418.

344. Boas FE, Forman L, Beutler E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3077-3081.
345. Low PS, Waugh SM, Zinke K, Drenckhahn D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* 1985;227:531-533.
346. Bosman GJ, Werre JM, Willekens FL, Novotny VM. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: Structural aspects and implications for transfusion. *Transfus Med* 2008;18:335-347.
347. Bogdanova A, Mihov D, Lutz H, Saam B, Gassmann M, Vogel J. Enhanced erythro-phagocytosis in polycythemic mice overexpressing erythropoietin. *Blood* 2007;110:762-769.
348. Brindicci C, Ito K, Barnes PJ, Kharitonov SA. Effect of an inducible nitric oxide synthase inhibitor on differential flow-exhaled nitric oxide in asthmatic patients and healthy volunteers. *Chest* 2007;132:581-588.
349. 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;135:353-367.
350. Ghezzi P, Bernaudin M, Bianchi R, Blomgren K, Brines M, Campana W, Cavaletti G, Cerami A, Chopp M, Coleman T, et al. Erythropoietin: Not just about erythropoiesis. *Lancet*;375:2142.
351. Kotecha D, Ngo K, Walters JA, Manzano L, Palazzuoli A, Flather MD. Erythropoietin as a treatment of anemia in heart failure: Systematic review of randomized trials. *Am Heart J*;161:822-831 e822.
352. Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, Cooper ME, de Zeeuw D, Eckardt KU, Feyzi JM, Ivanovich P, Kewalramani R, Levey AS, et al. A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2009;361:2019-2032.
353. Anker SD, Comin Colet J, Filippatos G, Willenheimer R, Dickstein K, Drexler H, Luscher TF, Bart B, Banasiak W, Niegowska J, et al. Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency. *N Engl J Med* 2009;361:2436-2448.

Rôle du Monoxyde d'Azote (NO) et des NO Synthases dans la Physiopathologie de la BPCO et de ses complications cardiovasculaires

Les mécanismes à l'origine de la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) et de ses complications cardiovasculaires restent partiellement connus. Le NO est produit par les NO synthases en quantité importante dans le poumon des sujets emphysémateux, mais son rôle dans la maladie n'est pas connu. Une dysfonction endothéliale précoce liée à une diminution de la disponibilité en NO au niveau vasculaire a aussi été observée chez les patients BPCO. Dans un premier travail, nous avons montré que iNOS et eNOS étaient induites de manière diffuse dans le poumon de souris développant un emphysème après une instillation d'élastase. Le recours à des souris iNOS^{-/-} et eNOS^{-/-}, ainsi qu'à un inhibiteur pharmacologique d'iNOS (1400W) ont permis de montrer que l'induction d'iNOS dans le poumon était responsable d'une accumulation de protéines nitrées dans les pneumocytes de type 2 et d'une diminution de l'oxydation protéique. Cependant ni iNOS ni eNOS n'étaient nécessaires au développement de l'emphysème induit par l'élastase. Dans un deuxième travail, nous avons exploré l'effet de la polyglobulie, une complication de la BPCO hypoxique, sur la fonction endothéliale chez 15 patients polyglobuliques et 13 normoglobuliques atteints de BPCO de sévérité égale. La polyglobulie était associée de base à une viscosité sanguine plus élevée et un diamètre artériel brachial plus important mais avec des forces de cisaillement calculées similaires. L'étude de la vasodilatation en réponse à l'hyperhémie et celle du flux sanguin de l'avant bras mesuré par plethysmographie d'occlusion veineuse en réponse à une perfusion d'acétylcholine (ACh), et de N-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) ont permis de montrer que les artères systémiques des patients polyglobuliques ajustent leur diamètre aux forces de cisaillement aiguës et chroniques de manière adaptée grâce à une libération adaptée de NO. De plus, nos résultats suggèrent que la polyglobulie modérée n'a pas d'effet délétère sur la fonction vasculaire chez les patients BPCO.

Mots-clés : NO, NO synthases, emphysema, BPCO, fonction endothéliale, polyglobulie

The role of Nitric oxide (NO) and NO-synthases in COPD and its cardiovascular complications

The mechanisms that lead to COPD and cause its cardiovascular complications are partially known. NO is produced at high levels by NO-synthases in the human lung with emphysema, but its role in this disease is not clear. Interestingly, COPD patients have an endothelial dysfunction linked to the decrease of NO levels in peripheral blood vessels. In a first study, we demonstrated that iNOS and eNOS were diffusely upregulated in the lung of mice with emphysema after elastase instillation. By using iNOS^{-/-} and eNOS^{-/-} mice and a drug-based inhibitor of iNOS (1400W), we demonstrated that the induction of iNOS in the lung was responsible of an increase of protein nitration in alveolar type 2 cells and of an alleviated oxidation of proteins. However, neither iNOS nor eNOS were required for the development of elastase-induced inflammation and emphysema. In a second study, we evaluated the effects of polycythemia, a common complication of hypoxic lung diseases, on the endothelial function in 15 polycythemic and 13 normocythemic patients with a COPD of equal severity. Polycythemia was associated with higher blood viscosity and a larger diameter of the brachial artery but with a similar calculated wall shear stress (WSS). We studied the flow-mediated brachial artery vasodilation and the forearm blood-flow responses to endothelium- and non-endothelium-dependent N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) infusion by plethysmography. We demonstrated that systemic arteries in polycythemic patients adjust appropriately to chronic or acute WSS elevations by an appropriate basal and stimulated NO release. Overall, our results suggest that moderate polycythemia has no adverse effect on vascular function in COPD.

Keywords: NO, NO synthases, COPD, emphysema, endothelial function, polycythemia

**INSERM U955, Faculté de Médecine
8, rue du Général Sarrail, 94000 Créteil**