

Université de Montréal

**Ontogénie des récepteurs EP de la prostaglandine E2 (PGE₂)
et de ses synthases spécifiques dans le canal artériel.**

Par

Asmàa Bouayad

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

en physiologie

janvier, 2003

©Asmàa Bouayad, 2003



W

4

U58

2003

v. 111

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Ontogénie des récepteurs EP de la prostaglandine E2 (PGE₂) et de ses synthases
spécifiques dans le canal artériel.

Par

ASMÀA BOUAYAD

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée aux membres du jury

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

en physiologie

Dr Jacques Billette	Président-rapporteur
Dr Jean-Claude Fouron	Directeur de recherche
Dr Sylvain Chemtob	Co-directeur de recherche
Dr Angelino Calderone	Membre du jury
Dr Bart Van Overmeire	Membre externe du jury

Thèse acceptée le: 30 Juin 2003

Résumé

Le canal artériel (CA) remplit deux fonctions majeures: rester ouvert durant la vie foetale et se fermer rapidement après la naissance afin d'assurer la séparation des circulations systémique et pulmonaire. Les prostaglandines, surtout la prostaglandine E2 (PGE₂), joue un rôle primordial dans le maintien de l'ouverture du CA foetal. Par conséquent, tout élément relié à la synthèse de la PGE₂ ou à sa voie de signalisation constituerait une nouvelle cible pour contrôler le diamètre du CA autre que celle des thérapies conventionnelles qui ont des effets secondaires majeurs.

La réactivité du CA à la PGE₂ est significativement diminuée après la naissance, ce qui facilite la fermeture de ce vaisseau. Les mécanismes de cette diminution de réponse à la PGE₂ restent méconnus. Nous avons donc recherché dans un premier temps s'il existait une variation de la densité totale des récepteurs de la PGE₂, les EP₁₋₄, et/ou de leur nature dans le CA au cours de la période périnatale. Nous avons observé que PGE₂ dilate le CA du fœtus en fin de gestation par des voies de signalisation qui impliquent l'AMPC (EP₂ et EP₄) ou les canaux K_{ATP} (EP₃) tandis que les effets de la PGE₂ dans le CA du NN semblent médiés exclusivement par les récepteurs EP₂ *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation simultanée des ligands spécifiques à tous les récepteurs EP présents dans le CA serait une démarche trop complexe.

Une autre façon de contrôler le tonus du CA serait de déterminer les facteurs qui entraînent l'importante augmentation périnatale de PGE₂. Une induction ontogénique de la cyclooxygénase inductible (COX-2) est connue mais ne constitue pas une explication suffisante. C'est pour cette raison que nous stipulons un rôle des synthases spécifiques de PGE₂, les PGES (membranaire (PGESm) et cytosolique (PGESc)). Nous avons démontré que l'expression de PGESm et de COX-2 est augmentée dans le CA de NN comparativement au F et qu'elle est associée à une plus grande concentration de PGE₂ chez le NN. Le facteur d'agrégation plaquettaire PAF semble jouer un rôle dans cette variation ontogénique de PGE₂. L'ensemble de ces résultats peut contribuer à développer de nouvelles molécules pour le contrôle du tonus vasculaire du canal artériel.

Mots-clés: PGE₂, récepteurs, synthases, ontogénie, canal artériel.

Abstract

The Ductus arteriosus (DA) performs two major functions: to remain patent during fetal life and to close rapidly after birth to separate the pulmonary and systemic circulations. Prostaglandins, particularly prostaglandin E₂ (PGE₂), play a major role in maintaining the patency of the fetal DA. Therefore, molecules involved in PGE₂ synthesis or signal transduction constitute potential new targets for controlling DA tone other than the conventional therapies known for their major side-effects.

Immediately after birth, the response of DA to PGE₂ is markedly reduced thereby promoting DA closure. The mechanisms for this decreased responsiveness to PGE₂ are not well understood. We investigated if age-dependent alterations in PGE₂ receptors (EP₁₋₄) and/or their subtypes may possibly contribute to the reduced responsiveness of the newborn DA to PGE₂. PGE₂ was found to dilate the late gestation fetal DA through pathways that involve either cAMP (EP₂ and EP₄) or ATP-sensitive K⁺ (K_{ATP}) channels (EP₃) while PGE₂ effects in the newborn DA seem to be exclusively mediated by EP₂ receptors both *in vitro* and *in vivo*.

The causes of the tremendous increase of PGE₂ levels observed during the perinatal period remain obscure. Moreover, since all PGE₂ receptors in DA are mostly relaxants, targeting all EP receptors would be cumbersome in closing DA. On the other hand, specific regulation of PGE₂ formation would constitute a novel approach to controlling DA tone. We tested the postulate that specific changes in PGE₂ synthases (PGES) in the DA of the newborn compared with that of the fetus may provide at least a partial explanation for the high perinatal PGE₂ levels. Both inducible isoforms of PGES and COX expression were increased in newborn DA compared with that of the fetus; this was associated with greater PGE₂ levels in the NB. Platelet aggregating factor (PAF) caused a pattern of induction similar to development as well as a delayed vasorelaxation on DA rings. Findings may help to propose new therapies for controlling DA patency.

Keywords: PGE₂, receptors, synthases, ontogeny, ductus arteriosus.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Mots-clé	iii
Abstract	iv
Keywords	iv
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des sigles et abréviations	xv
Liste partielle des agents pharmacologiques et leur action	xix
Remerciements	xx
Dédicace	xxi
CHAPITRE 1: Introduction et objectifs de cette recherche	
1.1 Introduction	1
1.2 Les prostanoïdes	2
1.3 Historique	3
1.4 Synthèse, transport et métabolisme des prostanoïdes	4
1.4.1 Synthèse des prostanoïdes	4
1.4.1.1 Phospholipases A2 et libération d'acide arachidonique	5
1.4.2.1 Cyclooxygénases et métabolisme de l'acide arachidonique	9
1.4.1.3 Synthèses des prostanoïdes	12
1.4.1.4 Isoprostanés	14
1.4.2 Stockage et libération des prostanoïdes	14
1.4.3 Transport des prostanoïdes	14
1.4.4 Métabolisme des prostanoïdes	17
1.5 Actions biologiques des prostanoïdes	18
1.5.1 Réponses inflammatoires et immunes	19
1.5.2 Système cardiovasculaire	20
1.5.3 Agrégation plaquettaire	20
1.5.4 Muscle lisse	21
1.5.5 Système rénal	21

1.5.6	Système nerveux central	22
1.5.7	Organes reproducteurs	23
1.5.8	Système endocrinien	23
1.5.9	Système gastro-intestinal	24
1.5.10	Effets mitogènes et modulation de la transcription génique	24
1.5.11	Autres actions	26
1.6	Récepteurs des prostanoides et voies de signalisation	27
1.6.1	Récepteurs EP	28
1.6.1.1	Récepteurs EP ₁	28
1.6.1.2	Récepteurs EP ₂ et EP ₄	31
1.6.1.3	Récepteurs EP ₃	33
1.6.2	Récepteurs FP	34
1.6.3	Récepteurs DP	36
1.6.4	Récepteurs IP	37
1.6.5	Récepteurs TP	38
1.7	PAF	40
1.7.1	Synthèse	40
1.7.1.1	voie de remodelage	40
1.7.1.2	voie <i>de novo</i>	41
1.7.2	Stockage et libération	41
1.7.3	Métabolisme de PAF: les PAF acétylhydrolases	42
1.7.3.1	Isoformes intracellulaires	43
1.7.3.2	Isoforme plasmatique	45
1.7.4	Effets physio-pathologiques de PAF	47
1.7.4.1	Effets de PAF sur l'endothélium	48
1.7.4.2	Rôle de PAF et des plaquettes dans la thrombose	49
1.7.4.3	Inflammation aiguë	51
1.7.4.4	Système cardiovasculaire	51
1.7.4.5	Système nerveux central	54
1.7.4.6	Asthme et anaphylaxie systémique	54
1.7.4.7	Chocs endotoxique et induit par Ig-G	55
1.7.4.8	Pathologies rénales immunitaires et rejet des transplants	56

1.7.4.9 Autres pathologies	56
1.7.5 Récepteur de PAF et voies de signalisation	57
1.7.6 Antagonistes du récepteur de PAF	59
1.7.6.1 Inhibition non spécifique des effets de PAF	59
1.7.6.2 Inhibition spécifique de PAF	59
1.7.7 Relation PAF - prostaglandines	60
1.8 Le canal artériel	61
1.8.1 Rôles physiologies du CA	62
1.8.1.1 La circulation fœtale	62
1.8.1.1.1 Prostaglandines	62
1.8.1.1.1.1 Effets vasodilatateurs des PGs	62
1.8.1.1.1.2 Sources locales de PGs	63
1.8.1.1.1.3 Prostaglandines circulantes	63
1.8.1.1.1.4 Isoformes de la cyclooxygénase	64
1.8.1.1.2 Oxyde nitrique	64
1.8.1.1.3 Monoxyde de carbone	66
1.8.1.1.4 Autres vasorelaxants du CA	66
1.8.1.2 La circulation néonatale de transition	67
1.8.1.3 Fermeture du CA	68
1.8.1.3.1 Contraction induite par l'oxygène	69
1.8.1.3.2 Prostaglandines contractiles	70
1.8.1.3.3 Élimination des PGs vasodilatateurs	71
1.8.1.3.3.1 PGE ₂ circulante	71
1.8.1.3.3.2 PGs locales	71
1.8.1.3.4 Vasoconstriction nerveuse	72
1.8.1.3.5 Autres vasoconstricteurs locaux	73
1.8.1.3.6 Tonus myogénique	74
1.8.1.3.7 Vasoconstricteurs circulants	74
1.8.1.4 Thérapies nouvelles potentielles	76
1.8.1.4.1 Persistance de l'ouverture du canal artériel	76
1.8.1.4.1.1 Antagoniste du récepteur EP ₄	76
1.8.1.4.1.2 Inhibiteur spécifique des isoformes de COX	77

1.8.1.4.1.3 Bloqueurs des canaux potassiques	77
1.8.1.4.2 Circulation systémique canal-dépendante	78
1.8.1.4.2.1 Agoniste du récepteur EP ₄	79
1.8.1.4.2.2 Activateurs des canaux potassiques	79
1.8.1.4.2.3 Donneurs d'oxyde nitrique	79
1.8.1.4.2.4 Antagoniste du récepteur ET _A	80
1.8.1.5 Conclusions	80
1.9 Rationnelles de recherche	81
1.10 Hypothèses de recherche	82
1.11 Modèles expérimentaux	83
1.12 Objectifs expérimentaux	84

CHAPITRE 2: Ontogénie Récepteurs EP dans le CA de fœtus proche-terme et le nouveau-né d'agneau.

2.1 Résumé	86
2.2 Abstract	89
2.3 Introduction	90
2.4 Materiel and methods	92
2.4.1 Materials	92
2.4.2 Tissue collection	92
2.4.3 Radioligand binding assays	92
2.4.4 cAMP measurements	93
2.4.5 Isometric tension <i>in vitro</i>	93
2.4.6 Effects of different agents on DA tone <i>in vivo</i>	95
2.4.7 Preparation of total RNA, reverse transcription and polymerase chain reaction	95
2.4.8 Statistical analysis	96
2.5 Results	97
2.5.1 Competitive displacement of [³ H]PGE ₂ in the fetal DA	97
2.5.2 Effects of different agents on cAMP production in the fetal DA	97
2.5.3 Effects of different agents on fetal DA tension <i>in vitro</i>	97

2.5.4 Effects of PGE ₂ analogs on the diameter of the fetal DA <i>in vivo</i>	98
2.5.5 Role of K ⁺ channels on EP receptor-induced fetal DA relaxation	98
2.5.6 Detection of EP receptor subtypes and isoforms in the fetal DA by PCR	99
2.5.7 Competitive displacement of [³ H]PGE ₂ : comparison between the fetal and newborn DA	99
2.6 Discussion	100
2.7 Perspectives	102
2.8 Acknowledgment	103
2.9 Reference list	104
2.10 Tables	111
2.11 Figures	114

CHAPITRE 3: Régulation développementale de la synthèse de la Prostaglandine E2 (PGE₂) dans le canal artériel de porcelet.

3.1 Résumé	117
3.2 Abstract	119
3.3 Introduction	121
3.4 Materiel and methods	123
3.4.1 Animals	123
3.4.2 Western blot analysis	123
3.4.3 PAF assay	124
3.4.4 PGE ₂ assay	124
3.4.5 Vasomotor responses of DA	124
3.4.6 Statistical analysis	125
3.5 Results	126
3.5.1 PGES, COX-2 and cPLA2 expression and PGE ₂ and PAF levels in fetal and immediate post-natal newborn DA	126
3.5.2 Effects of PAF on PGES and COX-2 expression and PGE ₂ levels in fetal DA	126
3.5.3 Effects of endogenous PAF on mPGES, COX-2 and PGE ₂ levels in DA of the perinate	127
3.6 Discussion	128
3.7 Acknowledgment	131
3.8 Reference List	132
3.8 Figures	141

CHAPITRE 4: Discussion générale, perspectives futures et conclusions

Discussion générale	146
4.1. Récepteurs EP de la PGE ₂ et contrôle du tonus du canal artériel	147
4.1.1. Distribution et régulation ontogénique des EP dans le CA	147
4.1.2. Potentiel thérapeutique des ligands des récepteurs EP dans la régulation du	150

CA	
4.1.2.1. Persistance de l'ouverture du CA (PDA)	150
4.1.2.2. Circulation CA-dépendante	152
4.2. Cyclooxygénases dans le CA	152
4.3. PGE ₂ synthases (PGES) dans le CA	155
Conclusions	158
Perspectives futures	159
CHAPITRE 5: Liste des références	161
ANNEXE	234

LISTE DES TABLEAUX

I.I	Caractéristiques majeures des synthases spécifiques impliquées dans la conversion de PGH ₂ en prostanoides.	15
I.II	Classification des récepteurs des prostanoides et leurs signaux de transduction.	29
I.III	Agonistes et antagonistes sélectifs des sous-types de récepteurs EP.	30
I.IV	Le couplage des isoformes du récepteur EP ₃ aux protéines G varie en fonction des espèces.	36
II.I	Competitive inhibition of [³ H]PGE ₂ binding to ductus arteriosus.	111
II.II	Net cAMP synthesis by ductus arteriosus from near-term fetal lamb.	112
II.III	Effects of K ⁺ channel blockade on EC ₅₀ of ductus arteriosus relaxation induced by EP receptor stimulation and cAMP elevating agents.	113

LISTE DES FIGURES

1.1	Cascade de synthèse des prostanoïdes à partir de l'acide arachidonique.	6
1.2	Synthèse des isoprostanes par voie non enzymatique.	16
1.3	Représentation schématique des isoformes du récepteur EP ₃ chez l'humain.	35
1.4	Synthèse de PAF par voie de remodelage (droite) et <i>de novo</i> (gauche).	42
1.5	Réaction catalysée par les PAF acétylhydrolases (PAF-AH).	43
1.6	Effets de PAF sur l'endothélium.	49
1.7	Relation structure-activité du récepteur de PAF.	57
1.8	Voies de signalisation du récepteur de PAF.	58
1.9	Situation anatomique du canal artériel et rôle dans la circulation cardiovasculaire fœtale.	61
1.10	Rôle des prostaglandins de type E et du tonus du canal artériel dans des situations physiologiques et pathologiques.	78
2.1	Representative displacement curves of specifically bound [³ H]PGE ₂ from lamb ductus arteriosus membrane preparations from fetal (A, B) and newborn (C, D) lambs.	114
2.2	Vasomotor response of fetal ductus to prostaglandins, prostaglandin analogs, and cAMP-elevating agents. DA rings were precontracted with 30% oxygen + indomethacin (5.6 μM) + L-NAME (0.1 mM). Dose-response to indicated compounds was determined.	115
2.3	Effects of EP ₃ agonist sulprostone on percent change in DA diameter of fetal lambs. Animal preparation is described in Methods. DA was precontracted with indomethacin (0.75 mg/kg iv) and once its diameter was <50% of the original diameter, sulprostone (0.083 μg/kg/min iv) was infused (indicated by shaded area along the abscissa). DA diameter was measured by echocardiogram.	116
3.1	Relative expression of mPGES (A), COX-2 (B), cPGES (C) and cPLA2 (D) in the ductus arteriosus (Duct), descending aorta (Ao) and pulmonary artery	141

(PA) of the fetal (F) and newborn (NB) pigs.

- 3.2 Developmental regulation of PGE₂ levels in the ductus arteriosus (A), descending aorta (B) and main pulmonary artery (C) of near-term fetus and immediate newborn piglet. 142
- 3.3 Developmental regulation of PAF levels in the ductus arteriosus (A). Dose-dependent effect of PAF on cPGES and cPLA₂ (B), mPGES (C) and COX-2 (D) expression in the fetus DA. Effect of PAF on PGE₂ levels in ductus arteriosus of fetal piglets (E). 143
- 3.4 Effects of PAF receptor antagonists BN52021 (0.1 μM) and THG315 (0.1 μM) on mPGES (A) and COX-2 (B) expression and on PGE₂ levels (C) in newborn ductus arteriosus. 144
- 3.5 Effects of mPGES activity inhibitor MK-886 on PAF-induced tension according to time in fetal piglets. Action of PAF and its receptor antagonists (BN52021, THG315) on newborn ductus arteriosus tension. 145
- 4.1 Proportion relative des récepteurs EP_{1,2,3,4} dans le CA fœtal de porcelet (blanc) et d'agneau (noir). 148
- 4.2 Effet de l'antagoniste spécifique du récepteur EP₄ par rapport à celui de l'indométhacine sur le diamètre du CA chez le fœtus d'agneau. 151

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
AC/GC	Adénylyl/Guanylyl cyclase
ACh	Acétylcholine
ACTH	Adrénocorticotropine
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
ANF	Facteur natriurétique auriculaire
ANGII	Angiotensine II
AP-1	activateur de protéines-1 (protéines Jun + Fos)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BK	Bradykinine
Bmax	Liaison maximale spécifique ou densité totale des récepteurs
CA	Canal artériel
$[Ca^{2+}]_i$	Concentration de calcium intracellulaire
Ca _L	Canaux calciques de type L
CaLB	Domaine N-Terminal calcium-dépendent de liaison des lipides
C/EBP δ	Facteur de transcription CCAAAT/enhancer-binding protein: Facteur de croissance insuline-like 1
c-fos/c-myc	Facteurs de transcription issus de protooncogènes
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
CO \cdot	Monoxyde de carbone
COX (-1, -2)	Cyclooxygénase
CRE	cAMP-response element
CRF	Facteur de la libération de la corticotropine
EETs	Acides eicosatétraénoïques

EP ₁₋₄	Récepteurs de prostanoïdes de type E
Erg-1	Facteur de transcription de la famille "early growth response"
ERK	Extracellular-regulated Kinase
ET-1	Endothéline
F	Fœtus
FLAP	5-lipoxygenase-activating protein
Flk-1	Récepteur spécifique du VEGF
GI	Gastro-intestinal
Gi α /o	Protéine G de type α ou "o" (other)
GSH	Gluthation
GST	Gluthation S-transférases
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Histamine
HEK293	Human embryonic kidney cells
HETEs	Acides hydroxyeicosatétraénoïques
HGF	Facteur de croissance hépatique
HO-1/-2	Hème oxygénase inductible/constitutive
Il-1/3/6	Interleukine-1/-3/-6
Inr/"initiateur"	Motif d'ADN, riche en AT. agit en élément «cis» pour l'initiation de la transcription
i.p.	Voie intrapéritonéale
IP ₃	Inositol 1, 4, 5-triphosphate
JNK	Kinase C-Jun-N-terminale
kDa	kilodaltons
K _{dr}	Canaux potassiques rectificateurs lents
K _i	Constante d'inhibition
KO	Knock-out
K _v	Canaux potassiques voltage-dépendants
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LKs	Leucotriènes
LPS	Lipopolysaccharides
K _{ATP}	Canaux potassiques sensibles à l'ATP

Kd	Constante de dissociation
<i>LIS1</i>	Gène de la lisencéphalie de Miller-Dieker
MGST1-L1	Microsomal glutathione <i>S</i> -transferase 1-like 1
MAPEG	Membrane associated proteins in eicosanoids and glutathione metabolism
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBP	Protéines basiques principales
ML	Muscle lisse
NF-AT	Nuclear factor of activated T cells, facteur de transcription
NF- κ B	Facteur de transcription
NN	Nouveau-né
NO \cdot	Oxyde nitrique
NOS e/i	Synthase d'oxyde nitrique endothéliale/inductible
PAF	Facteur d'aggrégation plaquettaire
PAF-AH	PAF acétylhydrolase
PDA	Patent ductus arteriosus, persistance de l'ouverture du CA
PG	Prostaglandine
PGDS	Prostaglandine D ₂ synthase
PGES m/c	Prostaglandine E ₂ synthase membranaire/cytosolique
PGFS	Prostaglandine F _{2α} synthase
PGIS	Prostaglandine I ₂ synthase
PGT	Transporteur des prostaglandines
PI	Phosphoinositide
PKA/C	Kinase A/C
PLA2/C	Phospholipase A2/C
PLA2 $c/s/i$	Phospholipase A2 cytosoloque/secrétée/inductible
PM	Poids moléculaire
PMN	Granulocytes polymorphonucléaires
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PO ₂	Tension d'oxygène
PTX	Toxine pertussique
Ras	Protéine G monomérique

RCCT	Rabbit cortical collecting tubule primary cultures
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
Réd-ox	Oxydo-réduction
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central
SP-1	Specificity protein-1, facteur de transcription
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale
TBDZ	Anti-psychotiques de type triazolobenzodiazépines
TXA ₂	Thromboxane
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VSP	Vasopressine

LISTE PARTIELLE DE COMPOSÉS PHARMACOLOGIQUES ET LEUR ACTION

AH6809	Antagoniste du récepteur EP ₁
Butaprost	Agoniste du récepteur EP ₂
M&B28767	Agoniste du récepteur EP ₃
Sulprostone	Agoniste du récepteur EP ₃
AH23848B	Antagoniste du récepteur EP ₄
16,16-diméthyl PGE ₂	Analogue stable de PGE ₂
PTX (toxine pertussique)	Inhibiteur des protéines G _{i/o}
BN52021 (Gingkolide B)	Antagoniste naturel du récepteur de PAF
THG113	Antagoniste des récepteurs FP
THG213	Antagoniste des récepteurs EP ₄
THG315	Antagoniste du récepteur de PAF résistant aux protéases
MK-886	Inhibiteur de l'activité de la 5-lipoxygénase et de la PGESm
Glibenclamide	Bloqueur des canaux K _{ATP}
Cromakaline	Activateur des canaux K _{ATP}
Sin-1	3-morpholinosydnonimine, donneur de NO [•]
SNP	Nitroprusside de sodium, donneur de NO [•]
L-NAME	L-N ^G -1(1-aminométhyl)lysine, inhibiteur de NO synthase
ZnPP	Protoporphyrine de zinc IX, inhibiteur de l'hème oxygénase
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique, chélateur de cations bivalents

REMERCIEMENTS

Je suis sincèrement reconnaissante à mes deux superviseurs pour m'avoir accordé l'opportunité de travailler avec eux sur un sujet fascinant et dans un environnement cordial et propice à l'amélioration constante de soi mais aussi et surtout pour leur supervision éclairée, positive et stimulante. Mes respects et ma gratitude vont également au Dr Robert Élie ainsi qu'au Dr Roland R. Tremblay qui n'ont jamais cessé de suivre mes progrès ni de me prodiguer des conseils judicieux jusqu'à la toute fin.

