

Les voies du monoxyde d'azote dans le sepsis

Nitric Oxide Ways in Sepsis

E. Besnier · E. Delile · D. Coquerel · F. Tamion

Reçu le 9 décembre 2014 ; accepté le 12 février 2015
© SRLF et Lavoisier SAS 2015

Résumé Le monoxyde d'azote (NO) est un élément radicalaire à demi-vie courte impliqué dans la régulation d'un grand nombre de fonctions physiologiques à l'état normal ou pathologique. Sa production est assurée par les NO-synthases (NOS) à partir de la L-arginine. Au cours du processus septique, la production de NO est fortement augmentée grâce à l'augmentation de l'expression d'une NOS dite inductible. Dans ces conditions, le NO pourrait induire une toxicité directe sur un grand nombre de fonctions d'organes. Un effet délétère indirect est également possible par nitrosylation des protéines cellulaires et par production de peroxy-nitrite. Ces composés peuvent inhiber la chaîne respiratoire et donc avoir une toxicité mitochondriale. Le NO induirait une dysfonction micro- et macrovasculaire, myocardique, immunitaire et neuronale.

Les quelques études réalisées chez l'homme utilisant des antagonistes non spécifiques du NO se sont soldées par un échec ou un effet délétère. Ceci met en évidence la complexité des voies liées au NO et la nécessité d'une meilleure compréhension de sa physiopathologie dans la genèse des défaillances multiviscérales avec, comme perspective, de développer des thérapeutiques plus ciblées.

Mots clés Monoxyde d'azote (NO) · Peroxy-nitrite · Sepsis · Syndrome de défaillance multiviscérale · Stress radicalaire

Abstract Nitric oxide (NO) is a short-lived radical element involved in the regulation of a large number of physiological functions under normal or pathological conditions. It is produced by NO synthase (NOS) from L-arginine. During septic

conditions, NO production is greatly increased due to an over-expression of an inducible form of NOS. In these conditions, NO could be responsible for a direct toxicity on many organs. An indirect harmful effect could be due to nitrosylation of cellular proteins and peroxy-nitrite production. These products induce an inhibition of the respiratory chain and therefore a direct mitochondrial toxicity. NO induces micro- and macrovascular, myocardial, immune and neuronal dysfunctions.

The few available studies in human beings, using pharmacological non-specific antagonists of NO, resulted in failure or deleterious effect. This highlights the complexity of pathways related to NO and the need for a better understanding of its involvement in the pathogenesis of organ failure in order to develop better targeted therapies.

Keywords Nitric oxide (NO) · Peroxy-nitrite · Sepsis · Multi-organ failure · Radicular stress

Introduction

Le sepsis est la réaction inflammatoire de l'organisme vis-à-vis d'un pathogène. Il représente actuellement un problème majeur de santé, notamment dans ses formes sévères, où il engage le pronostic vital des patients. La physiopathologie est complexe et encore mal connue. Elle est caractérisée par une cascade inflammatoire impliquant une multitude de cytokines pro- et anti-inflammatoires, une activation leucocytaire et de la cascade de la coagulation et des anomalies vasculaires, pouvant conduire à un syndrome de défaillance multiviscérale engageant fortement le pronostic des patients.

Une meilleure compréhension de la physiopathologie du processus septique est donc indispensable au développement d'un arsenal thérapeutique, qui fait parfois encore défaut. Le monoxyde d'azote (NO) semble actuellement être un acteur important impliqué dans la pathologie septique. Sa production massive au cours du choc septique est responsable d'une dysfonction macro- et microvasculaire, ainsi que myocardique, participant à la genèse de l'état de

E. Besnier (✉) · F. Tamion
Service de réanimation médicale, CHU Charles Nicolle,
1 rue de Germont, F-76031 Rouen cedex 1, France
e-mail : emmanuel.besnier@chu-rouen.fr

E. Delile · D. Coquerel · F. Tamion
Inserm U1096, FHU, Faculté de médecine-pharmacie,
université Rouen, France

choc. De plus, le NO semble impliqué dans les phénomènes d'infiltration leucocytaire et d'activation plaquettaire. Enfin, dans certaines situations pathologiques, le NO participe à la formation d'un de ses dérivés, le peroxy-nitrite (ONOO^-), présentant des propriétés bactéricides, mais également toxiques sur le métabolisme mitochondrial et cellulaire. Il serait donc potentiellement impliqué dans la défaillance d'organes et l'immunodépression tardive du sepsis.

Le NO : généralités

Les travaux menés par Furchgott et Zawadzki au début des années 1980, démontrèrent que l'endothélium libérait une substance labile, essentielle à la relaxation artérielle en réponse à l'acétylcholine, qu'ils nommèrent EDRF (*Endothelial Derived Relaxing Factor*) [1]. Dans leurs études réalisées sur des anneaux vasculaires, l'abrasion de cette monocouche cellulaire altérait la relaxation des cellules musculaires lisses sous-jacentes en réponse à des agents pharmacologiques. Quelques années plus tard, l'EDRF était identifié comme étant le monoxyde d'azote, un élément radicalaire gazeux. L'identification de ce gaz a conduit à une telle multitude de voies de recherche et de travaux qu'il fut élu « molécule de l'année » en 1992.

Le NO est un élément radicalaire présent sous forme gazeuse, lui conférant ainsi un fort pouvoir de diffusion dans les milieux biologiques. Sa demi-vie est courte, de moins de 5 secondes, du fait de sa rapide oxydation par l'oxyhémoglobine en nitrates et nitrites. Il peut ainsi activer des cibles situées à une centaine de micromètres de son site de production, mais ne semble pas pouvoir exercer d'effet biologique sur des cibles distantes. Bien que son site de production principal soit l'endothélium, le NO est produit dans un nombre important de types cellulaires, tels que les cellules du système immunitaire (leucocytes, macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques), mais aussi les neurones, les hépatocytes, les cardiomyocytes, les cellules musculaires squelettiques... Par sa nature radicalaire, le NO réagit très activement avec de nombreuses substances, dont les dérivés radicalaires de l'oxygène et les métalloprotéines possédant un noyau héminique. De ce fait, il possède une forte affinité pour l'hémoglobine, et est donc un puissant régulateur de son activité biologique.