J'aimerais également souligner toute mon appréciation pour le travail de tous mes collaborateurs des équipes d'échocardiographie fœtale et de pharmacologie néonatale et saluer particulièrement l'esprit de collaboration, d'entraide, d'écoute et de respect qu'ils cultivent avec un petit clin d'œil particulier à Francine, Marie-Josée, Christiane, et Daniella.

Je souhaiterais également saluer le support constant de la responsable des affaires académiques du département de physiologie, Mme Joanne Payette, ainsi que celui tout aussi précieux de tout le personnel administratif et de l'entretien animalier du Centre de recherche de l'Hôpital Ste-Justine.

Enfin et non les moindres, mes remerciements et mon affection se tournent vers mes parents, Hakim, Dalal, cousine Myriam et sa famille ainsi que vers Grácia et Badia qui ont su m'insuffler le courage et la force nécessaires.

Je souhaiterais exprimer également ma gratitude à la Fondation de l'Hôpital Ste-Justine (1998-2001) et au Conseil de Recherche Médicale (2001-2002) qui m'ont supportée financièrement ainsi qu'au département de physiologie de l'Université de Montréal durant toute cette longue période qu'est le doctorat.

DÉDICACE

«La science sans conscience n'est que ruine de l'âme».

Cette thèse est dédiée à la mémoire de mes grand-parents
Mbarka, Sâadia, Fatima, Lisette, Omar et Hassan
ainsi qu'à mes parents sans lesquels rien n'aurait pu être.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Introduction

Les prostaglandines, surtout la prostaglandine E2 (PGE₂), joue un rôle primordial dans le maintien de l'ouverture du CA fœtal. Par conséquent, tout élément relié à la synthèse de la PGE₂ ou à sa voie de signalisation constituerait une nouvelle cible pour contrôler le diamètre du CA autre que celle des thérapies conventionnelles qui ont des effets secondaires majeurs.

Nous commencerons le présent chapitre de revue de littérature par une présentation de la super-famille des prostanoides (synthèse, transport, métabolisme), de leurs effets physio-pathologiques qu'ils accomplissent via des récepteurs qui leur sont spécifiques. Nos études ont révélé l'importance du facteur d'activation plaquettaire PAF dans les bouleversements ontogéniques qui ont lieu dans le CA durant la période périnatale. Par conséquent, nous allons présenter dans une seconde partie une revue des voies de PAF (synthèse, stockage, sa libération, métabolisme), de ses effets physio-pathologiques notamment sur le système cardiovasculaire et qu'il déclenche après la liaison et l'activation de son récepteur spécifique ainsi que l'utilité thérapeutique des antagonistes de ce récepteur. Le canal artériel sera présenté dans une troisième partie de cette revue de littérature et dans laquelle nous insisterons sur l'importance de ce vaisseau, de par sa situation anatomique unique, pour la transition de la circulation cardiaque fœtale à néonatale. La lumière sera également faite sur le rôle des prostaglandines locales et circulantes et celui des cyclooxygénases responsables de leur synthèse dans le maintien de l'ouverture du CA *in utero*, ainsi que sur le rôle d'autres facteurs tels l'oxyde nitrique et le monoxyde de carbone. La fermeture du CA à la naissance est cruciale à l'adaptation à la vie postnatale et tous les facteurs pouvant mener à ce phénomène seront également discutés. Finalement, le potentiel thérapeutique de plusieurs ligands pouvant être utiles lors de maladies qui nécessitent le maintien de

l'ouverture ou de la fermeture du CA après la naissance sera discuté. Le but ultime des travaux présentés dans cette thèse est la découverte de nouvelles cibles moléculaires dans la cascade de synthèse de la PGE₂ et/ou dans sa voie de signalisation et qui pourrait mener au développement de nouvelles molécules différentes de celles actuellement disponibles pour le contrôle du tonus du canal artériel.

1.2 Les prostanoides

Les prostaglandines (PGs) et le facteur d'activation plaquettaire PAF constituent les prostanoides qui sont des produits de l'action de la prostaglandine H synthase (cyclooxygénase, COX) sur l'acide arachidonique. Les prostanoides ont diverses actions physiologiques et pathologiques et régulent les processus cellulaires dans presque tous les tissus. Les prostanoides agissent de façon autocrine et/ou paracrine et provoquent des réactions puissantes dans les systèmes cardiovasculaire, gastrointestinal, respiratoire, endocrine et reproducteur. De plus, ces agents sont des médiateurs cruciaux de l'inflammation, de la fièvre et de la douleur (Campbell & Halushka, 1996).

Il existe 5 prostanoides qui jouent un rôle physiologique important: PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ et TXA₂. Les prostanoides sont distribuées de façon ubiquitaire dans l'organisme et peuvent être synthétisés dans presque tous les tissus et types cellulaires. Le même prostanoides peut provoquer différentes réponses dans différents tissus via des récepteurs couplés aux protéines G nommés DP pour la PGD₂, EP pour PGE₂, FP pour PGF_{2α}, IP pour PGI₂ et TP pour TXA₂ (Coleman, 1994). La prostaglandine E2 (PGE₂) est un des prostanoides les plus abondants au cerveau (Leffler & Busija, 1985) et joue un rôle important dans plusieurs fonctions cérébrales surtout chez le nouveau-né (Leffler & Busija,

1987; Chemtob, 1996). PGE₂ joue également un rôle dans la mitogénèse (Baylink, 1996; Glantschnig, 1996), promouvoit la croissance, les métastases tumorales (Paoletti, 1989; Fulton, 1991; Zhang & Fulton, 1991) et module la transcription de plusieurs gènes (Danesch, 1994; Gashler et Sukhatme, 1995; Umayahara, 1997; Dibbs, 1997).

1.3 Historique

L'activité associée aux PGs a été rapportée en premier lieu en 1930 par Kurzrok et Lieb qui avaient observé que le liquide séminal humain causait la contraction de l'utérus. Cette observation a été confirmée au début des années 1930 par Golblatt et Euler, ce dernier a identifié l'élément actif comme étant un acide liposoluble qu'il nomma "prostaglandine". Cependant, il a fallu attendre 30 ans avant que Bergström et Samuelson (1968) aient réussi à purifier les premières PGs désignées PGE₁ et PGF_{1α} à cause de leur dissociation respective en éther et en phosphate. Durant les décades qui ont suivi, il est apparu que les PGs avaient diverses activités biologiques et que la famille incluait un plus grand nombre de molécules qu'il était envisagé au départ et ces dernières sont nommées alphabétiquement PGA₂ à PGH₂. Toutes ces molécules d'origine naturelle ont un squelette d'acides gras insaturés à 20 atomes de carbones avec un cycle pentane.

Les PGs ne constituent qu'une petite partie des métabolites de l'acide arachidonique (AA). D'autres produits tels le thromboxane (TXA₂), la prostacycline (PGI₂), les leukotriènes (LKs) et le facteur d'activation plaquettaire (PAF). L'ensemble des PGs, des LKs et des produits qui y sont associés sont appelés eicosanoïdes car ils sont dérivés d'acides gras essentiels à 20 atomes de carbone. L'AA peut également subir une oxydation non enzymatique sous l'action des radicaux libres pour produire des isoprostanes et des LKs (Morrow, 1994; Harrison & Murphy, 1995).

1.4 Synthèse, transport et métabolisme des prostanoides

1.4.1 Synthèse des prostanoides

Les prostanoides peuvent être synthétisés à partir de trois acides gras précurseurs. La première série des PGs est dérivée de l'acide dihomogamma-linolénique (acide 8, 11, 14-eicosatriénoïque; les chiffres réfèrent aux carbones insaturés), la deuxième série à partir de l'AA (acide 5, 8, 11, 14-eicosatétraénoïque) et la troisième de l'acide timodonique (acide 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentanoïque) (Campbell & Halushka, 1996). L'AA est le précurseur le plus abondant chez la majorité des mammifères et la deuxième série des PGs est par conséquent la plus fréquemment retrouvée dans la nature. Le TXA₂ est un produit de l'AA mais ce n'est pas une PG puisqu'il contient dans sa structure un éther cyclique à 5 carbones.

Les acides gras dérivés de l'AA sont des endopéroxydes cycliques (PGG₂ et PGH₂) et incluent les PGs primaires (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}), PGI₂ et le TXA₂, les LKs et les produits de l'époxygénase (acides eicosatétraénoïques EETEs et acides hydroxyeicosatétraénoïques HETEs) (Fig 1.1). Tous ces produits sauf les LKs, les EETs et les HETEs, sont des produits issus de l'activité de la cyclooxygénase. Les LKs sont des composés synthétisés par la 5-lipoxygénase et qui sont dotés d'activité biologique très puissante puisqu'ils causent l'hypotension, la vasoconstriction surtout au niveau des bronches, la chimiotaxie et sont impliqués dans l'inflammation (Campbell & Halushka, 1996). Les EETs et les HETEs sont issus du métabolisme de l'AA par les époxygénases cytochromes P-450 (Fitzpatrick & Murphy, 1989) et produisent également des effets biologiques importants.

La synthèse des prostanoides dans les cellules des mammifères est régulée au niveau de 3 étapes: la libération de l'AA à partir des membranes phospholipidiques par la phospholipase A2, la conversion de l'AA en PGH₂ par les deux isoformes de la cyclooxygénases COX-1 et COX-2 et la conversion finale du PGH₂ en prostanoides actifs par l'action de synthases spécifiques terminales.

1.4.1.1 Phospholipases A2 et libération d'acide arachidonique

La synthèse des PGs est déclenchée en réponse à un stimulus qui mène à l'activation de la famille des phospholipases A2 (PLA₂). Les PLA₂ catalysent l'hydrolyse des phospholipides à la position *sn*-2, ce qui libère les acides gras libres incluant l'AA, le précurseur du PAF et les lysophospholipides (Campbell & Halushka, 1996). La synthèse des prostanoides est augmentée par les hormones, les autacoïdes et autres substances qui interagissent avec les récepteurs couplés aux protéines G liés à la membrane plasmatique.

L'activation de ces récepteurs stimule directement des PLC et/ou PLA₂ ou mène à une augmentation des concentrations de Ca²⁺ cytosolique [Ca²⁺]_i qui active ces enzymes (Clark, 1995; Smith, 1997). Les stimuli physiques peuvent causer une entrée de Ca²⁺ extracellulaire en perturbant la membrane cellulaire et activer les PLA₂, ce qui déclenche la libération d'AA. La libération de cet arachidonate constitue un élément majeur de la régulation de la synthèse des PGs dont une étape limitante est l'activation des PLA₂.

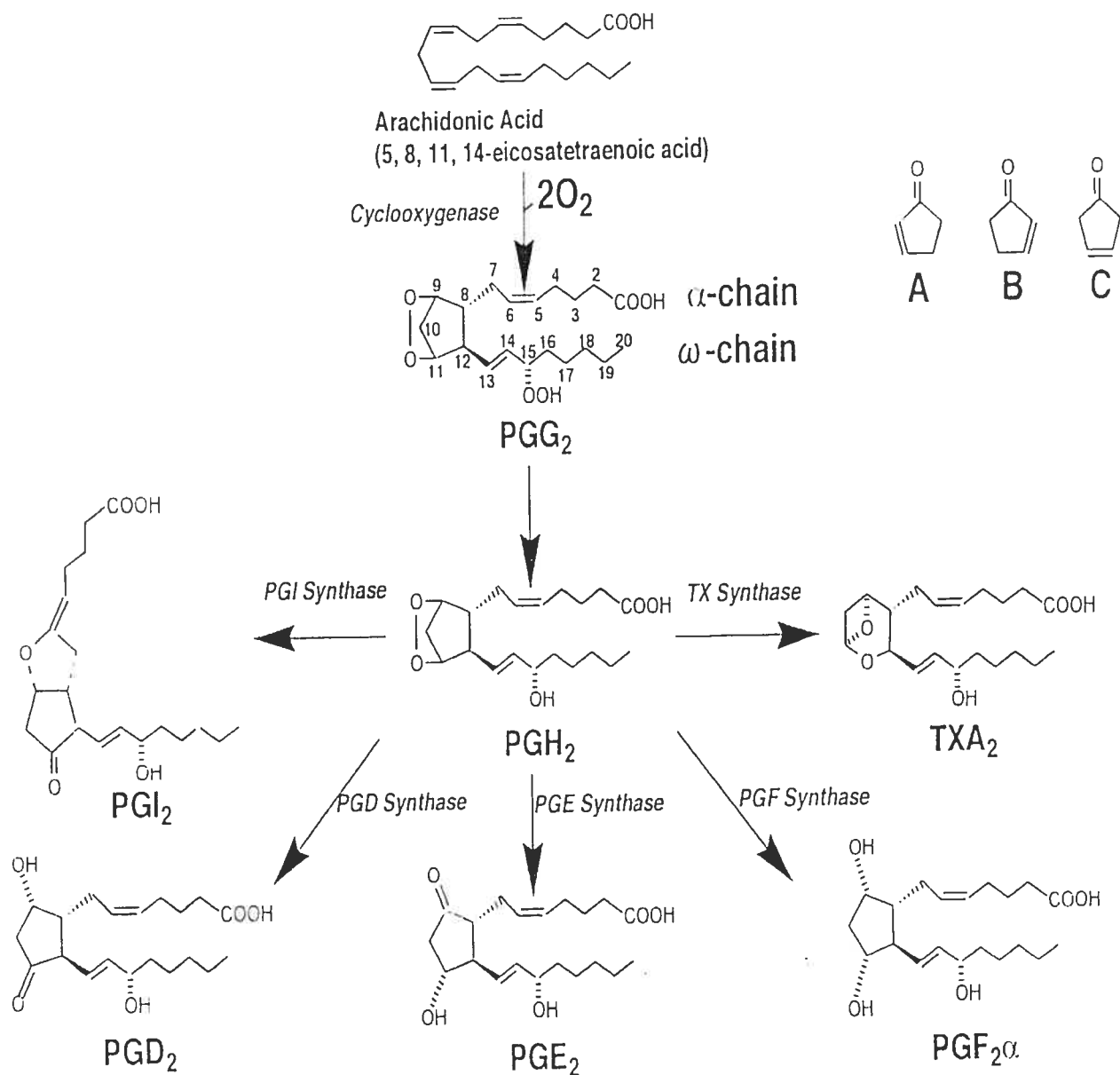


Figure 1.1. Cascade de synthèse des prostanoïdes à partir de l'acide arachidonique. La structure des cycles des prostaglandines de type A, B et C est montrée séparément, d'après Narumiya et al., 1999.

Les PLA₂ sont subdivisées en plusieurs groupes basés sur leur structure et leur activité enzymatique (Roberts, 1996). Chez les mammifères, les PLA₂ ont été distinguées en isoformes dont l'activité est calcium-dépendante ou calcium-indépendante. Les PLA₂ sécrétées (PLA₂s) constituent un groupe d'enzymes de faible masse moléculaire (≈ 14 kDa). Ces enzymes sont libérées de granules sécrétoires et libèrent l'arachidonate en agissant sur les phospholipides de la membrane plasmique d'une grande variété de types cellulaires (Tischfield 1997; Murakami 1997). La production de PLA₂s est induite par les cytokines proinflammatoires qui la régulent au niveau transcriptionnel (Oka & Arita, 1991; Murakami, 1993; Pfeilschifter, 1993). Les PLA₂s requièrent des concentrations millimolaires de Ca²⁺ afin d'exercer leur action et n'ont pas de préférence pour la position *sn*-2 sur la molécule d'AA. Des études sur des souris déficientes en PLA₂s ont révélé que ce groupe d'enzymes joue un rôle crucial dans le développement de l'animal et la fertilisation mais n'affecte pas la viabilité des souris (Kennedy, 1995).

Il a été démontré que les enzymes PLA₂s de type IIA et de type V sont impliquées dans la libération d'AA et la production de PGs (Balboa, 1996; Reddy, 1997a, b). Les types IIA jouent un rôle dans la réponse inflammatoire et sont exprimés dans la majorité des cellules et tissus. Les type V sont principalement exprimées dans le coeur et le placenta. Les PLA₂s, contrairement aux PLA₂ cytosoliques (PLA₂c), peuvent médier la synthèse transcellulaire de prostanoïdes puisqu'elles sont excrétées dans le milieu extracellulaire et peuvent se lier à la surface des cellules avoisinantes, ce qui implique qu'elles jouent un rôle d'amplification paracrine de la synthèse des prostanoïdes d'une cellule à une autre (Murakami, 1999).

Les PLA₂ de type IV cytosoliques (85 kDa) sont distribués de façon ubiquitaire et ne requièrent que des concentrations nanomolaires de Ca²⁺ pour leur activité. Les PLA_{2c} peuvent être stimulées par un large spectre de stimuli extracellulaires tels les facteurs de croissance, les mitogènes, les peptides vasoactifs, les cytokines et les interférons (Kramer & Sharp, 1997). Cependant, la stimulation des cellules de façon récepteur-indépendante par un stress comme l'oxydation, l'hyperglycémie, la lumière UV et les forces de cisaillements peut également activer les PLA_{2c}, ce qui démontre une communication entre les deux voies de signalisation des deux classes de PLA₂ (Huwiler, 1997).

Contrairement aux PLA_{2s}, le Ca²⁺ est nécessaire pour la liaison des PLA_{2c} aux membranes ou aux vésicules phospholipidiques. Les PLA_{2c} sont les seules PLA₂ bien caractérisées qui hydrolysent l'AA préférentiellement en position *sn*-2 et jouent un rôle important dans la libération d'AA (Fig. 1.2) et dans la génération des prostanoïdes (Murakami, 1997). Le domaine N-terminal calcium-dépendant de liaison des lipides (CaLB) est responsable de la translocation des PLA_{2c} du cytosol vers les membranes périmoléculaire et réticulaire endoplasmique (Schievella, 1995; Peters-Golden, 1996). L'augmentation de calcium intracellulaire est le facteur majeur qui cause l'activation des PLA_{2c} (Kraner & Sharp, 1997). La phosphorylation joue également un rôle important dans la régulation de l'activité de l'enzyme. Cette dernière comporte plusieurs sites de phosphorylation incluant celui de la MAP kinase (Ser 505) qui est crucial pour l'activité. Il a été démontré qu'une protéine G sensible à la PTX (G_{ia}) pourrait être impliquée dans l'activation de la production d'AA par les PLA_{2c} (Burke, 1997). Les souris déficientes en PLA_{2c} ont démontré une diminution des symptômes allergiques, de la fertilité, une atteinte cérébrale post-ischémique et une absence de production de PGE₂ après stimulation de macrophages avec le LPS ou un ionophore de calcium (Bonventre, 1997; Uozumi, 1997).

Un autre groupe de PLA₂ cytosoliques est indépendant du calcium pour son activité, les PLA₂ inductibles ou PLA_{2i} dites de type VI (Balsinde & Dennis, 1997; Murakami, 1997). Les PLA_{2i} sont impliquées dans le remodelage en acides gras des phospholipides membranaires et qui agissent comme une sorte d'enzymes "house-keeping" en condition de repos. Les PLA_{2i} sont des protéines de 85 kDa qui ne démontrent pas de sélectivité envers les acides gras mais qui peuvent médier la libération d'AA (Wolf & Gross, 1996; Wolf, 1997). Les PLA_{2i} de type VI peuvent donc jouer un rôle dans la synthèse des prostanoides en régulant les réactions d'estérification d'AA.

1.4.1.2 Cyclooxygénases et métabolisme de l'acide arachidonique

L'AA libéré des membranes par les PLA₂ agit comme substrat pour la cyclooxygénase (COX) qui catalyse deux réactions: a) la conversion de l'AA en PGG₂ qui requiert de l'O₂ via une activité cyclooxygénase, et b) la réduction du groupement 15-hydropéroxyde de PGG₂ en PGH₂ via une activité peroxydase.

Les cyclooxygénases sont des hémoprotéines liées à la membrane et deux isoformes sont identifiés: la forme constitutive (COX-1) et la forme inductible (COX-2) (Smith 1997; Vane 1998). Les deux isoformes jouent un rôle dans la régulation du métabolisme de l'AA, leurs séquences d'acides aminés sont homologues à ≈61% et leur activité catalytique est similaire. Cependant, ils sont issus de deux gènes différents susceptibles à être régulés différemment et exercent des fonctions biologiques distinctes chez l'humain. COX-1 est exprimée de façon constitutive, ubiquitaire et elle est responsable d'une faible activité de synthèse de PGs requise pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. COX-2 est une enzyme inductible qui est synthétisée *de novo* en réponse à une grande variété de stimuli intra- et extracellulaires (cytokines, facteurs de croissance et promoteurs tumoraux) durant

la réaction inflammatoire ou autre type de stress. Elle contribue à la génération de prostanoïdes aux sites d'inflammation et à la prolifération et à la différenciation cellulaires (Smith 1997; Vane 1998).

Le cerveau (neurones) est un des rares organes où COX-2 est exprimée de façon constitutive (Kaufmann, 1996). COX-2 représente l'isoforme principal dans le cerveau des procelets NN (Peri, 1995). Les agents inflammatoires non stéroïdiens (AINS) inhibent les deux isoformes COX-1 et COX-2 et bloquent donc la conversion de l'AA en PGG₂. Les deux isoformes sont localisées au niveau la surface luminale du RE et des membranes nucléaires interne et externe (Spencer, 1998). Il a été démontré que COX-2 était transloquée au noyau en réponse aux facteurs de croissance (Coffey, 1997).

Les PGs produits par COX-1 ont des effets cytoprotecteurs dans l'estomac (tractus GI, rénal) qui sont inhibés par l'administration des AINS, ce qui mène à des dommages de la muqueuse gastrique et à des ulcères (Trevethick, 1995; Scheiman J. 1996). COX-1 est le seul isoforme détecté dans les plaquettes (Dubois, 1998). Les prostanoïdes synthétisés par COX-1 sont apparemment essentiels pour la survie des foetus puisque la majorité de la descendance des souris «Knock-Out» pour COX-1 ne survivent pas (Morham, 1995). Les souris KO pour COX-2 démontrent des anomalies rénales, de la fibrose cardiaque et des anomalies du corps lutéal, ce qui démontre l'importance de cette isoenzyme pour le développement de plusieurs organes (Morham. 1995).

Il a été démontré que l'expression de COX-2 protège contre l'apoptose (Von Knethen & Brune, 1997). Les PGs issus de la voie de signalisation avec COX-2 protègent les cardiomyocytes du stress oxydatif (Adderley & FitzGerald, 1999). L'induction de

l'expression de COX-2 et la formation des PGs ont été associés à l'activation des voies de la kinase de la protéine activée par les mitogènes (MAPK) et de la kinase c-Jun-N-terminale (JNK) (Guan, 1998). Le stress oxydatif peut également induire COX-2 puisque cette dernière peut être activée par des peroxydes intracellulaires (Shitashige, 1998) tandis que des niveaux plus élevés de peroxydes sont requis pour activer la COX-1 (Kulmacz & Wang, 1995). Une augmentation de l'expression de COX-2 a été associée à la carcinogénèse (Kutchera, 1996; Crofford, 1997; Tucker, 1999) et des études ont démontré que les AINS ont des effets chimioprotecteurs sur les tumeurs malignes gastriques chez l'humain (DuBois, 1996; Williams, 1997).

Des études ont démontré que la COX utilise différents stocks d'AA pour la synthèse des prostanoides; COX-2 utilise de faibles concentrations d'AA tandis que COX-1 utilise préférentiellement des niveaux élevés d'AA (Reddy & Herschman, 1996; Shitashige, 1998). Deux voies de synthèse des prostanoides cinétiquement différentes, les voies de génération immédiate et retardée ont été mises en évidence et impliquent le recrutement de plusieurs ensembles d'enzymes biosynthétiques différents par leur expression et leur activation, ces dernières étant très étroitement régulées par des signaux membranaires distincts (Murakami, 1997; Naraba, 1998). La phase immédiate de la synthèse des prostanoides a lieu quelques minutes après la stimulation et elle est déclenchée par les agents qui mobilisent le Ca^{2+} intracellulaire. Cette phase immédiate est caractérisée par un pic de libération d'AA qui est immédiatement métabolisé par COX-1. Durant la phase retardée, la synthèse des prostanoides COX-2-dépendante a lieu en parallèle avec l'induction de l'expression de l'isoenzyme, plusieurs heures après la stimulation avec des stimuli de croissance ou d'inflammation (Reddy & Herschmann, 1997). Par conséquent,

COX-2 joue un rôle dans la génération prolongée des prostanoïdes, ce qui modifie les événements nucléaires associés à la différenciation et à la réplication cellulaires.

La polémique qui concerne le recrutement de diverses PLA₂ et leur couplage différentiel avec les COX en fonction des phases immédiate ou tardive de la synthèse des prostanoïdes subsiste encore. Il a été récemment démontré que PLA_{2c}, PLA_{2s}-IIA et PLA_{2s}-V agissent comme des "signaux" qui promouvoient la libération d'AA stimulus-dépendante durant les deux phases de la réponse (Murakami, 1999). Les PLA_{2c} et les PLA_{2s} peuvent créer un lien fonctionnel avec COX-1 et COX-2 pendant la phase immédiate et avec COX-2 pendant la phase tardive de la biosynthèse des prostanoïdes. Par contre, les PLA_{2i}-IV ne se couplent pas avec COX-2 durant la phase tardive mais sont liées à COX-1 et à la génération immédiate de PGE₂ induite par les ionophores.

1.4.1.3 Synthèses des prostanoïdes

Peu après sa formation à partir d'AA, le PGH₂ peut être converti en PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂ et TXA₂ par des enzymes spécifiques dites synthases (tableau I) dont l'activité varie en fonction des tissus et qui sont toutes clônées et caractérisées. La présence de ces enzymes, et non leur régulation, semble déterminer quel produit des endopéroxydes sera prédominant dans un tissu spécifique (Urade, 1995; Smith, 1997).

La PGD₂ synthase (PGDS) a été détectée dans les fractions membranaire et soluble (Kelner & Ulgik, 1994). Cette enzyme a été localisée dans les neurones du cerveau de rat NN, dans les cellules neuronales des méninges et du plexus choroïde et dans le liquide cébrospinal (Urade, 1993). Des souris transgéniques déficientes en PGDS ne ressentent

pas de douleur tactile «allodynia» (Egichi, 1999). La $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthase (PGFS) est largement distribuée dans les tissus et possède au moins 2 isoformes: le type pulmonaire (Watanabe, 1986) et le type hépatique (Suzuki, 1999). Les TXA_2 et PGI_2 synthases sont des cytochromes P-450 et sont toutes deux localisées à la surface du RE et de l'enveloppe nucléaire (Smith, 1997). Il a été démontré que la surexpression de la PGIS protégeait les souris transgéniques contre le développement de l'hypoxie pulmonaire (Geraci, 1999).

La PGE_2 est une prostaglandine issue du métabolisme de la PGH_2 par l'enzyme PGE synthase ou PGES mais peu de choses sont connues sur cette enzyme qui était récemment connue sous l'appellation de MGST1-L1 sauf qu'elle appartient à la nouvelle superfamille des MAPEG (Jakobsson, 1999). Cette superfamille regroupe 4 familles qui sont toutes des glutathion-S-transférases (GST) ainsi que des peroxydases GSH-dépendantes. Les protéines de la superfamille des MAPEG partagent des similarités de séquences clairement détectables. Toutes les MAPEG (sauf FLAP) ont une longueur similaire en acides aminés (137-161) et 29-44% d'identité entre les paires, surtout dans la région centrale qui coïncide avec le site de liaison de l'acide arachidonique (acides aminés 48-61); 4 domaines transmembranaires mis en évidence par les graphiques d'hydropathie; certains résidus qui jouent un rôle structural très important sont très conservés chez toutes les protéines MAPEG (Asn^{78} , Tyr^{122} , Phe^{122} , Tyr^{97} , Arg^{115} , Tyr^{118} , His^{118}) (Jakobsson, 1999). Deux isoformes de la PGE_2 synthase ont été identifiées. La forme constitutive, PGESc, est une protéine cytosolique de 16 kDa qui est dépendante du glutathion pour son activité enzymatique (Ogorichi, 1987; Meyer, 1996). La forme inductible, PGESm, est une protéine de 16 kDa qui est détectée dans les microsomes de plusieurs tissus et son activité est dépendante du glutathion (Jakobsson, 1999). L'expression de cet isoforme est fortement induite par des agents pro-inflammatoires (Jakobsson, 1999; Kudo, 2000).

1.4.1.4 Isoprostanes

Les isoprostanes sont principalement formés par peroxydation de l'AA causée par les radicaux libres (Fig. 1.2). Il existe des stéréoisomères dans lesquels les chaînes latérales sont orientées en cis par rapport au cycle pentane, alors que les PGs dérivés des cyclooxygénases sont uniquement orientés en position "trans" (Morrow, 1990). L'isoprostane F₂ est impliqué comme marqueur de l'insulte oxydative *in vivo* et le 8-iso-PGF_{2α} a un effet vasoconstricteur (Morrow, 1994; Lahaie, 1998; Hou, 2000; Hou, 2001).

1.4.2 **Stockage et libération des prostanoides**

Contrairement aux hormones et aux neurotransmetteurs, les prostanoides ne sont pas stockés. L'action d'un prostanoides spécifique est obtenue par synthèse locale en réponse à un stimulus et à la liaison du récepteur, suivi par une dégradation rapide. Ces substances agissent près de leur site de synthèse puisqu'ils ont une demie-vie très courte (<3 min) (Campbell & Halushka, 1996).

1.4.3 **Transport des prostanoides**

La plupart des agents pour lesquels des récepteurs nucléaires ont été caractérisés comme l'acide rétinoïque, la vitamine D et les hormones stéroïdes sont des substances très liposolubles et peuvent entrer dans la cellule facilement. Par contre, les prostanoides sont des anions au pH physiologique et traversent peu les membranes biologiques. Même si cette propriété est compatible avec leur interaction avec les récepteurs à la surface cellulaire, la possibilité d'action intracellulaire requiert un mécanisme de transport des prostanoides à travers les membranes cellulaires. En effet, le transporteur de PGs (PGT) a été récemment identifié et cloné chez le rat (Kanai, 1995) et chez l'humain (Lu, 1996).

Tableau I: Caractéristiques majeures des synthases spécifiques impliquées dans la conversion de PGH₂ en prostanoïdes.

Enzyme	Caractéristiques
PGD ₂ synthase	Isolée à partir du cerveau. PM = 21 kDa. Activité GSH-indépendante
PGE ₂ synthase	Isoforme constitutif PGESc (26 kDa), GSH-dépendant, isolé à partir du cerveau. Isoforme inductible PGESm (16 kDa), GSH-dépendant, isolé à partir des vésicules séminales. Deux isoformes isolés à partir des poumons (37 kDa) et du foie (36,742 kDa).
PGF synthase	Isolée à partir de l'endothélium et du muscle lisse (PM = 52 kDa)
PGI ₂ synthase	Isolée à partir des poumons et des plaquettes (PM = 55 kDa). Cytochrome P-450.
TXA ₂ synthase	

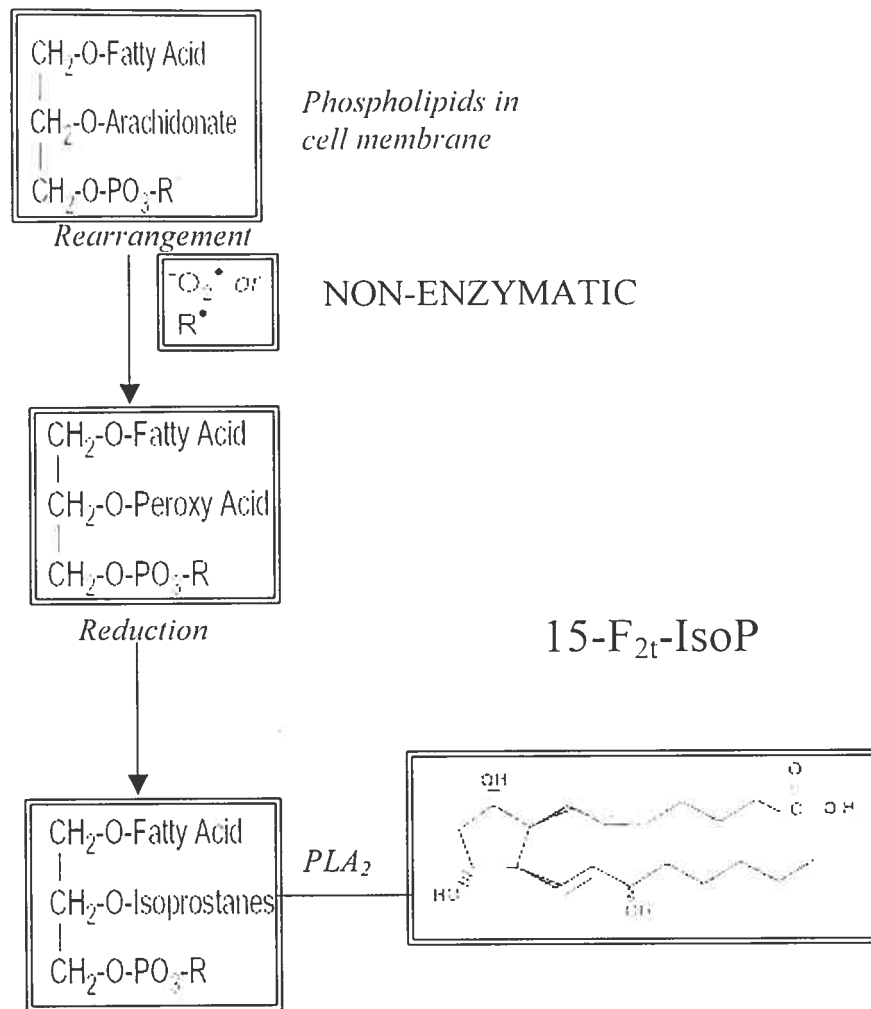


Figure 1.2. Synthèse des isoprostanes par voie non enzymatique.

Le PGT joue un rôle primordial dans le transport des prostanoides et dans leur clairance métabolique. L'ARNm du PGT est largement exprimé dans les tissus surtout les poumons, le foie, le cerveau et les reins. Le PGT a une grande affinité pour PGE_{1-2} , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 et TXA_2 qu'il transporte de façon préférentielle (K_i du PGT = 49-150 nM pour PGE_2 et $\text{PGF}_{2\alpha}$ et PGE_2 et $\text{PGF}_{2\alpha}$ possèdent une affinité pour le PGT plus élevée que le 8-iso- PGE_2 et le 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$). Le PGI_2 est faiblement transporté (Lu, 1996). Le transport des prostanoides par le PGT n'est pas un processus actif. Trois rôles ont été proposés pour le

PGT: a) il médie la sortie des prostanoïdes nouvellement synthétisés des cellules, b) il médie le transport transépithélial des prostanoïdes comme cela est le cas dans le foie, les reins et le plexus choroïde. c) il joue un rôle dans la capture des prostanoïdes nouvellement libérés et agit donc comme un transporteur à travers la membrane plasmique avant l'oxydation intracellulaire (Kanai, 1995; Lu, 1996; Schuster, 1998). Le PGT facilite le cas échéant la clairance et la dégradation des prostanoïdes. De plus, le PGT permet aux prostanoïdes intracellulaires et en circulation d'agir sur des sites intracellulaires comme le noyau.

1.4.4 Métabolisme des prostanoïdes

La clairance des prostanoïdes a lieu en deux étapes: a) capture sélective du prostanoïde à travers la membrane plasmique et b) oxydation non sélective à l'intérieur de la cellule (Schuster, 1998). Les poumons métabolisent rapidement en un seul passage PGE_{1-2} , PGD_2 et $PGF_{2\alpha}$. PGI_2 est hydrolysée spontanément en 6-céto- $PGF_{1\alpha}$ dans le sang. Le foie et le cortex rénal capturent et métabolisent également PGE_{1-2} et $PGF_{2\alpha}$. La capture hépatique a lieu exclusivement dans les hépatocytes et la dégradation via les cytochromes P-450 a lieu dans les péroxysomes. Dans les reins, les tubules proximaux captent PGE_2 et PGI_2 pour les sécréter dans la lumière.

La barrière hémato-encéphalique est imperméable aux PGs qui ne peuvent pas entrer dans le SNC à partir de la circulation. Par conséquent, le cerveau synthétise mais ne métabolise pas les PGs et les transporte (PGE et PGF) vers l'extérieur. Le transport de PGs non métabolisés dans le sang termine la signalisation via ces molécules. Le plexus choroïde serait important pour l'évacuation des PGs présents dans les ventricules et le métabolisme

final des PGs cérébraux aurait donc lieu de façon séquentielle par capture et oxydation dans d'autres tissus comme les poumons (Campbell & Halushka, 1996; Schuster, 1998).

Deux types de réactions sont impliqués dans le métabolisme des prostanoïdes dans l'organisme. L'étape initiale catalysée par une enzyme spécifique, la 15-hydroxy-déshydrogénase dont l'activité donne lieu à des produits inactifs dus à l'oxydation du groupement de l'hydroxyle en C15 en cétone correspondante. Ce dernier composé est ensuite réduit en dérivé 13,14-dihydroxylé par une Δ^{13} -réductase. La seconde étape implique la β - et ω -oxydation des chaînes latérales des PGs qui mène à la production d'un acide dicarboxylique librement excrété dans l'urine comme métabolite majeur (Campbell & Halushka, 1996).

PGI_2 et TXA_2 sont des composés instables qui subissent une dégradation enzymatique importante durant les trois minutes suivant leur synthèse. PGI_2 est transformée en 6-céto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ et le TXA_2 en TXB_2 , ce dernier peut être dégradé enzymatiquement en 2, 3-dinor- TXB_2 . Chez l'humain, 6-céto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ est métabolisé de la même façon que PGE_{1-2} et $\text{PGF}_{2\alpha}$.

1.5 Actions biologiques des prostanoïdes

Les prostanoïdes jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Contrairement aux hormones classiques en circulation comme l'insuline et la vasopressine, les prostanoïdes agissent localement sur les tissus dans lesquels ils sont synthétisés. La production locale peut être stimulée par plusieurs hormones telles l'angiotensine (ANGII), la vasopressine (VSP) et la bradykinine (BK) de telle sorte que les

prostanoïdes peuvent médier ou moduler certains effets de ces hormones (Dunn & Hood, 1977). La synthèse des PGs est limitée par la disponibilité du précurseur AA libre qui est libéré des membranes lipidiques par des phospholipases activées par des stimuli spécifiques et non spécifiques.

Il est à noter que la grande diversification des effets des prostanoïdes et des sites d'action d'un même prostanoïde rend difficile la définition des rôles de ces molécules avec certitude (Campbell & Halushka, 1996). Nous nous limiterons aux effets majeurs des prostanoïdes.

1.5.1 Réponses inflammatoires et immunitaires

Les prostanoïdes sont libérés suite à l'action de stimuli mécaniques, thermiques, chimiques, bactériologiques, et autres qui participent à la réponse inflammatoire (Davies, 1984). L'insulte tissulaire locale et les maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde sont associées à une augmentation des concentrations de PGs; les récepteurs qui médient la douleur sont sensibilisés à de plus faibles niveaux de PGs (Dray & Urban, 1996). Par conséquent, l'action des PGs au site de l'insulte ou de l'inflammation est hyperalgésique et une composante importante de l'action analgésique des AINS consiste dans leur action locale. Les principaux prostanoïdes proinflammatoires sont PGE₂ et PGI₂ qui promouvoient la formation de l'œdème et l'infiltration des leucocytes en augmentant le débit sanguin à la région enflammée et potentialisent l'hyperalgésie causée par la BK et autres autacoïdes.

Il a été démontré que les PGEs sont pléiotropes car possèdent des propriétés activatrice et inhibitrice sur la réponse immunitaire (Goodwin & Webb, 1980). PGE₂ et

PGI₂ affectent la prolifération et la différenciation cellulaires: PGE₂ inhibe l'activation des cellules T (Felli, 1996). Les PGEs inhibent la libération des hydrolases des neutrophiles et des enzymes lysosomiales ainsi que la participation des lymphocytes aux réactions d'allergie (Campbell & Halushka, 1996).

1.5.2 Système cardiovasculaire

Dans la plupart des espèces incluant l'humain, les PGEs sont de puissants vasodilatateurs de la microvasculature mais ceci n'est pas généralisé aux grandes veines qui ne sont pas affectées par les PGEs. La pression sanguine systémique est généralement diminuée et le débit cardiaque augmenté par les PGEs (Keen, 1989; Campbell & Halushka, 1996). L'administration intraveineuse de PGI₂ cause une hypotension importante. La production locale de PGE₂ et de PGI₂ régule le tonus vasculaire. PGE₂ est aussi impliqué dans le maintien de l'ouverture du canal artériel *in utero* (Coceani, 1980). PGD₂ cause une vasodilatation et une vasoconstriction dans la plupart des lits vasculaires. PGF_{2α} est un puissant vasoconstricteur des artères et des veines pulmonaires tandis que le TXA₂ est un puissant vasoconstricteur général (Dusting, 1978; Bunting, 1987).

1.5.3 Agrégation plaquettaire

Les prostanoïdes sont impliqués dans la thrombose surtout parce que le TXA₂ promouvoit la libération des plaquettes et leur agrégation tandis que le PGI₂ produit par les cellules endothéliales les inhibent (Moncada, 1982; Armstrong, 1996). Dans les syndromes aigus des artères coronaires, la voie de TXA₂ plaquettaire est très activée et l'aspirine qui inhibe l'acétylation par COX est bénéfique dans la prévention secondaire des maladies cérébrovasculaires et coronariennes (Gaetano, 1986; Armstrong, 1996).

1.5.4 Muscle lisse

En général, les muscles lisses respiratoires sont contractés par les PGDs, TXA₂, PGFs et relaxés par PGEs et PGI₂ (Campbell & Haluska, 1996). Même si PGEs et PGI₂ causent une bronchodilatation chez la plupart des espèces, une bronchoconstriction est parfois observée chez certains patients asthmatiques. Les muscles lisses longitudinaux du système GI se contractent sous l'effet des PGEs et PGFs tandis que les muscles lisses circulaires se relaxent en réponse aux PGEs et se contractent aux PGFs.

PGE₂ et PGF_{2α} sont les PGs majeurs au cerveau (White & Hagen, 1982) et jouent un rôle important dans la régulation de l'hémodynamie cérébrale durant la période périnatale (Leffler & Busija, 1985; Chemtob, 1996). Les prostanoïdes sont impliqués dans l'autorégulation du débit sanguin cérébral chez l'adulte (Pickard, 1981) et le NN (Leffler & Busija, 1987; Chemtob, 1996). Il existe des différences ontogéniques des effets de PGE₂ et PGF_{2α} de telle manière qu'ils déclenchent une vasoconstriction cérébrale significative chez l'adulte (Hayashi, 1985; Chemtob, 1989) mais une vasodilatation ou une légère vasoconstriction est observée chez le NN dépendamment de la taille des vaisseaux (Hayashi, 1985; Leffler & Busija, 1987; Chemtob, 1989).