Métabolisme du NO

La production du NO est assurée, pour la majeure partie, par la *nitric oxide synthase* (NOS), présente sous trois isoformes, chacune exprimées à partir d'un gène distinct : eNOS pour *endotheliale NOS* exprimée principalement au niveau de la cellule endothéliale [2] mais également par les cardiomyo-

cytes, la nNOS pour *neuronal NOS* [3] exprimée dans les cellules neuronales centrales et périphériques, mais également dans d'autres tissus tels que le pancréas, le rein, le myocarde ou le muscle squelettique [4] et enfin la iNOS pour *inductible NOS*, dont l'expression est conditionnée par la présence de certains facteurs (cf. infra). L'iNOS peut être exprimée dans un nombre extrêmement varié de cellules en fonction des conditions physiopathologiques : système immunitaire, hépatocytes, cellules musculaires lisses vasculaires, cellules endothéliales, cellules rénales, chondrocytes, cardiomyocytes, fibroblastes...[5] L'existence d'une isoforme de NOS spécifiquement mitochondriale, la mtNOS, est actuellement sujette à controverse.

Les NOS permettent la production du NO et de citrulline à partir de la L-arginine, d'oxygène et de NADPH via un processus enzymatique impliquant un certain nombre de cofacteurs indispensables (tétrahydrobioptérine BH4, flavine adénine dinucléotide FAD et flavine mononucléotide FMN, Fig. 1). Ces enzymes possèdent un site catalytique de type réductase permettant le transfert d'électrons à partir du NADPH vers l'hème du site oxygénase. Ce dernier entraîne la transformation en tant que telle de l'arginine en citrulline et NO.

La eNOS et la nNOS produisent à l'état physiologique du NO et sont donc dites constitutives. Leur fonctionnement est modulé par la concentration intracellulaire de calcium [1], tandis que la iNOS est dite inductible et indépendante du

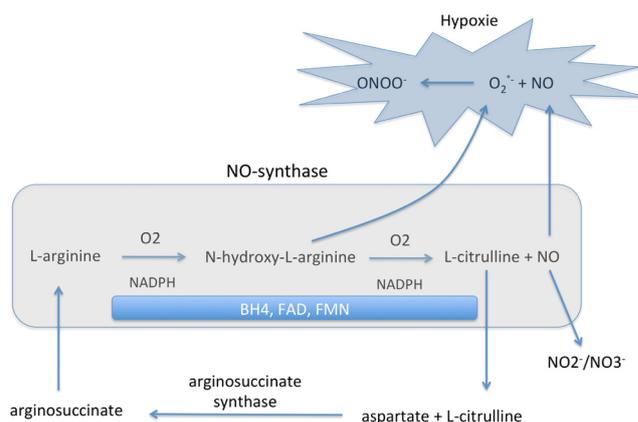


Fig. 1 Représentation schématique du métabolisme du monoxyde d'azote (NO) et de ses principaux dérivés. La production de NO et de citrulline est assurée par des NO synthases à partir de L-arginine et nécessite plusieurs cofacteurs : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), tétrahydrobioptérine (BH4), flavine adénine dinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN). Dans certaines conditions, la citrulline peut être recyclée en L-arginine par l'arginosuccinate synthase (cycle arginine-citrulline). Le NO peut donner naissance au peroxy-nitrite (ONOO^-) par conjugaison avec l'anion superoxyde (O_2^-). Les nitrates (NO_2^-) et nitrites (NO_3^-) sont d'autres métabolites actifs du NO.

calcium. Au cours du processus septique, l'exposition conjointe aux multiples cytokines permet l'induction de cette iNOS. Ainsi, l'exposition de macrophages murins au lipopolysaccharide bactérien (LPS) et à l'interféron γ (INF- γ) induit une forte expression de la iNOS. De même, l'IL-1 induit une forte expression de cet enzyme au sein des chondrocytes ou des cellules pancréatiques. Enfin, l'exposition concomitante d'hépatocytes murins aux LPS, IL-1, TNF- α et INF- γ provoque l'induction de cette NOS via le NF- κ B avec production explosive de NO [5–7]. A contrario, l'expression de l'iNOS semble être down-régulée par la présence des cytokines anti-inflammatoires. Ainsi, l'IL-4, l'IL-8 et l'IL-10 suppriment l'expression d'iNOS de macrophages murins et l'ajout de TGF- β à des cultures d'hépatocytes réduit l'expression d'iNOS induite par les cytokines pro-inflammatoires [5]. L'utilisation de dexaméthasone diminue drastiquement l'expression d'iNOS induite par les cytokines pro-inflammatoires dans les hépatocytes murins *in vitro* [6]. L'expression d'iNOS semble donc bien être conditionnée, au moins en partie, par le profil inflammatoire de l'organisme soumis au sepsis.

Une autre voie de stimulation de l'expression d'iNOS est l'augmentation du substrat, la L-arginine, dans les cellules d'intérêt. Ainsi, la stimulation par du LPS de cultures d'hépatocytes humains induisait une augmentation par deux fois de la capacité de transport membranaire de l'arginine. Cependant, ce mécanisme étant rapidement saturable, son implication dans l'augmentation d'iNOS pourrait n'être que minoritaire [8]. Par contre, la diminution des taux plasmatiques de L-arginine pourrait être un facteur limitant la production de NO au cours des états inflammatoires. Dans ces situations, la production de NO pourrait être maintenue grâce au recyclage de cette molécule par le « cycle citrulline-arginine » (Fig. 1). En effet, la stimulation de macrophages murins *in vitro* par du LPS et de l'INF- γ induisait une augmentation de l'expression de l'argininosuccinate syntase, enzyme clé du recyclage de la citrulline en NO, de façon indépendante de l'expression d'iNOS, puisque le blocage de cette dernière n'influçait pas le taux d'ARNm de l'enzyme [9]. Un travail récent portant sur des patients présentant un sepsis modéré mettait en évidence, grâce à l'utilisation de traceur isotopique, que l'épuisement des réserves en citrulline était associé à une diminution de la production de novo de L-arginine et de ce fait de NO [10]. Ces taux diminués de citrulline pourraient être associés au développement de défaillances d'organes telles que le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) de l'adulte, faisant de la supplémentation en citrulline une perspective thérapeutique intéressante au cours du sepsis [11].