1.5.5 Système rénal

Les prostanoïdes affectent la fonction rénale, altèrent l'excrétion du sodium, la clairance hydrique et peuvent affecter le débit sanguin rénal (Dunn & Hood, 1977; Breyer, 1996). PGE₂ est prépondérant dans les reins où il inhibe la réabsorption d'eau stimulée par la VSP. PGE₂ exerce des effets majoritairement vasodilatateurs dans les glomérules mais des effets vasoconstricteurs ont également été décrits. PGI₂ joue un rôle vasodilatateur

important dans la microvasculature des glomérules. TXA_2 cause une vasoconstriction intense, diminuant le taux de filtration glomérulaire et le débit sanguin rénal. PGE_2 et PGI_2 stimulent la sécrétion et l'expression génique de la rénine.

1.5.6 Système nerveux central (SNC)

Comme il a été mentionné précédemment, PGE_2 et PGD_2 sont les PGs principaux dans le SNC des mammifères. COX-1 est distribuée dans tous les neurones mais surtout dans le proencéphale où les PGs pourraient être impliqués dans des fonctions complexes intégratives telles la modulation du SN autonome et l'analyse sensorielle (Yamagata, 1993; Breder, 1995). COX-2 est constitutivement exprimée dans peu d'organes dont le cerveau (Kaufmann, 1996). L'expression de COX-2 est limitée à certaines régions du CNS: le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et la colonne vertébrale (Breder, 1995; Breder & Saper, 1996). L'expression de COX-2 est augmentée par l'activité nerveuse normale ou anormale (convulsive) et est détectée dans les cellules neuronales et non neuronales du CNS (Yamagata, 1993; Breder, 1995; Breder, 1996), ce qui suggère un rôle des PGs dans la transmission du SNC.

PGE_2 déclenche la fièvre en agissant sur l'hypothalamus et en impliquant des processus médié par l'AMPc. Les effets analgésique et antipyrétique des inhibiteurs de la COX supportent un rôle des prostanoides dans ces événements biologiques (Insel, 1996). Un autre effet central des PGs est la douleur ou l'hyperalgésie. Il est bien connu que la douleur inflammatoire implique la synthèse de PGs aux terminaisons périphériques des neurones sensoriels, ce qui cause l'hyperalgésie (Reireira, 1972). L'hyperalgésie déclenchée par d'autres stimuli est potentialisée par les PGEs et PGI_2 qui sensibilisent les terminaisons des nerfs afférents aux effets des stimuli chimiques ou mécaniques en

diminuant le seuil des nocicepteurs (Dray & Urban, 1996). PGD_2 est le prostanoïde principal dans le CNS des mammifères (Narumiya, 1982) et son implication dans plusieurs effets tels l'induction du sommeil (Urade, 1999), la diminution de la température corporelle et la modulation de l'odorat et de la douleur ont été démontrées (Eguchi, 1999).

1.5.7 Organes reproducteurs

Les prostanoïdes exercent plusieurs fonctions importantes en reproduction (Braun, 1980; Zahradnik, 1992; Olofsson & Leung, 1996). Des études préliminaires ont démontré l'accumulation des PGs dans le liquide amniotique (O'Brian, 1995) ainsi que leur rôle dans la contraction rythmée du myomètre utérin (Kurzok & Lieb, 1930). $PGF_{2\alpha}$ synthétisé dans l'utérus est une hormone lutéinisante et joue un rôle important lors de l'accouchement (Sugimoto, 1998). $PGF_{2\alpha}$, combinée avec de faibles concentrations de PGE_2 , provoque la contraction utérine et il est utilisé en clinique pour l'arrêt de la grossesse. La sensibilité de l'utérus aux PGs augmente avec la progression de la grossesse mais les effets demeurent inférieurs à ceux de l'ocytocine. Les prostanoïdes jouent un rôle important dans l'ovulation, la mobilité spermatique, la fertilisation ovulaire, l'implantation embryonnaire, le développement fœtal et l'accouchement (Herschman, 1996).

1.5.8 Système endocrinien

Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les PGs affectent la sécrétion d'hormones (Campbell & Halushka, 1996). L'administration systémique des PGEs promouvoit la libération des hormones de croissance, ACTH, prolactine, gonadotrophines, insuline et les stéroïdes. $PGF_{2\alpha}$ inhibe la production de la progestérone à partir du corps lutéal (Gobbetti, 1991).

1.5.9 Système gastrointestinal (GI)

Dans l'estomac, les PGs ont un effet cytoprotecteur du en grande partie à leurs propriétés vasodilatatrices qui améliorent le débit sanguin mucosal (Johansson & Bergström, 1982; Vane, 1998). Les effets des AINS qui mènent aux ulcères gastriques démontrent le rôle crucial des PGs dans la fonction gastrique. PGEs et PGI₂ réduisent l'acidité en inhibant la sécrétion de l'acide gastrique. Les PGEs augmentent la sécrétion du mucus dans l'estomac et dans le duodénum, le jéjunum et l'iléum. Les analogues des PGEs facilitent la guérison des ulcères gastriques et duodénaux. Les PGEs et PGFs stimulent le mouvement de l'eau et des électrolytes dans la lumière intestinale et donc facilitent la diarrhée qui est associée à l'administration de ces agents (Wilson & Kaymakcalan, 1981).

1.5.10 Effets mitogènes et modulation de la transcription génique

Des preuves tangibles suggèrent que les PGs affectent la transcription génique et régulent la croissance et la prolifération cellulaires. PGE₂ endogène est important pour la régulation de la croissance des cellules épithéliales (Konger, 1998) et des métastases tumorales (Paoletti, 1989; Fulton, 1991; Zhang & Fulton, 1994) tandis que PGE₂ et PGI₂ démontrent une activité mitogène dans les cellules osseuses et stimulent la synthèse d'ADN (Glantschnig, 1996). L'inhibition de la synthèse des PGs entraîne le ralentissement de la croissance tumorale (Lupulescu, 1978). L'importance de PGE₂ dans le développement néoplasique est suggérée par la diminution du risque de formation du cancer du colon associé à l'administration des AINS tels l'aspirine (Giovannucci, 1995; Williams, 1997). Les effets anti-prolifératifs de l'aspirine sur la synthèse d'ADN stimulée par les facteurs de croissance ont été renversés par l'administration de PGE₂ exogène (Castano, 1997). Cependant, des études ont démontré une action anti-proliférative de la PGE₂ *in vitro* (Stahl, 1990; Kishi, 1994). Il a été démontré que la PGD₂ inhibait la croissance cellulaire et la

synthèse d'ADN qui est médiée par l'AMPc intracellulaire (Koshihara & Kawamura, 1986).

Les gènes immédiatement inductibles tels *c-fos* et *erg-1* servent de coupleurs nucléaires pour transformer des événements cytoplasmiques précoces en modifications de l'expression génique à long terme. L'induction des gènes immédiatement inductibles est étroitement associée à la prolifération et/ou à la différenciation (Gashler & Sukhatame, 1995). PGE₂ et PGI₂ régulent l'expression de *c-fos* et de *erg-1* (Danesch, 1994; Glantschnig, 1996). L'effet de PGI₂ sur l'expression de *c-fos* est dépendant de la voie de signalisation d'une protéine kinase qui semble différer de la PKA et de la PKC (Glantschnig, 1996). La PGE₂ induit *c-fos* par des mécanismes dépendants de la PKC (Danesch, 1994).

PGE₂ et PGF_{2α} peuvent réguler l'expression via la transcription de plusieurs gènes. Les PGEs sont des agents immunomodulateurs et PGE₂ inhibe la transcription nucléaire de l'IL-2 en diminuant la liaison des facteurs de transcription AP-1 et NF-AT. Les agents qui induisent la production d'AMPc inhibent également la transcription du gène de l'IL-2. Cependant, le promoteur de l'IL-2 ne contient pas d'élément de réponse à l'AMPc (CRE) et donc le mécanisme de régulation de la transcription de ce gène reste à déterminer (Paliogianni & Boumpas, 1996). Le facteur de transcription CCAAT/Enhancer-binding protein δ (C/EBP δ) est un régulateur de la transcription du gène du facteur de croissance 1 insuline-like et qui est activé par la PGE₂. Cependant, le C/EBP δ n'est pas phosphorylé par la PKA et le mécanisme d'activation demeure inconnu (Umayahara, 1997). D'autres gènes sont modulés par la PGE₂ comme celui de la synthase d'oxyde nitrique (NOS) (Milano,

1995; Dumont, 1998), du facteur de libération de la corticotrophine (CRF) (Dibbs, 1997), de l'hydroxylase de la β -dopamine (Kim, 1997), des protéines-2 et -4 morphogénétiques osseuses (Viridi, 1998), protéine-5 de liaison du facteur de croissance insuline-like (McCarthy, 1996), et de l'hydroxylase de la tyrosine (Kim, 1996). Il a été démontré que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ stimule la croissance des ventriculocytes *in vivo* et induit les gènes des myofibrilles qui ressemblent à la deuxième chaîne légère de la myosine, c-fos, ANF, actine α -squelettique (Adams, 1996).

Le mécanisme précis par lequel les PGs affectent l'expression génique n'est pas toujours clair et varie selon les cas. Il a été récemment démontré que PGE_2 et $\text{PGF}_{2\alpha}$ inhibent l'expression lipogénique via une cascade de signalisation qui implique une protéine G sensible à la PTX (Matter, 1998). D'autres études ont montré que les signaux de la PGE_2 sont transmis via une nouvelle voie de CRE qui semble indépendante de la production d'AMPc (Audoly, 1999).

1.5.11 Autres réactions

$\text{PGF}_{2\alpha}$ et PGE_1 sont très efficaces à diminuer la pression intraoculaire et les analogues de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ont été testés chez des patients souffrant de glaucome (Alm, 1998). Les PGs peuvent affecter le modelage osseux en stimulant la différenciation des précurseurs des cellules responsables de la résorption et de la formation osseuses. Par contre, l'administration exogène peut stimuler la croissance osseuse (Pilbeam, 1996). Les PGEs ont été impliqués en tant que médiateurs importants de la résorption osseuse dans deux conditions cliniques: l'arthrite rhumatoïde et l'hypercalcémie associées au cancer. L'administration systémique des PGEs a un effet anabolisant sur l'os (Weinreb, 1997).

Les prostanoïdes ne peuvent pas accomplir leurs effets multiples et complexes sans la liaison à des récepteurs qui leur sont spécifiques et que nous allons présenter dans la section qui suit. Nous allons particulièrement détailler les récepteurs EP de la PGE₂ puisqu'ils sont d'une grande importance pour le tonus du canal artériel durant la période périnatale.

1.6 Récepteurs des prostanoïdes et voies de signalisation

La présence des récepteurs des prostanoïdes a été démontrée par plusieurs études pharmacologiques et leur classification a été effectuée en fonction de ces observations. La caractérisation pharmacologique a été confirmée par le clonage moléculaire des ADNc de tous ces récepteurs et a mené à la découverte des isoformes de ces récepteurs générés par un épissage alternatif d'ARNm. Les récepteurs des prostanoïdes incluent les récepteurs DP de la PGD₂, les quatre récepteurs EP₁₋₄ de la PGE₂, les récepteurs IP de la PGI₂, les récepteurs FP de la PGF_{2α} et les récepteurs TP du TXA₂ (Coleman, 1994).

Tous les récepteurs des prostanoïdes appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à 7 domaines transmembranaires de la super-famille du récepteur de la rhodopsine. Même si l'homologie globale des séquences en acides aminés avoisine les 20-30%, les récepteurs des prostanoïdes démontrent une plus grande homologie entre eux que par rapport aux récepteurs de type rhodopsine. De plus, il existe un pourcentage élevé de ressemblance entre récepteurs homologues de différentes espèces, particulièrement dans les régions dites conservées comme les domaines de liaison du ligand (Ushikubi, 1995). Des séquences conservées sont retrouvées, par exemple, au niveau de la deuxième boucle extracellulaire qui se lie aux quatrième et cinquième domaines transmembranaires (qui contiennent 7 résidus très conservés) et du troisième domaine

transmembranaire. Le motif de 7 résidus de la deuxième boucle extracellulaire est conservé dans tous les récepteurs des prostanoïdes qui lient la PGE₂ et apparaît donc être un facteur crucial de la spécificité de liaison au ligand. Une autre région très conservée consiste en 15 résidus dont une arginine dans le septième domaine transmembranaire et qui est supposée être le site de liaison du groupement carboxylique des prostanoïdes. Le tableau II résume les récepteurs des prostanoïdes, le couplage de ces derniers aux protéines G et les messagers secondaires produits correspondants identifiés jusqu'à ce jour.

1.6.1 Récepteurs EP (Tableau II, tableau III)

La PGE₂ a la particularité de démontrer une grande variété d'effets physiologiques et pathologiques dans divers cellules et tissus. PGE₂ exerce ses effets via les récepteurs EP qui sont distribués ubiquitairement dans l'organisme. Une grande spécificité de liaison de la PGE₂ a été observée dans le cerveau, les reins, l'utérus, le foie, le thymus et la médulla surrénales (Robertson, 1986). PGE₂ possède des actions opposées dues à la multiplicité des sous-types de récepteurs EP (EP₁, EP₂, EP₃ et EP₄) et au couplage de ces isoformes à différentes voies de signalisation. L'ordre de puissance des prostanoïdes à lier les récepteurs EP est comme suit: PGE₂, PGI₂, PGF_{2α} et PGD₂.

1.6.1.1 Récepteurs EP₁

Les récepteurs EP₁ médient la contraction du muscle lisse dans plusieurs systèmes (tractus GI, respiratoire) et tissus (vas deferens, vessie, myomètre, sphincter de l'iris). De plus, les récepteurs EP₁ médient la libération de neurotransmetteurs (Coleman, 1994) et peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la croissance puisque l'entrée de Ca²⁺ extracellulaire provoquée par PGE₂ induit les gènes *c-myc*, *c-fos* et *erg-1* associés à la croissance (Danesch, 1994). L'expression des récepteurs EP₁ est détectée dans les reins et

les poumons mais elle reste faible comparativement aux autres EP. Dans le rein, les récepteurs EP₁ sont situés dans les canaux collecteurs corticaux où ils médient l'inhibition de l'absorption du sodium en augmentant les niveaux de Ca²⁺ intracellulaire (Guan, 1998).

Tableau II: Classification des récepteurs des prostanoides et leurs signaux de transduction.

Ligand	Type	Sous-type	Isoforme	Protéine G	Signal transduction	
PGD ₂	DP			G _s	↑AMPc	
PGE ₂	EP	EP ₁		G _q (?)	↑IP ₃ , ↑Ca ²⁺	
		Variante rEP ₁		?	↓Ca ²⁺ (coexprimé avec EP ₁)	
		EP ₂		G _s	↑AMPc	
		EP ₄		G _s	↑AMPc	
		EP ₃	EP3A	EP3A	G _i	↓AMPc
				EP3B	G _s	↑AMPc
				EP3C	G _s	↑AMPc
				EP3D	G _{i/s/q}	↓AMPc, ↑AMPc, ↑IP ₃
				EP3Ia,b	?	
				EP3II	?	
				EP3III	?	
				EP3IV	?	
		EP3V	EP3VI	EP3V	?	
				EP3VI	?	
EP3e	?					
EP3f	?					
PGF _{2α}	FP			G _q	↑IP ₃ , ↑Ca ²⁺	
PGI ₂	IP			G _{s/q}	↑AMPc, ↑IP ₃	
TXA ₂	TP	TP _α		G _{s²/q}	↑AMPc, ↑IP ₃	
		TP _β		G _{q/i}	↓AMPc, ↑IP ₃	

Note: Modifié de Narumiya et al., 1996; Kotani et al., 1997. Résultats obtenus sur des récepteurs de différentes espèces: TP humain, isoformes EP₃ bovins (A-D) et humains (I-f), variante rEP₁ de rat, les autres proviennent de la souris. IP₃ = inositol triphosphate.

Tableau III: Agonistes et antagonistes sélectifs des sous-types de récepteurs EP d'après Coleman et al., 1994; Abramovitz et al., 2000. ND: non déterminé.

	EP ₁	EP ₂	EP ₃	EP ₄
Agonistes	17-phényl- ω -trinor PGE ₂	Butaprost 11-désoxy PGE ₂	M&B28767 11-désoxy PGE ₂ sulprostone GR63799X enprostil	ND
Antagonistes	AH6809/ SC19220	ND	ND	AH23848B

Chez l'humain, le récepteur EP₁ contient 402 acides aminés avec une masse moléculaire de 41, 858 (Funk, 1993) et possède 85% d'homologie avec le récepteur EP₁ de la souris (Watabe, 1993). Les récepteurs EP₁ humain et murin contiennent des sites de phosphorylation pour la kinase dépendante de l'AMPc (PKA) dans les 1ère et 3ème boucles intracellulaires et pour la PKC dans la 3ème boucle intracellulaire. La phosphorylation du site de la PKC du récepteur EP₁ bloque la liaison du récepteur avec sa protéine G, ce qui produit la désensibilisation à court et à long terme du récepteur EP₁ (Watabe, 1993; Okudu-Ashitaka, 1996).

Des études ont démontré que la contraction de la trachée du cochon d'Inde déclenchée par PGE₂ via les EP₁ est totalement dépendante du Ca²⁺ extracellulaire (Coleman, 1994). De plus, les récepteur EP₁ humains sont fonctionnellement couplés à une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire (Funk, 1993). Or il a été démontré que la liaison de la protéine Gq aux récepteurs active la phospholipase C, ce qui mène à l'accumulation de l'inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP₃) et à la mobilisation des stocks de Ca²⁺ intracellulaire

(Suba & Roth, 1987; Katoh, 1995) et/ou à l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire. Dans certains cas d'augmentation du Ca^{2+} libre qui est dépendante de la disponibilité du Ca^{2+} extracellulaire (EP_1 de souris exprimés dans des cellules CHO), on observe peu ou pas de modification de la formation d' IP_3 et aucune variation des niveaux d'AMPc n'a été observée (Watabe, 1993). L'absence d'activation de PLC fut également observée dans les cellules RCCT (Hebert, 1991) et myométriales (Asboth, 1996).

Un nouvel isoforme de EP_1 qui ne possède pas de C-terminal cytoplasmique a été récemment identifié ($\text{rEP}_1\text{-v}$) et isolé à partir d'une banque d'ADNc d'utérus de rat (Okudu-Ashitaka, 1996). Cet isoforme est très exprimé dans les reins et démontre une affinité et une spécificité de liaison du ligand similaires à la forme rEP_1 chez le rat mais qui n'est pas directement couplé aux systèmes de signalisation. Les données ont mis en évidence que ce nouvel isoforme interfère avec la signalisation médiée par les autres récepteurs EP: quand $\text{rEP}_1\text{-v}$ est co-exprimé avec rEP_1 , la mobilisation du Ca^{2+} normalement médiée par ce dernier est supprimée de façon significative. De même, la co-expression de $\text{rEP}_1\text{-v}$ avec EP_4 inhibe la formation d'AMPc médiée par EP_4 . Cet isoforme de EP_1 semble donc atténuer l'action de PGE_2 dans les tissus et constitue un exemple de "cross-talk" entre les sous-types de récepteurs d'une même PG.

1.6.1.2 Récepteurs EP_2 et EP_4

Les EP_2 sont plus largement distribués dans l'organisme que les EP_1 . Ils ont été identifiés dans le muscle lisse vasculaire, gastrointestinal, trachéal et utérin de différentes espèces et médient la relaxation et la vasodilatation des lits vasculaires et des vaisseaux sanguins, respectifs où ils sont présents (Negishi, 1993; Coleman, 1994). Les récepteurs EP_2 médient la libération de sécrétions à partir de cellules épithéliales et inhibent la

libération des médiateurs inflammatoires par les cellules de l'inflammation (mastocytes). Les récepteurs EP₂ sont également présents au niveau des nerfs afférents sensoriels. De plus, des études ont récemment démontré que les récepteurs EP₂ exerçaient un puissant effet régulateur sur l'homéostasie de la pression artérielle (Kennedy, 1999) et sur la fertilisation de l'ovule *in vivo* (Tilley, 1999). En effet, les souris déficientes en récepteurs EP₂ démontraient une hypotension sensible au sel et une diminution de la fertilité due à des difficultés précédant l'implantation.

Le récepteur EP₂ de souris a un poids moléculaire de 40. 478 kDa et contient 362 acides aminés. L'ARNm du récepteur EP₂ est très abondant dans l'utérus, la rate, les poumons, le thymus, l'iléum, le foie et l'estomac (Katsuyama, 1995). Les récepteurs EP₂ sont couplés à la protéine G_s et leur activation entraîne celle de l'adénylate cyclase et donc une augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc (Coleman, 1994).

Les récepteur EP₄, comme les récepteur EP₂, causent une relaxation notamment de la veine saphène de porc (Coleman, 1994). Cet effet vasculaire semble médié par une augmentation d'AMPc causée par l'activation de la G_s et de l'adénylate cyclase (Coleman, 1994). Les récepteurs EP₄ diffèrent des récepteurs EP₂ puisqu'ils ne sont pas activés par le butaprost mais ils peuvent être sélectivement antagonisés par AH23848 (Coleman, 1994).

Contrairement aux autres récepteurs de PGE₂, les récepteurs EP₂ et EP₄ possèdent de longues terminaisons carboxyliques similaires à celles des récepteurs β₂-adrénergiques. Les récepteurs EP₂ et EP₄ possèdent des sites potentiels de phosphorylation pour la PKA et beaucoup de sérines et thréonines pour la phosphorylation du C-terminal et qui servent donc comme des sites de régulation de la désensibilisation (Negishi, 1993).

Les récepteurs EP₄ sont ubiquitairement distribués et des niveaux élevés d'ARNm ont été détectés dans le duodénum, l'iléum, la rate, le thymus, les poumons, le cœur, l'utérus et un peu moins dans les glomérules rénaux où ils pourraient être impliqués dans la filtration glomérulaire (Breyer, 1996). PGE₂ possède des propriétés de régulation immunitaire puisque l'activation des récepteurs EP₂ et EP₄ régule l'activité des lymphocytes B (Fedyk & Phipps, 1996). Les souris transgéniques déficientes en récepteurs EP₄ ont un taux de survie très diminué et le canal artériel ne se ferme pas chez les NN qui décèdent d'œdème pulmonaire (Nguyen, 1997; Segi, 1998).