Il a été démontré dans des modèles animaux de sepsis que les taux de NO étaient significativement augmentés dès les premières heures du sepsis. Cette augmentation était secondaire à l'augmentation de l'expression d'iNOS tissulaire et corrélée aux taux plasmatiques de certains cytokines pro-

inflammatoires [12]. Ces données ont été ensuite confirmées chez 118 patients de réanimation admis pour tableau septique. Les taux de NO étaient significativement augmentés dès le jour de l'admission par rapport à des volontaires sains, et ceci de façon corrélée à la gravité du tableau clinique et aux taux de TNF α . La production de NO diminuait ensuite progressivement chez les patients survivants d'environ 25 % à 15 jours de l'admission, tandis qu'elle augmentait chez les patients non survivants [13].

Le peroxy-nitrite (ONOO $^-$) est un radical libre produit à partir de la réaction du NO avec l'anion superoxyde (O $_2^-$). La formation du O $_2^-$ est secondaire au « découplage » de la NOS. En effet, cette enzyme nécessite comme co-facteur la BH4 pour permettre l'oxydation de la L-arginine en citrulline et NO. Son absence dérive la réaction vers la formation de O $_2^-$ qui, couplé avec le NO, induit la formation de ONOO $^-$ (Fig. 1). De plus, cette dernière molécule induit l'inactivation du BH4 en BH2, réalisant une véritable « auto-catalyse » de sa propre formation [14]. En raison du faible pouvoir diffusif du O $_2^-$, il est communément admis que la création du ONOO $^-$ a lieu sur son site de production [15]. L'ONOO $^-$ est à l'origine d'une oxydation rapide des groupes sulfhydryl et thioéthers, ainsi que d'une nitration et hydroxylation des composés aromatiques tels que la tyrosine, le tryptophane et la guanine. Ces modifications sont décrites comme induisant de nombreuses altérations de fonctions cellulaires, telles que la diminution de l'activité protéique, l'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale, la peroxydation des lipides membranaires, la dysfonction des pompes membranaires Na $^+$ /K $^+$ ATPase et même la réalisation de dégâts directs sur l'ADN [15]. Une autre voie de la dysfonction cellulaire induite par l'ONOO $^-$ serait une activation de l'enzyme nucléaire poly (ADP-ribose) polymérase (PARP). Celle-ci, en catalysant la production de nicotine, induirait un épuisement en NAD $^+$ conduisant à une diminution des processus énergétiques de glycolyse, de transfert d'électrons et donc de production d'ATP, pouvant participer à la dysfonction cellulaire et tissulaire et conduire à la mort cellulaire [16]. Ces modifications cellulaires pourraient aboutir aux processus ultimes que sont la nécrose ou l'apoptose cellulaire et participer aux dysfonctions d'organes du sepsis.

Toxicité mitochondriale du NO et de ses dérivés

Au cours du choc septique, le métabolisme énergétique est fortement diminué, avec présence d'une véritable crise énergétique secondaire à la diminution d'oxygène disponible pour la cellule. Ce défaut d'oxygénation induit une diminution drastique de l'ATP fournie à partir du glucose, du fait de l'inhibition du cycle de Krebs. Paradoxalement, ce déficit persiste chez les patients septiques malgré une optimisation

du transport en oxygène par les mesures de réanimation initiale et la pression artérielle en O_2 (PaO_2) mesurée est le plus souvent normale, alors que le faible différentiel avec la pression veineuse (PvO_2) semble montrer une mauvaise extraction tissulaire de l'oxygène. Ceci traduit un défaut d'utilisation au niveau cellulaire appelé « hypoxie cytopathique ». Ainsi, dans une étude portant sur 19 patients septiques non choqués, la consommation d' O_2 par les cellules mononucléées circulantes était diminuée de 16 % avec une altération significative des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire, associée à une augmentation du taux circulant de NO [17]. Cette dysfonction mitochondriale est impliquée dans l'apparition des défaillances d'organes multiples observées au cours du sepsis. Plusieurs mécanismes semblent participer à cet état pathologique et les voies du NO y jouent une place importante. Le NO présente un effet propre en inhibant l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire [18,19]. L'inhibition de ce complexe rend la mitochondrie inapte à réaliser la réduction finale de l'oxygène en énergie. Ainsi, malgré des conditions de normo ou d'hyperoxie, souvent observées au cours du choc septique, l'oxygénation cellulaire reste déficitaire du fait de l'inactivation de la chaîne respiratoire. De plus, l' $ONOO^-$ pourrait activer la PARP responsable d'une diminution des principaux substrats de la chaîne respiratoire et de ce fait d'une inhibition du complexe I de cette chaîne. L'origine de la production du NO au niveau de la mitochondrie est actuellement controversée. Ainsi, l'existence d'une NOS mitochondriale est suspectée et pourrait moduler le fonctionnement de la chaîne respiratoire par la production de NO à proximité [19]. Il n'est pas établi pour le moment si cette mtNOS est l'expression d'un gène distinct des autres isoformes de NOS ou bien s'il s'agit d'une translocation à la membrane mitochondriale par adressage post-traductionnel d'une des trois NOS. Une autre hypothèse pour la mise à disposition du NO au sein de la mitochondrie pourrait être une diffusion de ce radical à partir de son site de synthèse cytosolique. Enfin, en conditions hypoxiques, la cytochrome oxydase mitochondriale pourrait entraîner une réduction des nitrites permettant le recyclage en NO [20].

Effets macro et microcirculatoires du NO

Le NO est un agent indispensable à la régulation de la vaso-réactivité en conditions physiologiques. La production endothéliale par l'eNOS est secondaire, principalement à la détection de force de cisaillement pariétale ou « *shear stress* », ainsi qu'au caractère pulsatile de la pression artérielle [21,22]. Les mécanismes moléculaires permettant la détection de cette tension pariétale sont nombreux et feraient intervenir différentes voies de signalisation, dont les intégrines, la modification du cytosquelette endothélial, la perturbation du glycocalyx, la voie des tyrosines kinases...[23] Après production au sein

de la cellule endothéliale, principalement par la eNOS, mais également plus faiblement par la nNOS, le NO diffuse librement vers les couches musculaires de la média vasculaire, où il active une guanylate cyclase soluble cytosolique permettant d'augmenter la production de GMPc [24]. Le GMPc est un second messenger induisant une cascade de transduction intracellulaire impliquant de multiples kinases, responsables de la diminution du calcium cytosolique et limitant de ce fait la contraction de la cellule musculaire lisse [25]. L'effet vasodilatateur du NO résulte donc d'une diminution du tonus vasculaire intrinsèque.