1.6.1.3 Récepteurs EP₃

Les récepteurs EP₃ exercent différentes actions dont la contraction utérine, la régulation de la libération des neurotransmetteurs, l'inhibition de la sécrétion d'acide gastrique, la lipolyse des tissus adipeux, la réabsorption de sodium et d'eau par les tubules rénaux, la glycogénolyse et l'oxydation des acides gras dans les hépatocytes, la libération d'HA et de catécholamines de la surrénale (Coleman, 1994). Une étude récente sur des souris "KO" a démontré que les récepteurs EP₃ médient également la fièvre induite par le LPS (Ushikubi, 1998). Des études récentes ont démontré que les récepteurs EP₃ activent la MAPK et donc sa translocation nucléaire (Burkey & Regan, 1995), la petite protéine G Rho (Katoh, 1996), et régulent la signalisation NF-κB-dépendante (Meyer-Kirchrath, 1998). les canaux calciques dépendants ou non du voltage (Tanaka, 1998) ainsi que les canaux de chlore (Sakai, 1995).

Les récepteurs EP₃ exercent leurs effets via l'activation de plusieurs voies de signalisation tels que l'entrée de calcium extracellulaire, l'activation de la PLC et la mobilisation de calcium intracellulaire qui en résulte via Gi (Nishigaki, 1993). L'inhibition

de l'adénylate cyclase via Gi et la stimulation du métabolisme du phosphoinositide via une protéine G résistante à l'action de la PTX. Ce couplage différentiel des récepteurs EP₃ à différentes protéines G et à différents effecteurs est du à l'épissage alternatif d'un même gène qui produit plusieurs isoformes de EP₃ chez le rat, la souris, le lapin, le bovin et l'humain (Fig. 1.3) (Narumiya, 1996). Ces isoformes qui diffèrent par leur terminaisons C-terminales ont une spécificité et une affinité de liaison à leur ligand identiques même si le couplage aux protéines G est différent (tableau IV). Divers agonistes spécifiques du récepteur EP₃ ont été développés comme le M&B28767, GR63799X et le sulprostone qui sont plus puissant que l'agoniste naturel PGE₂ (Coleman, 1994; Abramovitz, 2000). Les antagonistes spécifiques des récepteurs EP₃ restent à développer.

1.6.2 Récepteurs FP (Tableau II)

La PGF_{2α} produit une constriction du muscle lisse bronchique, trachéal, gastrointestinal, utérin et vasculaire et exerce un rôle primordial durant la lutéolyse chez plusieurs espèces (Coleman, 1994). L'ordre de puissance des agonistes pour le récepteur FP est: PGF_{2α} = fluprosténol > PGD₂ > PGE₂ > U46619 (TXA₂ mimétique, agoniste TP) > iloprost (agoniste IP). Un antagoniste du récepteur FP, THG113, a été très récemment développé par notre laboratoire (Peri, 2002).

Les ADNc des récepteurs FP ont été isolés à partir de plusieurs espèces telles la souris, le rat, la vache, l'homme (Pierce, 1997). Le récepteur FP de souris a un poids moléculaire de 40. 007 et contient 366 acides aminées et sa séquence est très similaire à celle des récepteurs EP₁ (Sugimoto, 1994). L'ARNm du récepteur FP est très abondant dans le corps lutéal et moins dans les reins, le cœur, l'estomac et les poumons. Le récepteur

FP cloné est couplé exclusivement à G_q et provoque l'hydrolyse du phosphatidylinositol (PI). Plusieurs sites potentiels de phosphorylation (sérines/thréonines) sont présents dans le C-terminal. Un isoforme du FP, nommé FP_B , qui est une forme tronquée du premier isoforme, a été identifié. L'activation de FP_B déclenche une plus grande production d' IP_3 que la forme FP (Pierce, 1997). Des études sur des souris déficientes en FP ont révélé que ce récepteur joue un rôle essentiel durant l'accouchement puisque ces animaux ne pouvaient pas donner lieu à des fœtus à terme (Sugimoto, 1998).

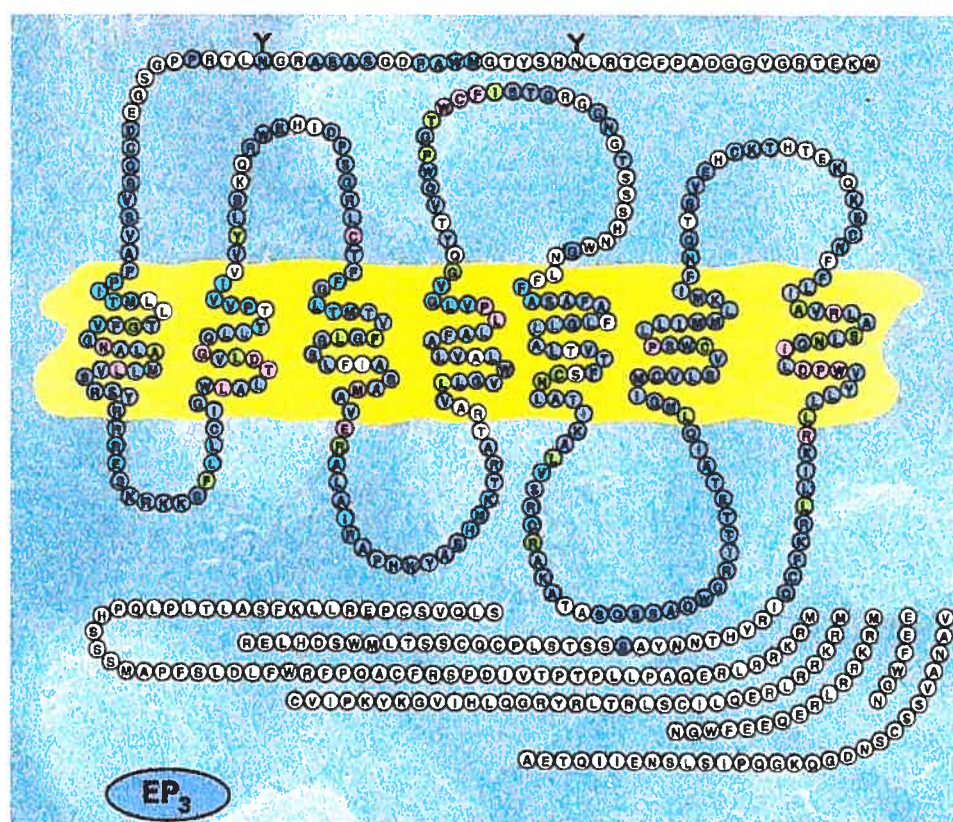


Figure 1.3. Représentation schématique des isoformes du récepteur EP_3 chez l'humain (365 - 425 acides aminés, 7 domaines transmembranaires) issus de l'épissage alternatif au niveau du C-terminal. Modifié de Namba et al., 1993. Les acides aminés en bleu sont homologues à ceux chez la souris, rose: acides aminés conservés dans tous les récepteurs de prostanoides, jaune: acides aminés conservés dans tous les récepteurs des prostanoides chez l'humain, vert: acides aminés spécifiquement conservés des récepteurs EP.

Tableau IV: Le couplage des isoformes du récepteur EP₃ aux protéines G varie en fonction des espèces. modifié d'après Irie et al., 1993 et Namba et al., 1993.

Souris		Bovin	
α	G _i	A	G _i
β	G _i	B	G _s
γ	G _i /G _s	C	G _s
		D	G _s /G _i
			G _q

1.6.3 Récepteurs DP (Tableau II)

La PGD₂ est un des prostanoïdes majeurs dans certains tissus tels le cerveau, la rate, la moelle osseuse et la peau (Giles & Leff, 1988) PGD₂ est produite par les mastocytes en réponse à des stimuli immuns. PGD₂ inhibe l'agrégation plaquettaire, provoque la vasodilatation systémique, la relaxation des muscles lisses vasculaires et non vasculaires mais peut également médier une constriction bronchique et pulmonaire (Campbell & Halushka, 1996). PGD₂ modifie les fonctions nerveuses autonome et sensorielle et joue un rôle important dans le SNC (induction du sommeil, température corporelle, odorat, libération hormonale et analgésie). Cependant, les mécanismes d'action de la PGD₂ ne sont pas encore élucidés.

L'ARNm du récepteur DP est abondamment exprimé dans l'iléum, les poumons, l'estomac et l'utérus. Le récepteur DP de souris a un poids moléculaire de 40, 012, possède

357 acides aminés (Hirata, 1994) et démontre un grand degré d'homologie avec les récepteurs EP₂, EP₄ et IP. Le récepteur DP est couplé à l'adénylate cyclase via Gs qui provoque une augmentation des niveaux d'AMPc. Les analogues sélectifs de PGD₂ pour les récepteurs DP incluent l'agoniste BW 245C et l'antagoniste BW A868C.

1.6.4 Récepteurs IP (Tableau II)

PGI₂ est principalement synthétisée par les cellules endothéliales vasculaires, elle inhibe l'agrégation plaquettaire et provoque la vasodilatation des lits vasculaires pulmonaires. Ces effets contrent les actions d'agrégation et de vasoconstriction du TXA₂ et contribuent au maintien de l'homéostasie circulatoire (Negishi, 1993a). PGI₂, comme PGE₂, médie l'hyperalgésie. Les récepteurs IP ont été détectés dans des neurones sensoriels et jouent un rôle déterminant dans la douleur lors de l'inflammation. En effet, les animaux qui n'expriment pas les récepteurs IP démontrent une diminution de la douleur (Bley, 1998).

PGI₂ est instable et elle est rapidement dégradée en 6-céto-PGF_{1α}. L'ordre de puissance des ligands des récepteurs IP: PGI₂ > PGE₁ > PGE₂ > 6-céto-PGF_{1α} > PGF_{2α} > PGD₂. L'iloprost est un agoniste puissant des récepteurs IP mais aucun antagoniste n'a été découvert à ce jour. Le récepteurs IP de souris a un poids moléculaire de 44, 722 et possède 417 acides aminés. L'ARNm du récepteurs IP de souris est très abondant dans le thymus, la rate, le cœur et les poumons (Namba, 1994). Des niveaux élevés d'expression sont observés dans les reins chez l'humain (Boie, 1994) où ils exerceraient une action vasodilatatrice en plus de médier la libération de la rénine de l'appareil juxta-glomérulaire (Ito, 1989).

Le récepteur IP est couplé à Gs et active l'adénylate cyclase, ce qui augmente les niveaux d'AMPc et inhibe l'agrégation plaquettaire. Lorsque les concentrations de PGI₂ sont très élevées, le récepteur IP de souris peut également déclencher l'hydrolyse du phosphatidylinositol (Namba, 1994) qui n'est inhibée ni par la PTX ni par la toxine du choléra; ce qui suggère que le récepteurs IP serait couplé à une protéine G de type G_q (Ushikubi, 1995). Il a été également rapporté que PGI₂ induit l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ libre dans plusieurs lignées de culture cellulaire (Watanabe, 1991).

1.6.5 Récepteurs TP (Tableau II)

Le récepteur de TXA₂ (TP) a été cloné au début des années 1990 (Hirata, 1991). Le TXA₂ est très instable et se dégrade en TXB₂. TXA₂ est un puissant vasoconstricteur et un activateur de l'agrégation plaquettaire qui cause une modification de la morphologie plaquettaire (Negishi, 1993a). Les activités biologiques du TXA₂ sont opposées à celles du PGI₂. TXA₂ est considéré comme un médiateur de l'infarctus du myocarde, de l'athérosclérose et de l'asthme bronchique (Negishi, 1993a). Il existe peu de ligands sélectifs du récepteur TP et leur ordre de liaison au récepteur est comme suit: TXA₂ > PGF_{2α} > PGI₂ > TXB₂.

Le récepteur TP est abondant dans le muscle lisse vasculaire et les plaquettes. L'ARNm du récepteur TP est abondant dans le thymus suivi de la rate, les poumons, et les reins. Une expression plus faible est détectée dans le cœur, l'utérus et le cerveau. L'ARNm du récepteur TP est très exprimé dans le placenta chez l'humain. Les récepteurs TP jouent un rôle dans la différenciation des thymocytes et l'apoptose des thymocytes immatures (Ushikubi, 1993). Les souris qui n'expriment pas les récepteur TP ont des réponses

hémodynamiques altérées et leurs plaquettes ne s'agrègent pas après exposition au TXA₂ (Thomas, 1998).

L'épissage alternatif du récepteur TP a produit deux isoformes chez l'humain: le TP_α plaquettaire / placentaire (Hirata, 1991) et le TP_β endothélial (Halushka, 2000). Ce dernier possède un C-terminal différent (Rachowdhury, 1994) et il est présent dans les plaquettes (Hirata, 1996). TP_α peut être fonctionnellement lié à la PLC via Gq et à G₁₁, ce qui provoque la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire (Kinsella, 1997). Malgré le fait que les deux isoformes des TP démontrent une activation similaire de la PLC, ils exercent des effets opposés sur l'activité de l'adénylate cyclase qui est stimulée par TP_α mais inhibée par TP_β (Hirata, 1996). Les récepteurs TP peuvent se coupler à G₁₂, G₁₂ et G₁₃ même si l'effet de cette activation sur la fonction n'est pas encore connu (Offermanns, 1994).

La section précédente a donné un bref aperçu des voies de signalisation multiples et de la grande diversité des situations physio-pathologiques dans lesquelles les récepteurs des prostanoïdes sont impliqués. Les récepteurs EP semblent jouer un rôle important dans le contrôle de la vasomotricité du CA durant la période périnatale. Les niveaux augmentés de PAF durant cette même période indiquent un rôle de ce médiateur dans la vasomotricité du CA en périnatal (chapitre 3). Nous allons essayer de mieux comprendre dans la prochaine section les voies de PAF, ses effets et ses voies de signalisation via son récepteur spécifique. Le rôle que joue PAF dans la fermeture du vaisseau à la naissance est discuté dans les chapitre 3 et 4.

1.7 PAF

Le facteur d'activation plaquettaire (PAF) est le nom trivial du phospholipide 1-*O*-alkyl-2-acétyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine qui est un puissant médiateur de plusieurs fonctions physiologiques et pathologiques. À faible concentration (10^{-12} – 10^{-9} M), PAF est un médiateur pléiotropique de plusieurs événements patho-physiologiques comme l'agrégation plaquettaire (10^{-10} M), l'inflammation, l'allergie, le choc, la thrombose et l'athérosclérose. L'administration aiguë de PAF entraîne une hypertension transitoire au niveau des veines porte et pulmonaire et une diminution du débit cardiaque chez plusieurs espèces animales (Bessin, 1983). Chez l'humain, PAF est synthétisé par beaucoup de cellules et tissus tels les granulocytes, les macrophages, les cellules endothéliales, les poumons, l'utérus, le cerveau et les reins.

1.7.1 Synthèse

1.7.1.1 Voie de remodelage

PAF est synthétisé par deux voies enzymatiques (Fig. 1.4): la voie *de novo* et la voie de remodelage où la longue chaîne d'acides gras acyle des phospholipides cellulaires est remplacée par un acétyle. Cette voie de synthèse de PAF est surtout utilisée dans un contexte inflammatoire. PAF n'est pas stocké sous forme de son précurseur mais il est rapidement synthétisé par les cellules de l'inflammation en réponse à des stimuli cellulaires spécifiques. La stimulation de la production de PAF via la voie de remodelage active la PLA₂c Ca²⁺-dépendante (et MAPKs-dépendante), qui hydrolyse les phosphatidylcholines en lysophosphatidylcholines (Leslie, 1997). La PLA₂c démontre une grande spécificité pour l'arachidonyle en *sn*-2, ce qui constitue la première étape essentielle pour la synthèse de PAF vu que les macrophages péritonéaux stimulés de souris déficientes en PLA₂c par "knock-out" ou par recombinaison homologue ont presque complètement perdu la capacité

de produire PAF (Bonventre, 1997; Uozumi, 1997). Les leucocytes en culture dans un milieu sans arachidonate démontrent une diminution de 85% de la synthèse de PAF, ce qui met en évidence la forte corrélation entre la synthèse de PAF et celle des eicosanoïdes (Chilton & Connell, 1988). La seconde étape de la synthèse de PAF par la voie de remodelage est médiée par l'acétyl-CoA-lysoPAF acétyltransférase qui est activée par le Ca^{2+} et la phosphorylation médiée par des kinases (Nieto, 1988; Baker & Chang, 1997) comme la MAPK p38 dans les leucocytes (Nixon, 1999). Cette acétyltransférase possède peu de spécificité pour la liaison *sn*-1 et elle va former PAF à partir du 1-alkyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (lyso-PAF) ou du lysophosphatidylcholine *in vitro* (Lee, 1985).

1.7.1.2 Voie de novo (Fig. 1.4)

PAF peut être synthétisé par une voie alternative: celle de la synthèse *de novo* qui implique une lysoglycérophosphate acétyl-CoA acétyltransférase distincte de la précédente puisqu'elle transfère un groupement phosphocholine à un alkyl acétyl glycérol (Lee, 1986). Cette voie contribuerait à la synthèse de PAF nécessaire au maintien des fonctions cellulaires physiologiques contrairement au PAF qui provient de la voie de remodelage lors de l'inflammation.

1.7.2 Stockage et libération

PAF est synthétisé à l'intérieur de la cellule et la voie de son transport à l'extérieur demeure inconnue. Deux sources majeures de PAF, les cellules endothéliales (Prescott, 1984) et les leucocytes (Lynch & Henson, 1986) retiennent PAF qu'ils produisent; les cellules endothéliales présentent PAF à la surface cellulaire pour la communication intercellulaire (McIntyre, 1985). Les monocytes, par contre, libèrent spontanément la

majorité du PAF qu'ils synthétisent (Elstad, 1988), tandis que les leucocytes, sous certaines conditions, peuvent libérer une partie du PAF qu'ils produisent (Cluzel, 1989).

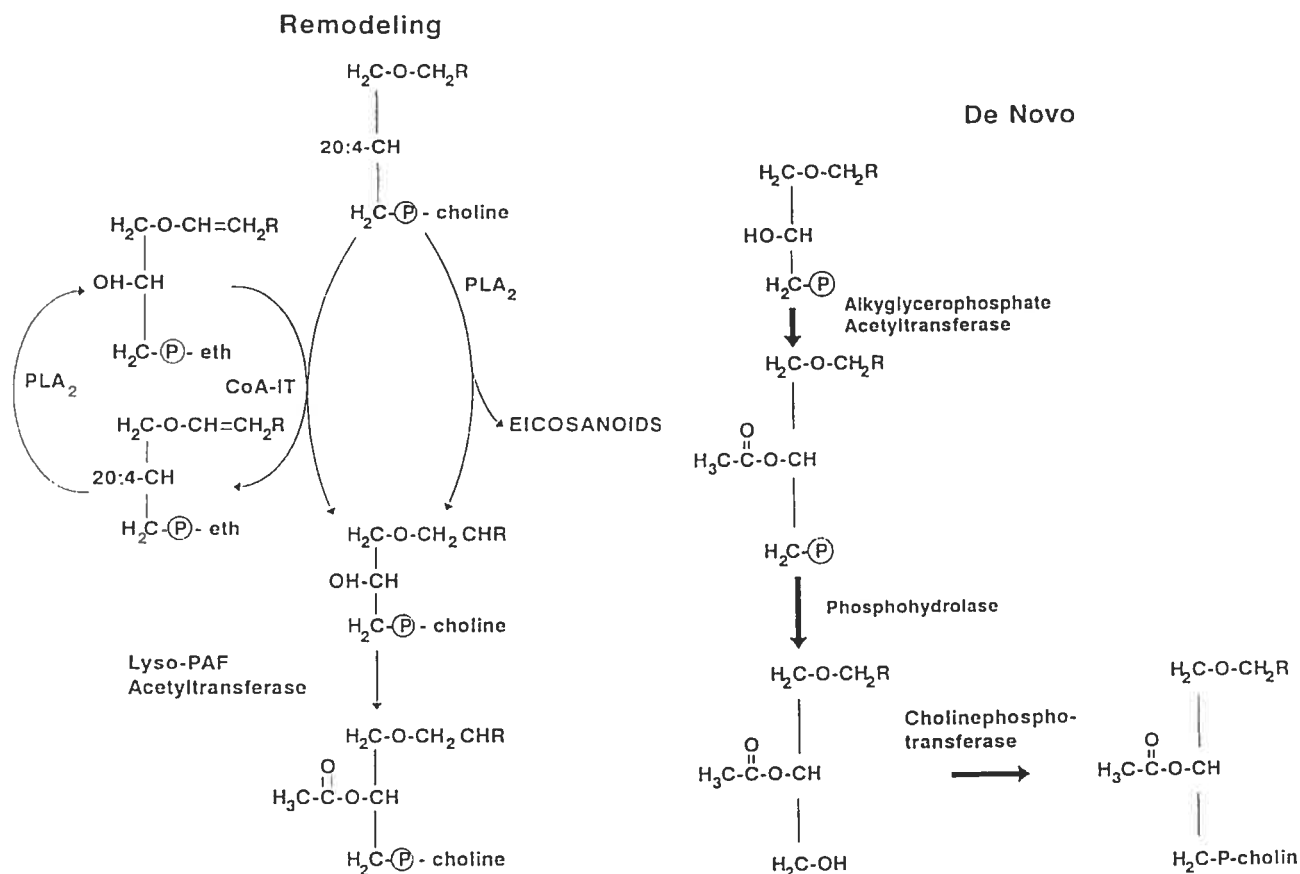


Figure 1.4. Synthèse de PAF par voie de remodelage (droite) et *de novo* (gauche) d'après Montrucchio et al., 2000.

1.7.3 Métabolisme de PAF: les PAF acétyl hydrolases

La dégradation de PAF se fait par élimination du groupement acétyle en position *sn*-2 afin de générer le lyso-PAF et l'acétate (Fig. 1.5) (Stafforini, 1997). Cette réaction est catalysée par la PAF acétylhydrolase [1-alkyl-2-acétyl-glycérophosphocholine estérase (EC 3.1.1.47)]. PAF-AH constitue le group VI des phospholipases A2 (Dennis, 1997). Les PLA_2 sont des enzymes qui régulent l'activation cellulaire (Stafforini, 1997). Tous les substrats des PAF-AH ont de puissants effets biologiques qui peuvent mener à des événements pathologiques quand leur concentration est trop élevée. Les PAF-AH sont donc

des terminatrices de signal et ne sont pas très précisément régulées puisqu'elles inactivent les messagers et les molécules biologiquement actives souvent produites par l'action des autres PLA₂. Les PAF-AH agissent sur un seul type de phospholipides qui sont biologiquement actifs ou toxiques et elles ne requièrent pas de calcium pour leur activité. La spécificité de substrat constitue donc le seul mécanisme par lequel les phospholipides de la membrane normale sont protégés d'une hydrolyse constitutive. En résumé, deux caractéristiques distinguent la réaction catalysée par les PAF-AH: les enzymes agissent en absence de calcium et elles hydrolysent des phospholipides spécifiques qui ont des courtes chaînes en position *sn*-2.