Au cours des états septiques, il est actuellement suggéré que l'activation de l'iNOS induirait une augmentation importante du NO plasmatique et serait impliquée dans la vasodilatation observée au cours des états de choc [24]. Dans un modèle murin de sepsis par ponction ligature cœcale, l'abolition de l'activité iNOS (par invalidation génique ou inhibiteur pharmacologique) n'induisait que peu de différence quant à la pression artérielle, mais une amélioration significative de la réponse à la noradrénaline [26]. Il semble donc que les voies du NO inductible aient un effet indirect sur l'hypotension artérielle du sepsis par la moindre sensibilité aux catécholamines, qu'elles soient endogènes ou exogènes, plus que par un effet vasodilatateur direct. Des travaux récents menés dans un modèle murin de sepsis identifient la nNOS comme facteur de résistance aux vasopresseurs. En effet, cette NOS était exprimée de façon importante dans les tissus vasculaires et corrélée aux taux de GMPc, tandis que son inhibition restaurait la réponse aux amines vasopressives [27]. Ainsi, la nNOS semble avoir un rôle important dans la dysfonction circulatoire du choc septique. De plus, au cours du processus septique, la métabolisation de la L-arginine par les NOS ne serait que partielle du fait d'un déficit de fonctionnement du site oxygénase, soit par des conditions d'hypoxies locales, soit par un déficit en co-facteur BH4, déviant alors la production vers la formation d'ion superoxyde (O_2^-). La combinaison avec le NO déjà présent pourrait alors conduire à la formation de peroxy-nitrite $ONOO^-$ présentant une toxicité vasculaire avec hypotension artérielle. L' $ONOO^-$ aurait la capacité d'inactiver les catécholamines par oxydation au niveau de leur cycle aromatique ou bien d'induire une inactivation des récepteurs α et β adrénergiques, ainsi que de ceux pour la dopamine ou la vasopressine [28–30]. Ainsi, l' $ONOO^-$ pourrait être en partie responsable de l'hypotension observée au cours du sepsis. Dans un modèle ex vivo d'aorte thoracique de rat, l'incubation en présence d' $ONOO^-$ entraînait une diminution de la réponse vasomotrice et une destruction de la noradrénaline, tandis que l'utilisation de donneur de NO n'entraînait pas de modification du tonus vasculaire. D'après ces données, il semble que le NO présente peu d'impact sur le tonus vasculaire, tandis que l' $ONOO^-$ produit en situations d'hypoxie pourrait participer à l'hypotension observée au cours du sepsis.

La microcirculation est particulièrement atteinte au cours du choc septique et potentiellement responsable de multiples défaillances d'organes. Le NO est capable de diffuser au sein de la lumière vasculaire et d'agir ainsi sur les éléments circulants. Il peut ainsi moduler la déformabilité des érythrocytes et des leucocytes et est un acteur important de l'activité plaquettaire au cours du sepsis [31]. L'inactivation de la production de NO au cours d'un modèle endotoxinique provoque une augmentation de l'adhésion plaquettaire, témoin du rôle inhibiteur du NO [32]. L'ONOO⁻ augmenterait l'adhésion leucocytaire et plaquettaire au niveau des veinules post-capillaires et participerait à l'augmentation de la perméabilité capillaire au cours du sepsis par désorganisation des jonctions serrées intercellulaire [15,33]. De plus, ce radical libre semblerait être un acteur important de la dysfonction de la média vasculaire et donc de l'hypoperfusion tissulaire. L'administration d'ONOO⁻ altère la relaxation vasculaire par des agents vasodilatateurs observée ex vivo [34] et a contrario la neutralisation de l'O₂⁻ protège contre cette dysfonction dans des modèles murins de choc septique [35]. Ainsi, l'ONOO⁻ pourrait participer à la dysfonction microcirculatoire du sepsis en limitant les phénomènes de vasodilatation capillaire nécessaires au maintien de la perfusion d'organe. Dans un modèle de cœur isolé de rat, l'application de ONOO⁻ induisait une dysfonction de la vasoréactivité coronarienne avec absence de la vasodilatation normalement induite par l'acétylcholine ou l'isoprotérénol [34]. Les hypothèses pour cette dysfonction de la vasoréactivité musculaire lisse sont multiples : diminution de l'ATP disponible par inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale ou par activation de la PARP, nitration de l'actine F, activation directe de canaux potassiques, inactivation des pompes calciques du réticulum sarcoplasmique [15]. Par ailleurs, la déviation du métabolisme de l'arginine vers l'ONOO⁻ pourrait se solder par une carence en NO microvasculaire, responsable d'une diminution du signal vasodilatateur exercé par ce radical.

De façon concomitante, la production de NO par l'iNOS augmente l'expression d'endothéline-1 et régulerait également la production de thromboxane A₂, deux molécules à fort pouvoir vasoconstricteur [36,37]. Ainsi, le NO jouerait un rôle important dans la balance entre vasodilatation et vasoconstriction, pouvant expliquer les résultats négatifs des travaux cliniques tentant d'inhiber ou d'augmenter sa production au cours du sepsis (voir plus loin).

Effets cardiaques du NO

Les cellules de l'endothélium cardiaque, les cardiomyocytes et les neurones à destinée cardiaque sont pourvus des trois types de NOS tels que mis en évidence par immunohistochimie. Alors que l'eNOS est présente au niveau de la mem-

brane cellulaire au sein d'invagination appelée « cavéolles », la nNOS est exprimée au niveau du réticulum sarcoplasmique des cardiomyocytes [38]. Ces différences de localisation conditionnent en partie les sites de régulation de la fonction cardiaque. Ainsi, le NO produit par l'eNOS inhibe l'activité des récepteurs β-adrénergiques, comme mis en évidence par l'utilisation de souris KO pour cette enzyme. Le NO produit par la nNOS sarcoplasmique semble plutôt opérer un effet sur la régulation intracellulaire des flux calciques par inhibition de l'activation du récepteur à la ryanodine. Enfin, de façon commune à ces deux NOS, le NO active la protéine kinase G (via la voie du GMPc) induisant une phosphorylation de la troponine I (et donc une diminution des interactions troponine-calcium) et une altération des flux calciques transmembranaires par inactivation des canaux calciques de type L [38,39]. Cependant, ces effets semblent influencés par la concentration locale en NO, puisque de faibles concentrations de NO semblent paradoxalement stimuler la protéine kinase A, responsable d'un effet inotrope positif. En situation pathologique, la production de NO est explosive, notamment par le biais de l'induction de l'iNOS cytosolique. Le NO produit induit les mêmes effets que précédemment, mais de façon décuplée, associés à un stress radicalaire par production de ONOO⁻. En effet, l'inactivation du gène de l'iNOS induisait une augmentation de la réponse aux catécholamines et du travail myocardique dans un modèle murin de ponction ligature cœcale (PLC) [26]. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs de NOS et de donneurs de NO a permis de mettre en évidence un effet modulateur du NO sur la synthèse de noradrénaline par le système autonome cardiaque. La diminution des taux de NO neuroaux induisait une augmentation de la production de noradrénaline, témoin du tonus inhibiteur du NO sur le système autonome [40]. De plus, les cardiomyocytes sont particulièrement sensibles au ONOO⁻, comme l'atteste l'inhibition de la contraction et la diminution de la fonction cardiaque systolique et diastolique dans un modèle inflammatoire de cœur isolé-perfusé de rat [41]. Cette dysfonction myocardique secondaire au ONOO⁻ pourrait être due à de multiples étiologies : inhibition de la créatine kinase myofibrillaire, nitration de l'α-actinine, activation de métalloprotéases et activation de la PARP [15].

Effets immunologiques du NO

Le NO présente également des effets sur les cellules du système immunitaire. Au cours du sepsis, les veinules post-capillaires sont le site d'une intense réaction inflammatoire avec infiltrat neutrophile et augmentation de la perméabilité à l'eau et aux protéines potentiellement impliquée dans l'apparition des défaillances d'organes [42]. La réaction neutrophile se traduit par une augmentation des contacts entre

l'endothélium et les leucocytes circulants. Il s'opère initialement un contact cellulaire faible, puis un roulement ou « rolling » le long de l'endothélium et enfin une adhésion forte intercellulaire avant migration des neutrophiles à travers la paroi vasculaire. À l'état physiologique, le NO est un acteur primordial de ces interactions en inhibant l'adhésion neutrophile à l'endothélium, comme démontré par l'utilisation d'antagoniste du NO sur des capillaires mésentériques félins [43]. Cet effet inhibiteur du NO sur l'adhésion neutrophile à l'état physiologique a pu également être mis en évidence dans des modèles de souris KO pour l'eNOS, mais aussi la nNOS, témoin également du rôle de cette dernière dans ces interactions [44,45]. Au cours du sepsis, l'infiltration neutrophile est majorée par le syndrome inflammatoire. Le NO semble ici aussi jouer un rôle central dans ce processus. Ainsi, un certain nombre d'études animales se sont intéressées aux processus de réaction inflammatoire dans des modèles de souris KO pour l'iNOS. Initialement, la plupart de ces travaux utilisaient des modèles de sepsis induit par le LPS ou des modèles de PLC extrêmement létaux. Ces travaux mettaient en évidence une augmentation des processus de *rolling* et d'adhésion neutrophile, ainsi que de migration cellulaire chez les souris déficientes en iNOS, témoin du rôle modulateur négatif du NO au cours du processus septique [45-47]. L'inhibition de la migration des neutrophiles pourrait être en relation avec une *down-regulation* du CXCR2 par le NO, récepteur à une des principales chémokines synthétisées au cours du processus infectieux [48]. Une autre voie pourrait être une nitrosylation du réseau d'actine des neutrophiles limitant la migration cellulaire via l'inhibition de l'activité de la β_2 -intégrine [49]. Hickey et al. ont pu mettre en évidence, grâce à l'utilisation d'une chambre de flux in vitro exempte de cellules endothéliales, que les leucocytes produisaient de façon inductible le NO limitant leur adhésion à la microcirculation [50]. Cependant, il semble exister dans la littérature des discordances quant à l'effet du NO sur l'infiltrat neutrophile inflammatoire. Certaines études sur PLC montraient un effet promigratoire du NO associé à une modulation des protéines de surface. Très probablement, le NO présente un effet opposé en fonction de son niveau d'expression et du profil inflammatoire de l'organisme. Dans un modèle murin de PLC, deux niveaux d'intensité de sepsis furent analysés : un niveau léthal avec 100 % de mortalité et un niveau sub-léthal avec une mortalité de 40 % à cinq jours. Les souris du modèle léthal présentaient une production intense en cytokines pro-inflammatoire associée à une diminution de l'adhésion et de la migration leucocytaire. La migration leucocytaire était restaurée chez les souris KO déficientes en iNOS, reflet donc d'un effet antimigratoire du NO inductible. Cette diminution de migration était associée à la diminution de l'expression des β_2 -intégrines des neutrophiles, molécule impliquée dans les interactions endothélium-leucocytes. A contrario, les souris présentant

un sepsis sub-léthal présentaient une augmentation de l'activation migratrice des neutrophiles, suggérant un effet promigratoire du NO dans cette situation [51]. Ainsi, l'effet du NO sur la migration leucocytaire semblerait être influencé par l'intensité du stress inflammatoire. Concernant les mécanismes précis d'adhésion leucocytaire, les travaux de Hickey et al., sur un modèle de LPS (n'induisant ainsi qu'un nombre plus restreint de voies de l'inflammation), ne mettaient pas en évidence d'effet de l'iNOS sur l'expression des molécules impliquées dans l'adhésion leucocytaire que sont les E-sélectines, P-sélectine et VCAM-1 [45], alors que des travaux réalisés avec PLC objectivaient une augmentation des E et P sélectines par l'iNOS [52]. Il semble donc que le sepsis induise une augmentation des protéines d'adhésion leucocytaire via la production de NO grâce à des voies de signalisation complexes. Par ailleurs, dans un modèle KO pour l'iNOS, Singer et al. mettaient en évidence une diminution de l'adhésion neutrophile au sein de la microvascularisation hépatique [53]. Ces données contradictoires sur l'adhésion neutrophile témoignent d'un effet variable du NO sur cette fonction, lié au profil inflammatoire de l'hôte, à la localisation tissulaire et aux voies majoritaires activées dans le sepsis étudié. Par ailleurs, le NO augmenterait la production de TNF- α en réponse à l'injection de LPS et activerait la phagocytose dans les phases initiales du sepsis [54].