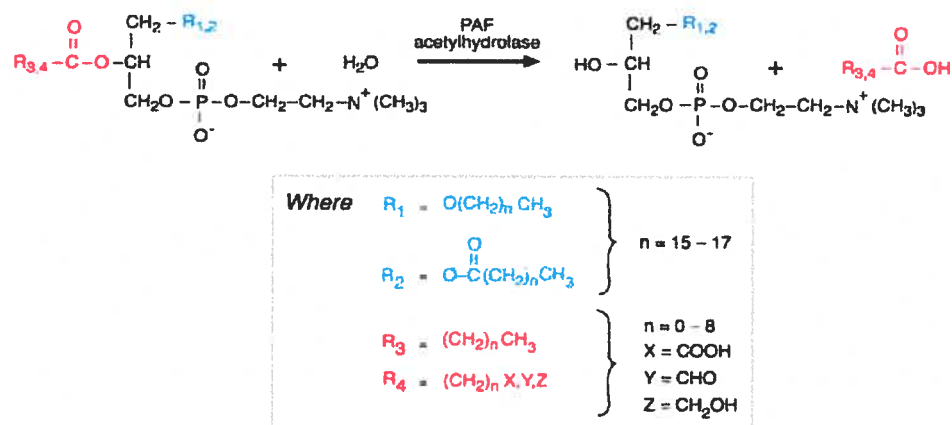


Figure 1.5. Réaction catalysée par les PAF acétylhydrolases (PAF-AH). PAF-AH reconnaît PAF ainsi qu'une famille d'analogues structuraux. Le type de liaison présente à la position *sn*-1 n'affecte pas l'activité catalytique, d'après Prescott et al., 2000.

1.6.3.1. Isoformes intracellulaires

On distingue trois isoformes distinctes de PAF-AH intracellulaire: les isoformes Ia, Ib et II. L'isoforme Ia n'est pas bien caractérisée mais ses propriétés suggèrent qu'elle pourrait être formée d'hétérodimères des sous-unités de la forme Ib (α_1 - α_2). La PAF-AH II est très exprimée dans le foie et les reins (Hattori, 1996). L'isoforme II a été initialement purifié à partir de foie bovin et consiste en monomère de 40-kDa et de 392 acides aminés

qui possède 41% d'homologie avec la PAF-AH extracellulaire plasmatique (Hattori, 1996). L'isoforme II contient également la séquence consensus Gly-X-Ser-X-Gly qui est caractéristique des lipases et sérine estérases (Hattori, 1996). Aucune homologie n'a été notée avec la séquence en acides aminés des trois sous-unité de l'isoforme Ib intracellulaire (Hattori, 1996). PAF-AH II partage beaucoup de similitudes structurales et fonctionnelles avec la forme plasmatique puisqu'elle hydrolyse PAF et les phospholipides avec de courts groupements acyle en position *sn*-2 (Hattori, 1995). PAF-AH II est un détecteur de l'état red-ox de la cellule, change rapidement (20 min) de localisation intracellulaire en réponse aux besoins cellulaires et empêche les dommages causés par l'oxydation lipidique en hydrolysant les phospholipides oxydés (Matsuzawa, 1997).

La PAF-AH Ib intracellulaire, qui requiert l'acétate en *sn*-2, est le seul membre du groupe qui a une spécificité absolue pour PAF (Hattori, 1993). L'isoforme Ib est un complexe semblable à celui des protéines G puisque c'est un hétérotrimère avec deux sous-unités catalytiques α (α_1 et α_2 , 29- et 30- kDa) et une sous-unité régulatoire β (45 kDa) (Ho, 1997). La grande sélectivité de PAF-AH Ib pour PAF et l'exclusion des phospholipides avec des groupements *sn*-2 acylés plus longs peut être expliquée par les caractéristiques structurales du site actif de la sous-unité α_1 (Ho, 1997). Trois acides aminés (deux leucines et une thréonine) rentrent en contact avec le groupement méthyle de l'acétate et donnent un méthyle pour former la poche hydrophobe afin que le groupement acétyle du substrat puisse s'y lier. Ces acides aminés sont conservés dans la sous-unité α_2 , ce qui suggère qu'elle soit aussi très spécifique pour PAF. La majorité des tissus chez l'adulte, sauf le cerveau, expriment la sous-unité α_2 (Manya, 1998).

Le PAF-AH Ib est impliqué dans les événements liés au développement et à l'homéostasie du cerveau comme la formation du cortex cérébral, la migration neuronale (Albrecht, 1996), la plasticité neuronale et la formation de la mémoire (potentialisation à long terme) (Kato, 1994). La sous-unité régulatrice β de PAF-AH Ib est le produit du gène *LIS1* et des mutations de cette sous-unité causent la lisencéphalie de Miller-Dieker (Hattori, 1994) qui se caractérise par une migration neuronale défectueuse et des convulsions (Shmueli, 1999). La sous-unité β contient plusieurs séquences répétées WD-40 (Hattori, 1994), ce qui lui permet d'interagir avec la tubuline et les protéines associées aux microtubules après le déclenchement expérimental des convulsions (Shmueli, 1999). La sous-unité β régule l'activité finale de l'hétérotrimère PAF-AH Ib à différentes étapes du développement (Albrecht, 1996; Manyà, 1998). ce qui mènerait à l'accumulation de PAF couplée à la migration neuronale. La sous-unité β active les α_2 - α_2 homodimères qui sont exprimés dans le cerveau d'adultes chez qui une importante accumulation de PAF a lieu, ce qui causerait des convulsions (Manyà, 1998).

1.6.3.2. Isoforme plasmatique

La forme sécrétée circule dans le plasma sous forme de complexe avec des lipoprotéines (Stafforini, 1987). L'isoforme plasmatique hydrolyse PAF et les phospholipides oxydés qui ont de longues chaînes acyl en *sn*-2 (Stremmer, 1991) et qui contiennent un groupement carbonyle à l'extrémité ω de la chaîne acyle. La PAF-AH plasmatique a une distribution ubiquitaire. Chez l'adulte, l'expression de PAF-AH plasmatique est très importante dans les ovaires, le placenta, le foie, les nœuds lymphatiques, la glande thyroïde et dans la rate chez le fœtus. L'expression est faible dans les poumons et dans toutes les régions du cerveau sauf dans l'hippocampe où elle est très

élevée (Cao, 1998). L'isoforme plasmatique de la PAF-AH est sujet à une régulation hormonale (Pritchard, 1987). Les oestrogènes diminuent *in vivo* l'expression de l'enzyme chez le rat adulte (mâle et femelle) tandis que la progestérone a l'effet inverse (Miyaura, 1991). L'accouchement (Yasuda & Johnston, 1992), le développement périnatal (Yasuda & Johnston, 1992), les glucocorticoïdes (dexaméthasone) (Yasuda & Johnston, 1992), les agents pro-inflammatoires (IFN- γ et le LPS) (Cao, 1998), les facteurs de transcription induits par la différenciation sont aussi impliqués dans la régulation de l'expression et/ou de l'activité de la PAF-AH plasmatique (Cao, 1998). PAF exogène stimule la transcription de PAF-AH plasmatique de façon dose-dépendante dans les cellules HEK293 qui surexpriment le récepteur de PAF (Cao, 1998).

Tjoelker et al. ont été les premiers à établir directement les propriétés anti-inflammatoires de la PAF-AH *in vivo* (Tjoelker, 1995) puisque l'administration de l'enzyme bloquait l'œdème induit par PAF dans un modèle de pleurésie et diminue la fréquence du diabète de type I en diminuant la concentration de PAF dans les îlots de Langerhans, ce qui protège les cellules β de l'inflammation (Lee, 1999). PAF-AH a également un effet bénéfique sur l'évolution de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né (Caplan, 1997) et la pancréatite (Hofbauer, 1998). PAF-AH plasmatique a été la cible de plusieurs études cliniques de maladies liées à l'inflammation telles l'arthrite, la septicémie et les maladies vasculaires (Imaizumi, 1995). En général, les maladies associées à l'inflammation et aux réactions oxydatives qui libèrent des radicaux libres entraînent une inhibition de l'activité de la PAF-AH plasmatique. Diverses mutations qui provoquent la perte complète de l'activité de la PAF-AH plasmatique ont été associées à des symptômes plus sévères de l'asthme (Stafforini, 1999) et à des anomalies cardiovasculaires chez les hommes japonais comme les maladies vasculaires coronariennes (G994T) (Yamada, 1998),

les accidents vasculaires (V279F) (Hiramoto, 1997) et les cardiomyopathies dilatatoires non familiales (G994T) (augmentation de la masse ventriculaire gauche et de l'index de masse ventriculaire gauche) (Ichihara, 1998).

Toutes les formes de PAF-AH sont inhibées par le di-isopropylfluorophosphate Pefabloc (Boehringer Mannheim) et le fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) qui possèdent une sérine dans leur site actif comme cela a été illustré par des études biochimiques et de mutagénèse (Stafforini, 1987; Hattori, 1993; Hattori, 1995). De plus, il a été démontré que les analogues structuraux de PAF agissent comme des substrats et/ou des inhibiteurs compétitifs de l'activité de PAF-AH (Adachi, 1997). Les antagonistes du récepteur de PAF qui sont des mimétiques structuraux de PAF sont également de bons inhibiteurs de l'activité des PAF-AH (Adachi, 1997). La prochaine section sera un bref aperçu des effets les plus communs de PAF dans l'organisme. Nous insisterons sur les effets cardiovasculaires de PAF afin de mieux élucider le rôle de ce médiateur sur le contrôle vasculaire du CA lors de la période périnatale.

1.7.4 Effets physio-pathologiques de PAF

PAF est très connu pour son rôle dans les systèmes vasculaire et inflammatoire, mais il transmet également l'information entre les cellules dans le SNC et au niveau des organes endocriniens, GI et autres. La grande diversité et la précision des mécanismes de contrôle de la concentration endogène de PAF indiquent une spécialisation de la fonction de ce phospholipide comme signal intercellulaire. Par conséquent, une signalisation peu ou pas régulée de PAF est associée à plusieurs maladies chez l'humain (Prescott, 1999)

1.7.4.1 Effets de PAF sur l'endothélium

L'endothélium régule l'homéostasie du microenvironnement en affectant le trafic des macromolécules et des cellules de la circulation sanguine vers les tissus. Les molécules impliquées dans le contrôle de ce trafic sont des médiateurs solubles, des récepteurs de surface qui traduisent les signaux extérieurs et les molécules d'adhésion. Dans ce cadre, PAF agit comme un régulateur autocrine (Heller, 1992) et paracrine des fonctions endothéliales. Plusieurs stimuli sont capables d'induire la synthèse de PAF à partir de l'endothélium tels la thrombine, les substances vasoactives et les cytokines pro-inflammatoires, ce qui suggère que PAF puisse transmettre et amplifier les signaux transmis à ces médiateurs. Les deux fonctions principales des cellules endothéliales régulées par la synthèse de PAF sont la fonction de barrière des cellules endothéliales et celle d'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales avant la transmigration.

Perméabilité des cellules endothéliales

PAF augmente *in vitro* la perméabilité de cellules endothéliales humaines en culture et induit les changements du cytosquelette qui mène au raccourcissement cellulaire et à la formation des jonctions intercellulaires (Bussolino, 1987). Les changements de morphologie cellulaire causés par PAF sont associés à l'activation calcium-dépendante de canaux potassiques et à l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire. PAF induit la production de plusieurs substances vasoactives par les cellules endothéliales humaines de façon dose-dépendante telles la PGI_2 et le TXA_2 (D'Humieres, 1986) et l'activateur du plasminogène (Emeis & Kluft, 1985). PAF induit l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via la production d' IP_3 (Bussolino, 1985; Bkaily, 1996) et l'ouverture de canaux calciques. L'activation de la PLA_2 qui s'en suit provoque la synthèse des LKs et du TXA_2 qui sont impliqués dans les changements de perméabilité et dans la constriction artériolaire.

Interaction endothélium-leucocytes-plaquettes (Fig. 1.6)

Trois étapes sont impliquées dans la migration des neutrophiles de la circulation sanguine vers les tissus inflammés (Butcher, 1991). La première étape requiert l'interaction transitoire des leucocytes avec les cellules endothéliales. Cette étape est médiée par des molécules de surface, les sélectines et elle induit le roulement (sans fixation) des leucocytes le long de la paroi vasculaire. La deuxième étape implique l'activation des leucocytes en contact avec l'endothélium via les sélectines. Cette activation mène à une adhésion stable dépendante des intégrines exprimés à la surface des leucocytes avec la famille des immunoglobulines à la surface des cellules endothéliales. Durant la troisième étape, la transmigration des cellules endothéliales à travers la paroi vasculaire est induite par chimiotaxie (Springer, 1994). PAF est considéré comme un médiateur de l'interaction leucocytes-endothélium qui pourrait participer à la phase d'activation (Zimmerman, 1992). PAF stimule le récepteur endothélial, promouvoit l'expression de la P-sélectine et la perte rapide et sélective des protéoglycanes sulfatés, ce qui diminue les charges répulsives entre les cellules et qui augmente donc l'attraction entre les cellules endothéliales et les neutrophiles (Silvestro, 1994).

1.7.4.2. Rôle de PAF et des plaquettes dans la thrombose

PAF est libéré par les plaquettes après stimulation avec l'ionophore de calcium A23187, la thrombine et le collagène. Cette activation plaquettaire est ADP- et AA-indépendante. La perfusion parentérale de PAF chez le cochon d'Inde provoque la formation d'une thrombose *in vitro*. En effet, PAF altère l'organisation moléculaire des protéines du cytosquelette qui contrôlent la perméabilité membranaire.

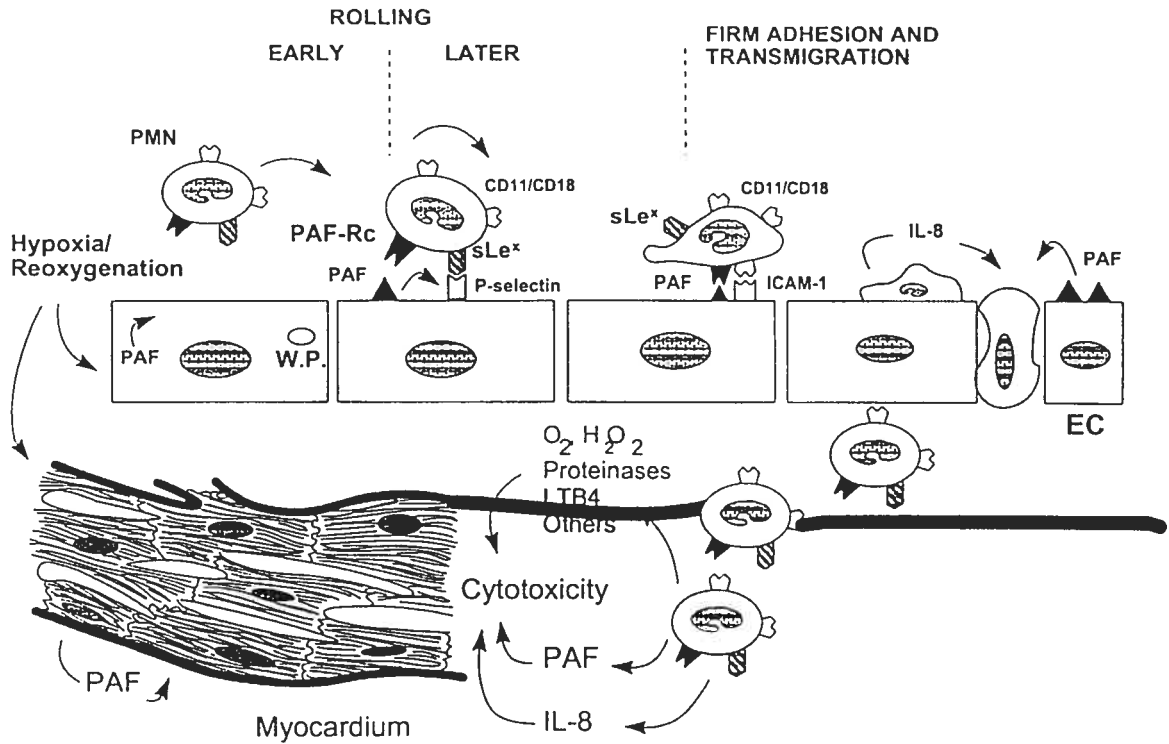


Figure 1.6. Effets de PAF sur l'endothélium, d'après Montrucchio et al., 2000.

Les cellules endothéliales stimulées par PAF se rétractent et perdent leur contact réciproque, les fibres de stress deviennent irrégulières ou disparaissent. L'ensemble de ces effets est inhibé par les antagonistes du récepteur de PAF (BN52021, CV3988 et 48740RP). PAF est un puissant amplificateur des réponses des plaquettes et des leucocytes puisque de très faibles doses ($10^{-16} - 10^{-11}$ M) potentialisent la libération de O_2^- et de OH^- par les PMN et amène les plaquettes à synthétiser la thrombine, l'ATP, l'IL-1, qui agissent à leur tour sur les cellules endothéliales pour produire plus de PAF. PAF et l'adrénaline, qui sont libérés simultanément lors de crise cardiaque ou de chocs, exercent des effets synergétiques sur l'induction de l'agrégation plaquettaire. L'embolie peut être évitée ou supprimée avec l'inhibiteur de PLA₂ mépacrine (Bourgain, 1985), l'EDTA ou les antagonistes du récepteur de PAF comme BN52021. Dans ce cas, l'inhibition de la

stimulation du récepteur de PAF empêche l'activation des sites de liaison au fibrinogène, ce qui entraîne la résorption du thrombus (Braquet, 1987).

1.7.4.3. Inflammation aiguë

L'infusion systémique de PAF provoque une augmentation généralisée de la perméabilité membranaire vasculaire et une agrégation des plaquettes. Cette hémococoncentration (causée par un effet direct ou indirect sur l'endothélium) est accompagnée par une hypotension réversible. L'injection intradermique de PAF aux humains provoque une réaction biphasique avec une phase aiguë et une phase tardive semblable à celle des individus sensibilisés à des doses modérées d'allergène. L'œdème endothélial et l'infiltration périvasculaire des PMN et des neutrophiles sont accompagnés par une accumulation intravasculaire précoce des neutrophiles et par l'apparition tardive (24h) des lymphocytes (Braquet, 1987).

1.7.4.4. Système cardiovasculaire

Effets du PAF exogène

L'administration intraveineuse de PAF provoque une hypotension dose-dépendante et diminue le débit cardiaque chez toutes les espèces étudiées (Feuerstein & Goldstein 1987). PAF a un effet vasodilatateur quand l'endothélium des artères coronaires est intact mais il déclenche une vasoconstriction lorsque l'endothélium est endommagé comme lors d'une ischémie (Kim, 1993). PAF exerce ses effets vasculaires (hypotension) directement puisque cet effet n'est pas inhibé par le SNC, le système rénine-angiotensine ou par des mécanismes muscariniques, β -adrénergiques, dopaminergiques, histaminérgiques ou par les eicosanoïdes, l'entrée de calcium, l'hormone de libération de la thyrotropine et les stéroïdes (Lai, 1983; Kamitani, 1984). PAF peut également exercer des effets indirects via

d'autres médiateurs dont il cause la synthèse et la libération. L'hypotension persistante retardée induite par PAF est médiée par l'oxyde nitrique (NO) endothélial (Bourgain, 1985; Moritoki, 1992). De plus, PAF est un puissant activateur des plaquettes et des leucocytes dont la libération de substances vasoactives (TXA₂) contribue aux effets hémodynamiques de PAF. PAF provoque des arythmies de conduction allant du bloc A-V de deuxième degré à la dissociation A-V complète, des extrasystoles ventriculaires et l'ischémie myocardique (Saeki, 1985; Alloatti, 1987). Il provoque également le raccourcissement de la durée du potentiel d'action ainsi que la diminution progressive (en 10 min) du potentiel membranaire de repos (canaux potassiques rectificateurs rentrants I_{K1} (Wahler, 1990)) et de la vitesse maximale de dépolarisation (Alloatti, 1987). Ces effets sont indépendants de la libération d'ACh à partir des terminaisons nerveuses car non affectés par l'atropine (Benveniste, 1983), des prostanoïdes (Levi, 1984) et des LKs (Levi & Mullane, 1990) mais le calcium joue un rôle important (Alloatti, 1987). PAF diminue les vitesses de contraction et de relaxation et augmente la fréquence spontanée de battement (Massey, 1991) et cet effet inotrope négatif est associé avec la diminution de [Ca²⁺]_i (Pietsch, 1998). De plus, PAF stimule, de façon lipoxigénase-, PLA₂- et protéine G-dépendante les canaux potassiques muscariniques cardiaques dans les cellules auriculaires isolées (Nakajima, 1991) mais il stimule les canaux calciques de type T et L de façon dose-dépendante dans les myocytes ventriculaires (Bkaily, 1996).

Pathologies cardiovasculaires associées à PAF

PAF est détecté dans la circulation coronarienne *in vivo* dans des cas d'anaphylaxie expérimentale (Pinckard, 1979; Piper & Stewart, 1986). L'action de PAF lors de l'anaphylaxie dépend de la libération de LKs et des autres vasoconstricteurs issus de l'action de COX (Piper & Stewart, 1986). La synthèse de PAF dans le myocarde a été

observée chez les patients après un infarctus du myocarde, une ischémie coronarienne (Montrucchio, 1986) ou une angine instable (Tselepis, 1999). Les cellules endothéliales (Arnould, 1993) et les cardiomyocytes (Janero & Burghardt, 1990) sont à l'origine de la synthèse de PAF. L'effet de PAF dépend des plaquettes qui libèrent l'HA, le TXA₂ et les LKs (Montrucchio, 1989). L'infarctus aigu du myocarde est associé à une forte diminution de l'activité de la PAF-AH plasmatique, ce qui prolonge la demi-vie de PAF (Stephens, 1993) et augmente l'agrégation plaquettaire dans les premières 48h après le début des symptômes (Tselepis, 1991). Des études cliniques ont démontré des niveaux élevés de PAF dans les artères coronaires de patients qui souffrent d'athérosclérose sévère (Mueller, 1995). Il a été démontré que PAF médie l'adhésion des monocytes à l'endothélium induite par le LDL et le LDL oxydé (Lehr, 1993). Par ailleurs, PAF agit comme inducteur de l'angiogénèse *in vivo* (Montrucchio, 1994; Camussi, 1995) en stimulant l'expression de plusieurs facteurs angiogènes et chimiokines tels le facteur de croissance des fibroblastes, le VEGF et son récepteur spécifique flk-1, le facteur de croissance hépatique (HGF) et la protéine 2 inflammatoire des macrophages (Bussolino, 1995). L'effet néoangiogénique dépend également de l'oxyde nitrique (NO) (Montrucchio, 1997). La synthèse de PAF, induite par plusieurs médiateurs polypeptidiques comme le TNF- α , VEGF, la thrombopoïétine et l'Il-3, est responsable de la migration endothéliale nécessaire au développement de nouveaux vaisseaux *in vitro* et *in vivo* (Montrucchio, 1994; Brizzi, 1999; Dentelli, 1999; Montrucchio, 2000b).