La production de NO influence également la fonction des macrophages, puisque l'administration de NO exogène inhibe la migration de ces monocytes et entraîne une diminution de leur prolifération et de la production de certaines cytokines. Ces modifications de la fonction monocyttaire peuvent être contrebalancées par un effet inverse d'ONOO⁻. En effet, ce radical libre peut entraîner la production d'IL-6 et de TNF- α par les macrophages via l'activation du NF- κ B.

Pour conclure, la production de NO au cours du sepsis est à la fois indispensable à une réaction adaptée contre le pathogène et délétère en cas de pérennisation du processus infectieux.

Effets cérébraux du NO

Le NO participe à de nombreux processus physiologiques cérébraux. Il agirait sur la microvascularisation, régulant de ce fait la perfusion tissulaire en oxygène, mais présenterait également un rôle en tant que neurotransmetteur, lui conférant un effet cognitif et comportemental. La production importante de radicaux libres de l'oxygène et de l'azote par un métabolisme intense, ainsi que la composition conséquente en acides gras insaturés comportant des acides eicosapentaénoïques et docosahexaénoïques font des tissus cérébraux, notamment neuronaux, une cible privilégiée de toxicité des dérivés du NO, grâce à la nitrosylation des acides gras, pouvant même conduire à l'apoptose neuronale

dans certaines zones sensibles [55]. Ce processus pourrait jouer un rôle dans la genèse de l'encéphalopathie associée aux processus septiques. L'origine de ce stress nitro-oxydatif cérébral serait multiple : carence dans les processus antioxydants, notamment par augmentation de la superoxyde dismutase, peroxydation des lipides membranaires cérébrovasculaires et parenchymateux, inflammation locale avec stress cytokinique parenchymateux, déplétion locale en NO de par sa transformation en ONOO⁻ et de ce fait inhomogénéité de la microvascularisation cérébrale, dysfonction mitochondriale et enfin apoptose neuronale [56]. Ces processus pathologiques ne sont pas propres au tissu cérébral, mais exacerbés par le haut métabolisme énergétique y régnant et la sensibilité accrue à l'hypoxie.

Autres défaillances d'organes influencées par le NO

L'activité NOS constitutive participe à un nombre important de fonctions pulmonaires, comme la vasodilatation pulmonaire, la bronchodilatation et la modulation immunitaire locale [57]. Au cours du processus septique, les taux de nitrates et de nitrites sont augmentés au sein du liquide alvéolaire et du sang pulmonaire [58,59]. L'inhibition pharmacologique ou génique des NOS pulmonaires, dans des modèles animaux, atténue l'altération de la perméabilité vasculaire pulmonaire [60,61]. Par ailleurs, le NO inducible synthétisé par les neutrophiles pulmonaires au cours du processus septique est un facteur de SDRA, comme démontré par l'utilisation de souris chimériques iNOS^{-/-}. Ce NO, produit spécifiquement par les neutrophiles, induit une augmentation de l'infiltration inflammatoire pulmonaire, un stress oxydant et une augmentation de la perméabilité microvasculaire [62]. Parallèlement, l'ONOO⁻ inhibe les pompes Na⁺/K⁺ ATP dépendantes dans les pneumocytes de type 2 et perturbe ainsi la formation du surfactant, pouvant participer à l'altération des échanges gazeux au cours du sepsis [63].

Le NO semble pouvoir influencer également la fonction surrénalienne au cours du processus septique. Si la pertinence clinique et la définition de l'insuffisance surrénalienne relative liée au sepsis sont actuellement sujettes à débat, le NO produit au cours de cet état pathologique présente des effets indiscutables sur la fonction corticotrope. Ainsi, dans des modèles septiques de type LPS ou PLC, l'utilisation de donneurs de NO diminuait la capacité de fixation du récepteur aux glucocorticoïdes, tandis que l'inactivation du gène de l'iNOS restaurait cette fonction [64].

Le NO synthétisé au cours du sepsis présente également des effets néfastes sur le foie [65], le rein [66] ou le tissu intestinal. Comme précédemment, l'ONOO⁻ aurait une place non négligeable dans la genèse de ces dysfonctions de par les nombreuses lésions intracellulaires qu'il peut induire.

Il serait notamment à même de promouvoir la translocation bactérienne depuis le tissu intestinal par altération de la perméabilité tissulaire [37].

Perspectives thérapeutiques

Devant l'importance physiopathologique du NO dans le sepsis et les quelques études animales ayant démontré une amélioration de la survie par l'inactivation de ce radical, il est rapidement apparu intéressant d'essayer de bloquer ses effets chez l'homme au cours du choc septique. Cependant, les études actuellement publiées restent toutes négatives. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur non spécifique du NO, le N^G-méthyl-L-arginine (L-NMMA), sur un grand collectif multicentrique de patients atteints de choc septique, s'est soldée par un arrêt prématuré de l'étude en raison d'une augmentation de la mortalité dans le groupe traité (59 % vs 49 %) [67]. De même, l'utilisation du même inhibiteur non spécifique chez des patients non septiques en choc cardiogénique réfractaire après infarctus du myocarde ne présentait pas de bénéfice clinique [68]. Des données récentes mettent en évidence que l'iNOS n'est pas seule dans la régulation de la réponse aux catécholamines du choc septique. Ainsi, l'expression de nNOS serait augmentée dans les parois vasculaires et l'inhibition spécifique de cette NOS restaurerait l'activité des catécholamines [27]. Ceci incite donc à envisager un blocage plus sélectif de certaines NOS. Une autre approche consisterait à éliminer le NO circulant grâce à des chélateurs, permettant ainsi le maintien des signalisations intracellulaires des voies du NO. Cependant, dans l'étude PHOENIX, l'utilisation d'un tel produit vs placebo chez 377 patients en choc septique s'est soldée par l'absence de différence significative, avec même une tendance à l'augmentation de la mortalité [69].