1.7.4.5. Système nerveux central

Le cerveau contient de grandes quantités des enzymes responsables de la synthèse (Baker, 1995; Kumar, 1988) et du métabolisme du PAF (Hattori, 1993). PAF est impliqué dans la différenciation cellulaire pendant le développement (Ved, 1991), la libération de neurotransmetteur exciteur (Bazan & Allan, 1996), la plasticité neuronale et la formation de la mémoire car c'est un messenger rétrograde dans la potentialisation à long terme (Kato, 1994). Les sujets avec le syndrome de Zellweger -déficiency génétique des enzymes de synthèse des phospholipides éthers- démontrent une fonction neuronale anormale (Kelley, 1983). Par ailleurs, la cytotoxicité apparaît quand les doses de PAF sont très élevées. PAF est impliqué dans la physio-pathologie des traumatismes et de l'ischémie cérébrale ainsi que dans celle des convulsions (Ogden, 1998). C'est un facteur-clé dans la démence provoquée par le virus du SIDA (Epstein & Gendelman, 1993; Lipton, 1994) et d'autres maladies neuro-dégénératives (Maclennan, 1996). PAF est également impliqué dans la dégradation neuronale irréversible associée à la blessure de la colonne vertébrale, au traumatisme et aux accidents vasculaires cérébraux via un mécanisme Ca^{2+} -dépendant (Kornecki & Ehrlich, 1991; Hirashima, 1994).

1.7.4.6. Asthme et anaphylaxie systémique

L'anaphylaxie systémique est caractérisée par la libération *in vivo* de PAF par les plaquettes circulantes, les cellules alvéolaires et les macrophages après administration intraartérielle ou intratrachéale d'antigène. PAF produit une bronchoconstriction, une inflammation et une hyperréactivité pulmonaires. Chez les sujets asthmatiques, PAF potentialise la bronchoconstriction provoquée par d'autres antigènes. L'hyperréactivité bronchique induite par PAF est inhibée par l'hydrocortisone, les méthylxanthines et par les antagonistes du récepteur de PAF alors qu'elle n'est pas affectée par l'indométhacine, les

antihistaminiques H_1 et les agonistes β -adrénergiques. L'hyperréactivité résulte d'un effet non spasmogène de PAF c-à-d de l'œdème, l'infiltration de plaquettes et d'éosinophiles et les dommages de l'endothélium. PAF est un puissant amplificateur de la réponse des éosinophiles puisqu'il exerce un effet chimiotactique très puissant sur ces cellules et induit la libération de protéines cationiques (protéine basique principale. MBP) qui augmentent, à leur tour, l'hyperréactivité bronchique. Par ailleurs, il a été démontré que les poumons sensibilisés par un antigène libèrent significativement plus de TXA_2 et d'HA après administration de PAF, AA ou LTD_4 que les animaux contrôle: la sensibilisation préalable à un antigène semble être un mécanisme qui transforme PAF en une substance qui provoque la libération d'histamine. Finalement, PAF augmente la sécrétion du mucus et altère ses propriétés physiques et endommage l'épithélium ciliaire respiratoire (Braquet, 1987).

1.7.4.7. Chocs endotoxique et induit par Ig-G

Le choc est caractérisé par une hypotension systémique et pulmonaire, une dysfonction endothéliale, la stimulation de différents systèmes plasmatiques (kallikréines, fibrinolyse et coagulation) et des cellules en circulation (stimulation des leucocytes et des plaquettes) qui sont principalement causés par des métabolites de l'AA *in vivo* et par un médiateur différent des eicosanoïdes puisque l'aspirine a très peu amélioré la situation. Bessin et al. ont été les premiers à remarquer la similitude entre les effets du choc endotoxique provoqué par l'endotoxine et celui par PAF. Tout comme l'endotoxine, PAF induit une hypoglycémie qui est inhibée par BN52021 (Etienne, 1987). Les antagonistes de PAF protègent également contre l'hypotension et la libération d'enzymes lysosomiales induites par l'IgG, le choc induit par IgG. Une protection semblable a été observée dans le cas de la pancréatite immunitaire expérimentale (Braquet, 1987; Jancar, 1988).

1.7.4.8. Pathologies rénales immunitaires et rejet de transplants

PAF peut être libéré en condition physiologique normale dans les reins dans lesquels il induit la libération de TXA_2 , de PGs et de radicaux libres oxygénés (cellules mésangiales glomérulaires en culture et reins isolés). L'infusion systémique de PAF est associée à une diminution marquée du débit sanguin rénal, de la filtration glomérulaire et de l'excrétion de sodium urinaire probablement liés à la chute de la pression systémique. PAF participe au dépôt d'un complexe immunitaire glomérulaire dans le cas du lupus érythémateux systémique et de néphrites. PAF est libéré durant le rejet aigu sévère d'allogreffe rénale. L'administration du BN52021 seul ou en combinaison avec la cyclosporine a retardé de façon significative le rejet de la greffe mais les antagonistes du PAF n'ont pas empêché le dépôt des plaquettes dans la greffe contrairement aux antagonistes du TXA_2 (Braquet, 1987).

1.7.4.9. Autres pathologies

PAF est très puissant à causer des ulcères gastriques semblables à ceux obtenus avec l'endotoxine c-à-d la congestion vasculaire de toute la muqueuse voire de la sous-muqueuse et l'hémorragie dans l'estomac et le petit intestin. PAF est également impliqué dans l'entérocolite nécrosante, les dommages de la muqueuse gastrique causés par l'éthanol et le stress. Les niveaux plasmatiques de PAF sont significativement augmentés dans le modèle de cirrhose expérimentale causée par le tétrachlorure de carbone (CCl_4) (Braquet, 1987). PAF est également associé à différentes rétinopathies (Beauchamp, 2002). PAF agit sur différents systèmes, tissus et organes via son récepteur spécifique que nous allons discuter dans le prochain paragraphe.

1.7.5. Récepteur de PAF et voies de signalisation

Les actions intracellulaires de PAF sont médiées par un récepteur membranaire, thermolabile et sensible à la dégradation par les protéases (Valone, 1984). La liaison du récepteur avec son ligand est régulée par le GTP (Hwang, 1986) et les cations puisque Na^+ est un inhibiteur et K^+ , Cs^+ , Rb^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} et Mn^{2+} sont des stimulateurs de cette liaison (Hwang, 1986). Le gène code pour 342 acides aminés chez l'humain et la séquence est homologue à >80% à celle de la protéine du cochon d'Inde. L'activation du récepteur de PAF provoque le "turnover" du PI et augmente les niveaux intracellulaires de calcium et les deux réponses sont médiées par deux protéines G. L'activation des MAPK et des ERK (isoformes 42- et 44-kDa) après exposition des cellules en culture au PAF exogène n'implique pas la voie de signalisation de Ras mais la synthèse d'AMPC est stimulée via la protéine Gs (Prescott, 2000).

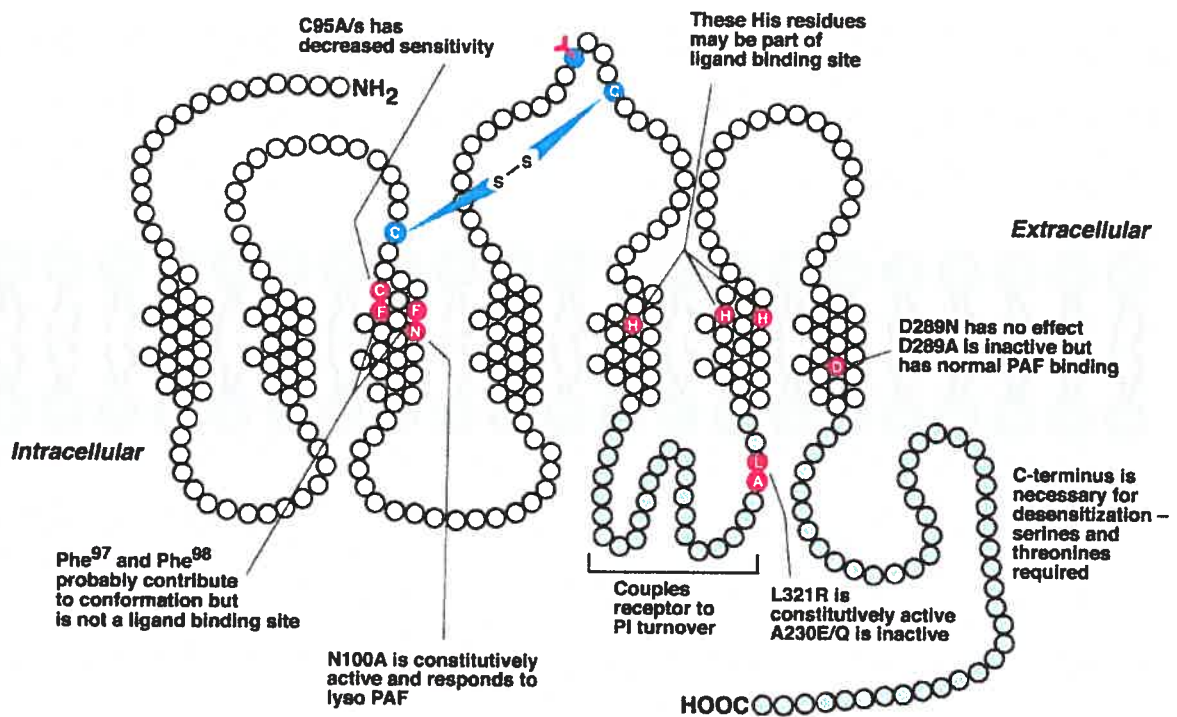


Figure 1.7. Relation structure-activité du récepteur de PAF. Des études de transfection des ADNc codant pour les formes sauvage et mutante du récepteur ont défini des régions du récepteur responsables de la liaison du ligand, de la signalisation intracellulaire et de la désensibilisation d'après, Prescott et al., 2000.

La partie centrale du récepteur de PAF (His, Phe, Cys) correspond à la liaison du ligand (Fig. 1.7), ce qui est conforme aux autres récepteurs couplés aux protéines G dont le site de liaison au ligand est constitué de plusieurs régions transmembranaires. La 3^{ème} boucle intracellulaire est importante pour la signalisation intracellulaire. Comme cela est le cas pour les autres récepteurs couplés aux protéines G, le récepteur de PAF est désensibilisé de différentes façons: la désensibilisation homologue via la phosphorylation du récepteur (par la kinase-1) et l'inactivation de l'effecteur-clé PLC-β3 en aval par la PKC. La désensibilisation hétérologue du récepteur de PAF a lieu par phosphorylation via la PKC (Fig. 1.8). L'expression du gène du récepteur de PAF peut être régulée par des agents inflammatoires incluant PAF lui-même. Deux transcrits différents du gène sont identifiés. Le premier transcrite est présent uniquement dans les leucocytes périphériques et son expression augmente en réponse au PAF. Il possède des séquences consensus pour NF-κB, SP-1, et INR. La transcription du deuxième isoforme du récepteur de PAF est induite par les phorbol esters et requiert un site fonctionnel de AP-1, par l'acide rétinolique et par l'hormone thyroïde. La stabilité de l'ARNm est un autre mécanisme de régulation possible.

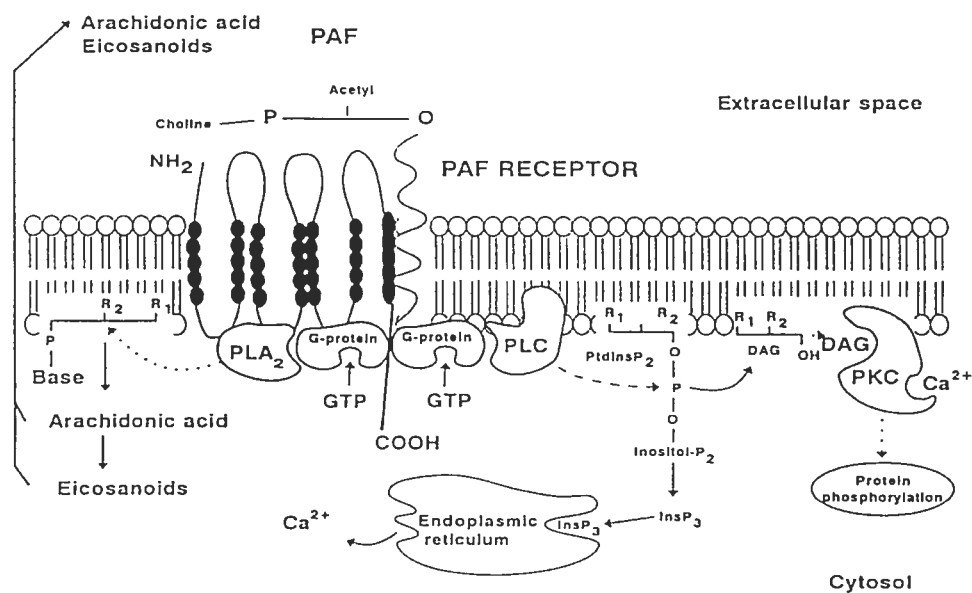


Figure 1.8. Voies de signalisation du récepteur de PAF, d'après Montrucchio et al..

1.7.6. Antagonistes du récepteur de PAF

1.7.6.6. Inhibition non spécifique des effets de PAF

Les médicaments qui interfèrent avec le calcium intracellulaire agissent également sur la réponse déclenchée par PAF *in vitro* et *in vivo*. Ils comprennent les agents qui ont une action directe comme les bloqueurs de canaux calciques, les inhibiteurs de calmoduline, les chélateurs de calcium et les anesthésiques locaux et ceux qui ont une action indirecte et qui régulent les concentrations de messagers secondaires nucléotidiques cycliques comme la PGI₂ ou la PGE₁ et les β₂-agonistes (salbutamol) dans le cas de l'AMPc, le donneur de NO[•] Sin-1 (3-morpholinosydnonimine) pour le GMPc et les inhibiteurs de phosphodiesterases. Une inhibition non spécifique des effets de PAF a été observée avec les inhibiteurs de phospholipases et les antagonistes de TXA₂ et de LKs (Braquet, 1987).

1.7.6.7. Inhibition spécifique de PAF

Les antagonistes qui sont des analogues structuraux de PAF sont des produits synthétiques qui sont obtenus par trois méthodes différentes: la conservation ou non du squelette de base et les dérivés du tétrahydrofurane (SRI 63-073, CV-6209, tétrahydrofurane). Les antagonistes naturels rassemblent les terpènes (gingkolides: BN52021), les lignans (kadsurénone), la gliotoxine et ses analogues (FR-49175 de *Penicillium tertikowskii*) (Braquet, 1987). Les antagonistes synthétiques du récepteur de PAF sont peu nombreux. Les plus connus sont des dérivés du (3-pyridyl)-1*H*,3*H*-pyrrolo(1,2-*c*) thiazole (48740RP) (Lefort, 1988; Lave, 1990) et du E-1-*p*-sulfamylbenzylidiényl indènes. Les agents pharmacologiques tels les anti-psychotiques classiques de type triazolobenzodiazépines (TBDZ) (alprazolame, triazolame) et certains

bloqueurs de canaux calciques de classe II (gallopamil) et de classe III (diltiazème) démontrent également une activité antagoniste du récepteur de PAF.

1.7.7. Relation PAF - prostaglandines

L'incubation des macrophages alvéolaires en présence de PAF (10^{-10} - 10^{-8} M) et de LPS a rapidement (30-60 min) augmenté la transcription de COX-2 (3-5 fois) ainsi que la production d'Il-6 par une voie PG-dépendante. Cet effet de PAF est associé à une augmentation de la production de PGE₂ qui est inhibée par l'antagoniste du récepteur de PAF WEB 2170 (Thivierge & Rola-Pleszczynski, 1995). L'induction du gène de COX-2 par PAF a également été démontrée dans le cerveau, surtout dans l'hippocampe. Cette induction génique médiée par PAF serait impliquée dans la plasticité neurale ainsi que dans la cicatrisation des blessures cérébrales (Serou, 1999). L'inhibition spécifique de COX-2 peut bloquer les actions de PAF lors de l'inflammation prolongée (Ottino & Bazan, 2001). Par ailleurs, PAF augmente la production de PGs dans les membranes fœtales intactes en culture en doublant la transcription de COX-2 (8h) (Alvi, 1999). Finalement, l'activation de récepteurs nucléaires de PAF induit la transcription du gène de COX-2 dans les noyaux isolés de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux chez le porcelet (Marrache, 2002). L'ensemble de ces observations suggère un lien entre PAF – COX-2 – prostaglandines. Il serait donc utile de confirmer une telle relation dans le cadre spécifique de la période périnatale ainsi que son rôle dans la physio-pathologie du canal artériel.

1.8 Le canal artériel

Le canal artériel (CA) est un vaisseau sanguin de "shunt" durant la vie fœtale. Ce vaisseau amène le sang désoxygéné provenant de l'artère pulmonaire principale à l'aorte descendante (Fig. 1.9). Plus de la moitié du débit de cette dernière est alors dirigé vers la circulation ombilico-placentaire (Heymann & Rudolph, 1975) où les échanges gazeux qui permettent de réoxygéner le sang ont lieu. Le maintien de l'ouverture du CA est crucial pour la survie *in utero* tandis que sa fermeture immédiatement après la naissance est essentielle à la mise en place de la circulation postnatale. La période nécessaire à la fermeture du CA varie en fonction des espèces (Heymann & Rudolph, 1975) mais elle est complète dans les premières 48 heures suivant la naissance chez l'humain (Drayton & Skidmore, 1987).

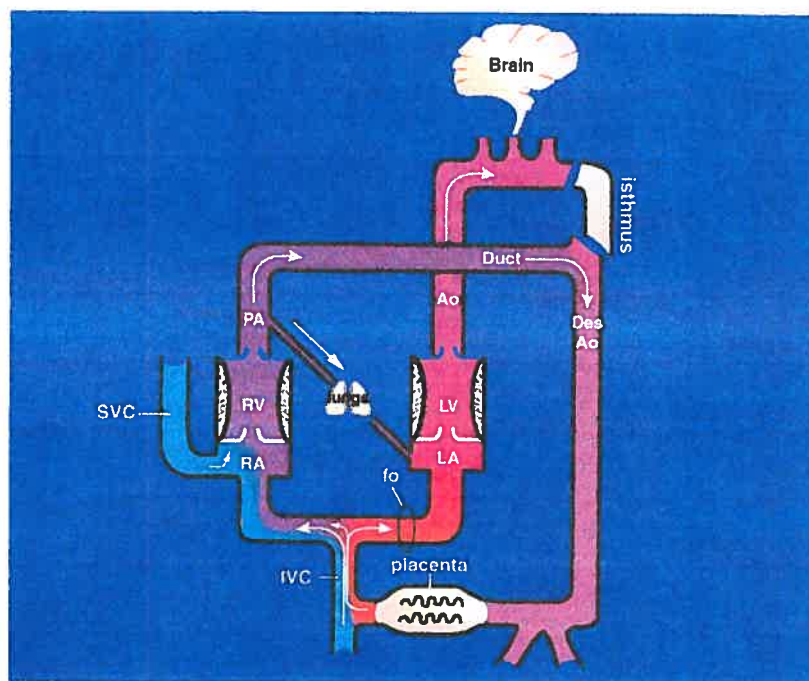


Figure 1.9. Situation anatomique du canal artériel et rôle dans la circulation cardiovasculaire fœtale. Duct: canal artériel, SVC: vein cave supérieure, IVC: veine cave inférieure, LA: oreillette gauche, LV: ventricule gauche, RA: oreillette droite, RV: ventricule droit, fo: foramen ovale, PA: artère pulmonaire principale, Ao: aorte descendante, isthmus: isthme aortique qui relie la crosse aortique à l'aorte descendante.

1.8.1 Rôles physiologiques du CA

1.8.1.1 La circulation foetale

Le débit sanguin qui traverse le CA est déterminé par la différence de pression qui s'exerce entre l'artère pulmonaire principale et l'aorte descendante. Durant la vie foetale, la pression pulmonaire est élevée (résistance élevée dans les poumons non fonctionnels) tandis que la pression aortique est faible (faible résistance de la circulation ombilico-placentaire), ce qui amène une circulation sanguine de droite vers la gauche dans le CA (Anderson, 1981). Le ventricule droit pompe $\approx 66\%$ du débit ventriculaire combiné chez le fœtus d'agneau dont 90% passent par le CA (Heymann & Rudolph, 1975). L'ouverture du CA *in utero* est un état actif puisque le CA a un tonus intrinsèque ou il est stimulé pour se contracter et ces mécanismes pro-contractiles sont bloqués par des vasodilatateurs qui ont des effets inhibiteurs sur le muscle lisse. Plusieurs systèmes vasodilatateurs du CA ont été identifiés.

1.8.1.1.1. Prostaglandines (PGs)

1.8.1.1.1.1. Effets vasodilatateurs des PGs. En 1973, Coceani et Olley ont démontré que PGE₁ et PGE₂ relaxaient le CA isolé chez l'agneau (Coceani & Olley, 1973). Des études ultérieures chez d'autres espèces animales (rats, lapins, cochons, agneaux) ont établi que les PG de type E étaient les plus puissantes (pM-nM) PGs à dilater le CA (Coceani, 1975; Clyman, 1978). La seule espèce animale où les PGs ne semblent pas avoir d'effet significatif sur le CA est le cochon d'Inde (Bodach, 1980). Le 6-céto-PGE₁, qui est un métabolite de PGI₂, est presque aussi puissant que PGE₂ mais les enzymes responsables de sa formation n'ont pas été détectées dans le CA d'agneau (Coceani, 1980).