Les statines ont également été étudiées comme traitement modulant les voies du NO. En effet, l'administration de pravastatine dans un modèle murin endotoxinique induisait une amélioration de la fonction microcirculatoire, avec restauration de la vasodilatation induite par l'acétylcholine secondaire à une augmentation de l'expression de l'eNOS, mais pas de l'iNOS [70]. Cependant, les études humaines sont actuellement décevantes avec l'absence de gain en termes de mortalité, que ce soit chez des patients déjà traités au préalable [71] ou bénéficiant de l'instauration d'une statine en sus des antibiotiques [72]. Il en était de même dans un travail récent portant sur 745 patients, en SDRA au cours d'un sepsis, qui bénéficiaient de l'adjonction de rosuvastatine vs placebo [73].

Enfin, les stratégies visant à améliorer la microcirculation par apport exogène de NO se sont également soldées par des échecs. Ainsi, l'administration inhalée de NO vs placebo chez 50 patients en choc septique n'a pas permis d'amélioration de

la microcirculation, de la clairance des lactates ou des défaillance d'organes [74]. Dans un autre travail, portant sur 70 patients, l'administration de nitroglycérine comme donneur de NO plasmatique n'induisait pas d'amélioration de la microcirculation, mais induisait une surmortalité [75]. Cependant, il faut relativiser ces mauvais résultats par deux points : dans ces deux études, certains patients avaient une microcirculation normale avant administration de dérivés du NO, n'en ayant donc peut-être pas besoin et ne payant peut-être que le prix des effets secondaires, d'autre part au sein d'autres thérapeutiques, l'équipe de Bakker a utilisé de la nitroglycérine en cas de suspicion de dysfonction microcirculatoire (lactate élevé et SvcO₂ élevée) dans le groupe actif dans lequel il y avait une baisse de mortalité [76].

Conclusion

Le NO est donc un élément de régulation d'un nombre important de processus physiopathologiques au cours des situations septiques graves. Cependant, les différents essais cliniques visant à antagoniser ses effets ne sont actuellement pas parvenus à améliorer le pronostic des patients. Ces résultats peuvent être expliqués par une physiologie complexe du NO, avec des effets potentiellement néfastes de son inactivation dans certains tissus et dans certaines situations où sa présence est requise. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-tendant l'action du NO et une meilleure caractérisation de ses effets en fonction des phases de la pathologie septique seront probablement nécessaires avant de pouvoir pharmacologiquement moduler ses effets avec un bénéfice clinique.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Références

- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373–6
- Michel T, Li GK, Busconi L (1993) Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6252–6
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768–70
- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051–64
- Nussler AK, Billiar TR (1993) Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 54:171–8
- Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, et al (1993) Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:522–6
- Schroeder RA, Kuo PC (1995) Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Anesth Analg* 81:1052–9
- Inoue Y, Bode BP, Beck DJ, et al (1993) Arginine transport in human liver. Characterization and effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Ann Surg* 218:350–62
- Nussler AK, Billiar TR, Liu ZZ, Morris SM (1994) Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. *J Biol Chem* 269:1257–61
- Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, Deutz NE (2009) Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr* 89:142–52
- Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, et al (2013) Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. *Crit Care Lond Engl* 17:R10
- Tsao CM, Li KY, Chen SJ, et al (2014) Levosimendan attenuates multiple organ injury and improves survival in peritonitis-induced septic shock: studies in a rat model. *Crit Care Lond Engl* 18:652
- Bruins MJ, Lamers WH, Meijer AJ, et al (2002) In vivo measurement of nitric oxide production in porcine gut, liver and muscle during hyperdynamic endotoxaemia. *Br J Pharmacol* 137:1225–36
- Huet O, Duranteau J (2008) Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres *17:387–92*
- Szabó C, Módis K (2010) Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock. *Shock Augusta Ga* 34 Suppl 1:4–14
- Jagtap P, Szabó C (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 4:421–40
- Garabou G, Morén C, López S, et al (2012) The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis* 205:392–400
- Szabó C, Day BJ, Salzman AL (1996) Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett* 381:82–6
- Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al (2002) Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360:219–23
- Hollenberg SM, Cinel I (2009) Bench-to-bedside review: nitric oxide in critical illness—update 2008. *Crit Care Lond Engl* 13:218
- Awolesi MA, Widmann MD, Sessa WC, Sumpio BE (1994) Cyclic strain increases endothelial nitric oxide synthase activity. *Surgery* 116:439–44
- Corson MA, James NL, Latta SE, et al (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79:984–91
- Boo YC, Jo H (2003) Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C499–508
- Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE (2010) Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:97–104
- Tulis DA (2008) Novel therapies for cyclic GMP control of vascular smooth muscle growth. *Am J Ther* 15:551–64
- Barth E, Radermacher P, Thiemermann C, et al (2006) Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. *Crit Care Med* 34:307–13
- Nardi GM, Scheschowitsch K, Ammar D, et al (2014) Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. *Crit Care Med* 42:e391–400
- Lewis SJ, Hoque A, Sandock K, et al (2007) Differential effects of peroxynitrite on the function of arginine vasopressin V(1a) receptors and alpha(1)-adrenoceptors in vivo. *Vasc Pharmacol* 46:24–34
- Lewis SJ, Hoque A, Walton TM, Kooy NW (2005) Potential role of nitration and oxidation reactions in the effects of peroxynitrite

- on the function of beta-adrenoceptor sub-types in the rat. *Eur J Pharmacol* 518:187–94
30. Benkusky NA, Lewis SJ, Kooy NW (1999) Peroxynitrite-mediated attenuation of alpha- and beta-adrenoceptor agonist-induced vascular responses in vivo. *Eur J Pharmacol* 364:151–8
 31. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG (2003) Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis—hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care Lond Engl* 7:359–73
 32. Cerwinka WH, Cooper D, Kriegstein CF, et al (2002) Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1111–7
 33. Mazzon E, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S (2002) Role of tight junction derangement in the endothelial dysfunction elicited by exogenous and endogenous peroxynitrite and poly(ADP-ribose) synthetase. *Shock Augusta Ga* 18:434–9
 34. Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, et al (1994) Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12383–7
 35. Zingarelli B, Day BJ, Crapo JD, et al (1997) The potential role of peroxynitrite in the vascular contractile and cellular energetic failure in endotoxic shock. *Br J Pharmacol* 120:259–67
 36. Hellyer PW, Johnson LW, Olson NC (1997) Effect of NG-nitro-L-arginine-methyl-ester on cardiopulmonary function and biosynthesis of cyclooxygenase products during porcine endotoxemia. *Crit Care Med* 25:1051–8
 37. Eum HA, Park SW, Lee SM (2007) Role of nitric oxide in the expression of hepatic vascular stress genes in response to sepsis. *Nitric Oxide* 17:126–33
 38. Simon JN, Duglan D, Casadei B, Carnicer R (2014) Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation-contraction coupling in health and disease. *J Mol Cell Cardiol* 73:80–91
 39. Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, et al (2007) Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci* 81:779–93
 40. Balligand JL, Kobzik L, Han X, et al (1995) Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 270:14582–6
 41. Panas D, Khadour FH, Szabó C, Schulz R (1998) Proinflammatory cytokines depress cardiac efficiency by a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol* 275:H1016–23
 42. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, et al (2006) Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368: 157–69
 43. Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4651–5
 44. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, et al (1999) Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 276:H1943–50
 45. Hickey MJ, Granger DN, Kubes P (2001) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand* 173:119–26
 46. Hollenberg SM, Guglielmi M, Parrillo JE (2007) Discordance between microvascular permeability and leukocyte dynamics in septic inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Crit Care Lond Engl* 11:R125
 47. Secco D Dal, Paron JA, Oliveira SHP de, et al (2003) Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide* 9:153–64
 48. Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, et al (2007) Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit Care Med* 175:490–7
 49. Thom SR, Bhopale VM, Mancini DJ, Milovanova TN (2008) Actin S-nitrosylation inhibits neutrophil beta2 integrin function. *J Biol Chem* 283:10822–34
 50. Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, et al (1997) Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J* 11:955–64
 51. Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, et al (2002) Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun* 70:3602–10
 52. Lush CW, Cepinskas G, Sibbald WJ, Kvietys PR (2001) Endothelial E- and P-selectin expression in iNOS- deficient mice exposed to polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G291–7
 53. Singer G, Stokes KY, Neil Granger D (2013) Reactive oxygen and nitrogen species in sepsis-induced hepatic microvascular dysfunction. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc.* 62:155–64
 54. Fortin CF, McDonald PP, Fülöp T, Lesur O (2010) Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. *Shock Augusta Ga* 33:344–52
 55. Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem* 97:1634–58
 56. Berg RMG, Møller K, Bailey DM (2011) Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1532–44
 57. Mehta S (2005) The effects of nitric oxide in acute lung injury. *Vascul Pharmacol* 43:390–403
 58. Pheng LH, Francoeur C, Denis M (1995) The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome. *Inflammation* 19:599–610
 59. Zhu S, Ware LB, Geiser T, et al (2001) Increased levels of nitrate and surfactant protein a nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 163:166–72
 60. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, Ward PA (1993) Requirements for neutrophil products and L-arginine in ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 142:1217–26
 61. Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, et al (1997) Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun* 65:3644–7
 62. Wang L, Taneja R, Razavi HM, et al (2012) Specific role of neutrophil inducible nitric oxide synthase in murine sepsis-induced lung injury in vivo. *Shock Augusta Ga* 37:539–47
 63. Hu P, Ischiropoulos H, Beckman JS, Matalon S (1994) Peroxynitrite inhibition of oxygen consumption and sodium transport in alveolar type II cells. *Am J Physiol* 266:L628–34
 64. Fernandes D, Assreuy J (2008) Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock Augusta Ga* 30 Suppl 1:10–3
 65. Mura V La, Pasarin M, Rodriguez-Villarupla A, et al (2014) Liver Sinusoidal Endothelial Dysfunction After LPS Administration: A Role for Inducible-Nitric Oxide Synthase. *J. Hepatol* 61:1321–7
 66. Ishikawa K, Calzavacca P, Bellomo R, et al (2012) Effect of selective inhibition of renal inducible nitric oxide synthase on renal blood flow and function in experimental hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med* 40:2368–75
 67. López A, Lorente JA, Steingrub J, et al (2004) Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med* 32:21–30
 68. TRIUMPH Investigators, Alexander JH, Reynolds HR, et al (2007) Effect of tilarginine acetate in patients with acute myocardial infarction and cardiogenic shock: the TRIUMPH randomized controlled trial. *JAMA* 297:1657–66
 69. Vincent JL, Privalle CT, Singer M, et al (2015) Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled Phase III Study of Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene in Distributive Shock (PHOENIX). *Crit Care Med* 43:57–64

70. McGown CC, Brown NJ, Hellewell PG, et al (2010) Beneficial microvascular and anti-inflammatory effects of pravastatin during sepsis involve nitric oxide synthase III. *Br J Anaesth* 104:183–90
71. Kruger PS, Harward ML, Jones MA, et al (2011) Continuation of statin therapy in patients with presumed infection: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 183:774–81
72. Papazian L, Roch A, Charles PE, et al (2013) Effect of statin therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia: a randomized clinical trial. *JAMA* 310:1692–700
73. National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network, Truwit JD, Bernard GR, Steingrub J, et al (2014) Rosuvastatin for sepsis-associated acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 370:2191–200
74. Trzeciak S, Glaspey LJ, Dellinger RP, et al (2014) Randomized controlled trial of inhaled nitric oxide for the treatment of microcirculatory dysfunction in patients with sepsis. *Crit Care Med* 42:2482–92
75. Boerma EC, Koopmans M, Konijn A, et al (2010) Effects of nitroglycerin on sublingual microcirculatory blood flow in patients with severe sepsis/septic shock after a strict resuscitation protocol: a double-blind randomized placebo controlled trial. *Crit Care Med* 38:93–100
76. Jansen TC, van Bommel J, Schoonderbeek FJ, et al (2010) Early lactate-guided therapy in intensive care unit patients: a multicenter, open-label, randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 182:752–61