1.8.1.1.1.2. Sources locales de PGs. Le CA est également exposé aux PGs locales et circulantes (Clyman, 1987). Le CA isolé synthétise PGI₂ comme produit principal de l'AA dans le CA d'ovin et de bovin, mais il libère également de plus petites quantités (10% par rapport à PGI₂) de PGE₂, PGF_{2α}, et PGD₂ (Pace-Asciak & Rangaraj, 1977, 1978, 1983). Des études d'immunohistochimie ont permis d'établir que la PGI₂ synthase est exprimée dans les cellules endothéliales et musculaires lisses dans le CA fœtal de chien et d'humain (2^{ème} trimestre) (de Reeder, 1989; Slomp, 1992), tandis que l'enzyme était presque uniquement présente dans l'endothélium de l'aorte (de Reeder, 1989). PGE₂ semble être synthétisée majoritairement dans la média du CA isolé (Coceani, 1986). L'activité de la prostaglandine déshydrogénase ou cyclooxygénase (PGDH ou COX) a été mise en évidence dans le CA d'ovin (Pace-Asciak & Rangaraj, 1978).

1.8.1.1.1.3. Prostaglandines circulantes. Le CA est également exposé aux PGs en circulation (Clyman, 1987; Guerguerian, 1998). Les concentrations de PGE₂ circulantes augmentent en fin de gestation et atteignent 1-2 nM chez l'agneau proche-terme (Clyman, 1980b), ce qui est proche des concentrations qui causent une vasodilatation maximale du CA isolé (Coceani, 1975; Smith, 1994). Le placenta est la source principale de la PGE₂ circulante chez le fœtus d'agneau (Thorburn, 1992) et d'humain car l'expression d'une des enzymes responsables de la synthèse, la COX-2, y est très augmentée juste avant la naissance (Slater, 1998). Par ailleurs, les poumons sont le principal site de dégradation des PGs (Tsai & Brown, 1987) mais le débit pulmonaire ne représente que 7-12% du débit ventriculaire combiné chez le fœtus d'agneau. Le faible catabolisme des PGs chez le fœtus est une cause des niveaux élevés de PGE₂ en circulation chez le fœtus d'agneau en fin de gestation (Heymann & Rudolph, 1975). Des études préalables ont établi que les PGs circulantes sont

les principales responsables du maintien de l'ouverture du CA *in utero* (Clyman, 1987). Ces observations ont été effectuées sur le CA isolé d'agneau exposé à la PO₂ fœtale que l'indométhacine ne contractait pas et qui libérait une très faible quantité de PGE₂ (Clyman, 1980a).

1.8.1.1.4. Isoformes de la cyclooxygénase. On distingue deux isoformes de la prostaglandine H synthase (PGHS) ou cyclooxygénase (COX). L'isoforme COX-1 est constitutive tandis que COX-2 est inductible par différents facteurs pro-inflammatoires et tumoraux (Frolich, 1997). Une étude préliminaire a rapporté que le CA fœtal exprime surtout COX-1 tandis que le CA nouveau-né exprime majoritairement COX-2 (Guerguerian, 1998). Les isoformes de COX exprimés dans le placenta et qui sont responsables de la synthèse de PGE₂ circulante fœtale varient en fonction de l'âge gestationnel. Chez l'agneau préterme, COX-1 est majoritaire tandis que COX-2 devient majoritaire à la fin de la gestation (Wimsatt, 1993; Slater, 1999). Par conséquent, COX-1 produit la PGE₂ locale et circulante au CA du fœtus préterme tandis que dans le CA du fœtus à terme, la PGE₂ locale est synthétisée par COX-1 alors que COX-2 devient la source principale de la PGE₂ en circulation (Guerguerian, 1998).

1.8.1.1.2. Oxyde nitrique (NO[•])

Les donneurs de NO[•], nitroprusside de sodium (SNP) et glycéryl trinitrate, dilatent le CA d'agneau *in vivo* (Walsh, 1988) et *in vitro* (Walsh & Mentzer, 1987; Smith & McGrath, 1993). Ces agents augmentent les concentrations intracellulaires d'AMPc et de GMPc (Walsh & Mentzer, 1987; Cocceani, 1996). Les inhibiteurs de la synthèse de NO[•]

(NOS) contractent le CA *in vitro* (Coceani, 1994b) et *in vivo* (Fox, 1996) et cette contraction est associée à une diminution des niveaux intracellulaires de GMPc (Coceani, 1996). Des études immunohistochimiques ont démontré que NOS endothélial (NOSe) était exprimée dans l'endothélium luminal (Fox, 1996) et dans celui des vasa vasorum (Clyman, 1998), ce qui a été confirmé par des études fonctionnelles en absence d'endothélium (Coceani, 1994b). La forme inductible de NOS, NOSi, est présente dans le coeur et les grands vaisseaux chez le fœtus de rat (Bustamante, 1996) ainsi que dans l'endothélium luminal du CA fœtal chez l'agneau (Clyman, 1997). L'administration orale d'un inhibiteur sélectif de NOSi (L-N^G-1-[1-aminométhyle] lysine) à des rates enceintes provoque la contraction dose-dépendante de l'aorte, de l'artère pulmonaire et du CA fœtaux *in vivo* et cet effet est inversé par le SNP (Bustamante, 1996).

Cependant, des études *in vitro* ont démontré que PGE₂ est le principal vasodilatateur du CA et que NO[•] jouerait un rôle annexe (Smith & McGrath, 1993; Fox, 1996). Vu l'importante contraction du CA fœtal provoquée par l'indométhacine chez l'agneau *in vivo* (Friedman, 1983; Fox, 1996), la seule présence de NO[•] est insuffisante à s'opposer au tonus intrinsèque du vaisseau chez le fœtus *in utero*. Une étude chez les lapins suggère que PGE₂ endogène potentialise la sensibilité du CA et cause une réponse maximale du vaisseau aux vasodilatateurs non prostanoïdes (Smith & McGrath, 1994). Les effets de NO[•] endogène et exogène sur l'ouverture du CA n'ont pas encore été déterminés sur un nouveau-né.

1.8.1.1.3. Monoxyde de carbone (CO)

Des études récentes ont démontré que l'hème oxygénase (HO), qui synthétise le CO à partir de l'hème, est présente dans le ML et que le CO provoque une vasodilatation médiée par l'augmentation des niveaux de GMPc (Morita, 1995) ou par l'action sur des canaux potassiques (Farrugia, 1993; Wang & Wu, 1997). L'expression des isoformes inductible HO-1 et constitutive HO-2 de l'enzyme a été étudiée par immunohistochimie dans le CA d'agneau (Coceani, 1997). HO-1 est exprimée dans l'endothélium et le ML tandis que HO-2 est présente seulement dans le ML. La formation du CO à partir d'hémine exogène est inhibée par l'inhibiteur de HO protoporphyrine de zinc IX (ZnPP) (10 μ M). Cependant, ZnPP déclenche la contraction du CA exposé à la PO₂ fœtale uniquement quand HO-1 a été préalablement induite (Coceani, 1997). Il reste à établir si CO agit comme un vasodilatateur du CA dans des conditions physiologiques *in utero*.

1.8.1.1.4. Autres vasorelaxants du CA

Chez le fœtus d'agneau chroniquement instrumenté, l'adénosine inverse la contraction du CA provoquée par la ventilation pulmonaire avec l'oxygène (Mentzer, 1985). De plus, les concentrations d'adénosine circulante varient de façon inversement proportionnelle à la PO₂ artérielle fœtale et au degré de contraction du CA (Mentzer, 1985). Cependant, l'adénosine n'a pas d'effet sur la contraction du CA fœtal induite par l'indométhacine *in vivo* chez l'agneau (Friedman, 1983). De plus, l'effet maximal de l'adénosine sur le CA de lapin traité à l'indométhacine en absence d'endothélium exposé à la PO₂ postnatale représente 4% de la relaxation maximale versus 80% pour la PGE₂ (Smith & McGrath, 1993). C'est donc probable que l'adénosine joue un rôle mineur dans le maintien de l'ouverture du CA *in utero*.

Le CA exprime des récepteurs β -adrénergiques qui médient la relaxation (Bodach, 1980). L'effet contractile des catécholamines via l'activation des récepteurs α -adrénergiques est contré par leur effet vasodilatateur via les récepteurs β -adrénergiques. Cependant, l'infusion du β -bloqueur propranolol n'a pas d'effet sur l'ouverture du CA d'agneau *in vivo* (Friedman, 1983).

1.8.1.2. La circulation néonatale de transition

Chez le NN, le flot sanguin dans le CA est inversé (de l'aorte vers l'artère pulmonaire principale) en quelques minutes après la naissance (Dawes, 1955; Drayton & Skidmore, 1987) car les gradients de pression dans le CA sont inversés. La pression pulmonaire chute après la ventilation des poumons avec l'air ambiant et la pression aortique augmente après la perte de la circulation ombilico-placentaire à faible résistance (Teitel, 1987). Il a été suggéré que le shunt gauche-droit dans le CA du NN jouait un rôle physiologique important dans l'adaptation après la naissance (Dawes, 1955). L'amplitude de ce "shunt" chez le NN prématuré d'agneau varie directement avec la PO_2 (Clyman, 1987) et la ligature du CA chez le NN à terme diminue la PO_2 (Dawes, 1955). Une amélioration similaire de l'oxygénation peut être démontrée en créant un CA artificiel (avec un "shunt" gauche-droit) chez des animaux adultes (Born, 1955). Par conséquent, l'ouverture physiologique du CA chez le NN à terme qui a un "shunt" gauche-droit améliore la PO_2 artérielle durant la période postnatale immédiate quand les poumons ne sont pas encore parfaitement dilatés (Dawes, 1955; Born, 1955).

1.8.1.3 Fermeture du CA

La fermeture initiale du CA s'effectue par la contraction de l'épaisse paroi musculaire. Chez certaines espèces comme la souris (Tada & Kishimoto, 1990), le rat (Jarkovska, 1992), et le lapin (Momma, 1980), la fermeture du CA est complète dans les premières heures suivant la naissance; chez d'autres espèces comme l'agneau (Dawes, 1955), le cochon d'Inde (Fay & Cooke, 1972), et l'humain (Drayton & Skidmore, 1987), le CA se ferme dans les premiers 1-2 jours après la naissance. Après cette fermeture dite fonctionnelle, le CA subit un remodelage par fibrose et se ferme de façon permanente. C'est la fermeture dite anatomique et un ligament (*ligamentum arteriosum*) subsiste chez l'adulte.

La perte de l'effet vasodilatateur de PGE_2 est un élément central mais partiel de la fermeture du CA chez le nouveau-né (Coceani & Olley, 1988). L'augmentation de la tension d'oxygène est le facteur principal de la stimulation de cette contraction même si le vaisseau est sensible à une grande variété d'agents vasoconstricteurs. La tension d'oxygène et la concentration de PGE_2 constituent deux éléments majeurs qui varient à la naissance et qui agissent en synergie afin de réguler la réponse du CA aux vasoconstricteurs (Smith & McGrath, 1991, 1993). En présence de PO_2 fœtale et de concentrations physiologiques de PGE_2 , le CA est insensible à des concentrations micromolaires de noradrénaline (Smith & McGrath, 1991). La perte de cet important effet synergétique après la naissance lèverait le frein qui inhibe la réactivité du vaisseau aux vasoconstricteurs.

1.8.1.3.1. Contraction induite par l'oxygène

Durant la vie fœtale, le CA est exposé à une PO_2 qui varie entre 18-28 mmHg (Heymann & Rudolph, 1975). Après la naissance, le CA est exposé au sang artériel après l'inversion de la direction du flot sanguin dans le vaisseau (Dawes, 1955). La PO_2 artérielle augmente rapidement à 100 mmHg après la naissance (Heymann & Rudolph, 1975) et provoque une très forte contraction du CA (Kovalcik, 1963; Fay, 1971). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cet effet vasotonique physiologique de l'oxygène sur le CA. Le premier mécanisme implique le cytochrome a_3 comme détecteur d'oxygène dont l'effet serait lié à la quantité d'ATP dans le ML du CA (Fay & Jobsis, 1972). Le second mécanisme stipule le rôle d'un métabolite de la voie enzymatique ou non enzymatique de l'AA différent de PGE_2 et qui serait produit à la naissance suite à un changement dans la cascade métabolique de l'AA. Des études ont démontré que cette théorie était improbable (Coceani, 1979; Coceani, 1982). Le troisième mécanisme propose que le cytochrome P_{450} est le détecteur d'oxygène dont l'activation entraînerait la synthèse d'endothéline dans le ML, ce qui causerait la contraction du CA via les récepteurs ET_A (Coceani, 1992). Un tel mécanisme n'a pas été démontré. Le quatrième mécanisme propose que l'oxygène agit sur plusieurs éléments membranaires. Des études récentes ont démontré que l'augmentation de la PO_2 ferme les canaux K_{ATP} (Roulet & Coburn, 1981; Nakanishi, 1993) et K_{dr} rectificateurs retardés (Tristani-Firouzi, 1996), ce qui provoque la dépolarisation des cellules du ML et la contraction du CA. Les canaux K_V et Ca_L semblent également impliqués (Takizawa, 1994b; Michelakis, 2000). Une voie indépendante de la membrane semble également impliquée dans la contraction du CA (Roulet & Coburn, 1981). Le cinquième mécanisme implique le rôle crucial d'un détecteur de la variation de PO_2 qui a lieu durant la période périnatale. Archer et al. ont démontré que l'oxygène altère la fonction d'un détecteur, la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, et augmente la

production d'un médiateur redox (H_2O_2), ce qui déclenche un système effecteur (inhibition des canaux K_v du ML du CA) et la contraction du CA (Michelakis, 2002). Aucun des modèles ne semble expliquer toutes les données expérimentales observées et il est probable qu'il y a plus d'un détecteur d'oxygène dans le CA.

1.8.1.3.2. Prostaglandines contractiles

L'administration d'une seule dose élevée de $PGF_{2\alpha}$ ($\approx 7 \mu M$) ne cause qu'une modeste contraction du CA bovin exposé à une PO_2 fœtale ou néonatale (Starling & Elliott, 1974). Lorsque PGG_2 ou PGH_2 ont été incubées avec les fractions microsomiales des plaquettes humaines ou des poumons de cochon d'Inde pour générer le TXA_2 , les auteurs ont observé que PGG_2 ou PGH_2 relaxaient le CA probablement en formant la PGE_2 (Coceani, 1978a). Des études ont étudié l'effet d'agonistes synthétiques stables des récepteurs de prostanoïdes qui médient la contraction (Smith & McGrath, 1995). Il a été démontré que le CA fœtal de lapin exprime 2 récepteurs couplés à la contraction: le récepteur TP et le sous-type de récepteur EP_3 . L'agoniste du TP et mimétique du TXA_2 , U46619 contracte le CA (dose $\approx 1 nM$) et a un effet maximal semblable à la noradrénaline et ses effets sont bloqués par un antagoniste du récepteur TP. Le CA se contracte également en présence d'agonistes sélectifs du EP_3 tels le GR63799X et le sulprostone. De plus, le sulprostone (10 nM) diminue la sensibilité du CA à la PGE_2 (Smith & McGrath, 1995). Dans le CA fœtal d'agneau, un nouveau rôle vasodilatateur du récepteur EP_3 a été récemment mis en évidence par notre laboratoire, ce qui suggère l'expression d'un isoforme différent ou le couplage à une voie de signalisation différente du récepteur EP_3 en fonction de l'espèce étudiée (Bouayad, 2001).

1.8.1.3.3. Élimination des PGs vasodilatateurs

1.8.1.3.3.1. PGE₂ circulante

La concentration élevée de PGE₂ circulante diminue de 10-20 fois 1-3 heures après la naissance chez l'agneau à terme (Clyman, 1980b). La perte de l'effet vasodilatateur de PGE₂ est cruciale pour la fermeture du CA (Clyman, 1987). Cette chute importante des niveaux circulants de PGE₂ est due à (a) l'augmentation du débit pulmonaire qui est le site principal du catabolisme de l'hormone (Tsai & Brown, 1987) et à (b) la perte du placenta qui est une source majeure de PGE₂ chez le fœtus (Thorburn, 1992).

1.8.1.3.3.2. PGs locales

L'élimination des effets vasodilatateurs des PGs locales après la naissance est plus complexe et moins bien comprise que celle de la PGE₂ circulante (Clyman, 1987). Paradoxalement, l'augmentation de la PO₂ stimule la libération de PGE₂ par le CA d'agneau (Clyman, 1980a; Coceani, 1986). L'augmentation de la PO₂ inhibe la PGI₂ synthase dans le CA plus que dans l'aorte fœtale de l'agneau (Needleman, 1981) et la diminution de la synthèse de PGI₂ faciliterait la fermeture du CA (Smith & McGrath, 1993, 1994a; Smith, 1994b). De plus, cette inhibition mène à l'accumulation de PGH₂ qui est un agoniste endogène du récepteur TP (Coleman, 1994b), ce qui médie directement la contraction du CA et l'accumulation de PGE₂ serait donc secondaire à celle de son précurseur PGH₂.

La libération de PGE₂ peut faciliter la contraction via les récepteurs EP₃ (Smith & McGrath, 1995) ou provoquer la régulation négative de la densité totale des EP dans le CA de l'agneau où les EP₃ médient la vasodilatation (Bouayad, 2001). L'augmentation de la

PO₂ diminue la sensibilité du CA à l'action vasodilatatrice de PGE₂ et potentialise sa réponse aux vasoconstricteurs (Smith & McGrath, 1991, 1993). L'équilibre entre les effets vasodilatateurs et contractiles de PGE₂ changerait après la naissance avec l'activation augmentée de la voie contractile.

1.8.1.3.4. Vasoconstriction nerveuse

Le CA d'agneau et de cochon d'Inde se contracte après stimulation nerveuse transmurale (Ikeda, 1973; Bodach, 1980) et le CA de plusieurs espèces se contracte en réponse à la noradrénaline exogène (Kovalcik, 1963; Aronson, 1970; Smith & McGrath, 1988). L'effet de la stimulation transmurale et de la noradrénaline exogène sont potentialisés par l'augmentation de PO₂ dans le CA (Ikeda, 1973). L'effet de la stimulation transmurale est bloqué en partie par l'antagonisme des récepteurs α -adrénergiques (Bodach, 1980) tandis que l'administration de l'antagoniste non sélectif α -adrénergique phénoxybenzamine à des femelles enceintes retarde la fermeture du CA des fœtus de cochon d'Inde (Hornblad & Larsson, 1972). Le sous-type de récepteur α -adrénergique qui médie l'effet contractile de la noradrénaline dans le CA n'a pas encore été mis en évidence. Le CA de cochon d'Inde et d'humain se contractent également en réponse à l'acétylcholine (Kovalcik, 1963; McMurphy & Boreus, 1971; Ikeda, 1973) et le CA d'agneau est innervé par des nerfs contenant l'acétylcholine (Silva & Ikeda, 1971). L'atropine inhibe la contraction du CA à l'acétylcholine exogène mais n'a pas d'effet sur la contraction induite par la stimulation nerveuse transmurale dans le CA isolé d'agneau (Bodach, 1980). Le contrôle central de l'activité de ces nerfs vasopresseurs est inconnu. Cependant, la paroi du CA de plusieurs espèces possède des structures similaires aux corps carotidiens et aortiques (Boyd, 1941; Fay, 1971; MacDonald, 1983) ainsi que des fibres afférentes vers le nerf

vague (Boyd, 1941). Aucune information n'est disponible sur ce qui pourrait activer ce système sensoriel mais la présence de voies neurales afférentes et efférentes suggère la possibilité d'une boucle de contrôle dans le CA.

1.8.1.3.5. Autres vasoconstricteurs locaux

L'endothélium et le muscle lisse du CA synthétise de l'endothéline (ET-1) (Coceani & Kelsey, 1991) qui cause une puissante contraction du CA d'agneau (Coceani, 1989). Le monoxyde de carbone inhibe fortement la libération de ET-1 dans le CA dénudé d'endothélium (Coceani & Kelsey, 1991). L'antagoniste du récepteur ET_A, BQ-123, et l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'endothéline, le phosphoramidon, diminuent la contraction du CA induite par l'oxygène (Coceani, 1992). D'autre part, l'infusion dans le CA de l'ET-1 ne contracte pas le CA fœtal d'agneau (Chatfield, 1991) même si la ventilation des poumons fœtaux avec l'oxygène a induit une contraction du CA (Mentzer, 1985). L'augmentation de la PO₂ de 2.5% à 95% n'a pas d'effet sur la synthèse de ET-1 dans le CA intact isolé (Coceani, 1992). De plus, BQ-123 cause une diminution similaire du CA qu'il soit exposé à la PO₂ fœtale ou néonatale (Coceani, 1992). Ce qui précède ne permet pas de déterminer le rôle de l'endothéline dans la contraction du CA induite par l'oxygène. L'adventice du CA de cochon d'Inde contient des mastocytes qui peuvent libérer l'histamine et la 5-hydroxytryptamine (Fay, 1971), tous deux des vasoconstricteurs du CA isolé (Aronson, 1970; McMurphy & Boreus, 1971; Smith & McGrath, 1991). Les facteurs qui contrôlent la dégranulation des mastocytes du CA sont indéterminés. L'infusion de 5-hydroxytryptamine au fœtus d'agneau chroniquement instrumenté n'a pas d'effet sur l'ouverture du CA (Friedman, 1983), ce qui pourrait refléter l'effet

vasodilatateur synergétique important exercé par la PO_2 fœtale et la PGE_2 sur la réponse du CA aux vasoconstricteurs (Smith & McGrath, 1991).

1.8.1.3.6. Tonus myogénique

Des anneaux isolés de CA de cochon d'Inde se contractent à l'étirement (Ikeda, 1973) et à l'augmentation de la pression de perfusion chez le lapin (Kriska, 1990). Le tonus myogénique du CA isolé et perfusé est inhibé par les PGs endogènes et exogènes chez ces deux espèces (Kriska, 1990; Smith, 1997). Cependant, le rôle du tonus myogénique dans le contrôle physiologique du CA reste obscur.

1.8.1.3.7. Vasoconstricteurs circulants

L'angiotensine II n'a pas d'effet sur le diamètre du CA du fœtus d'agneau chroniquement instrumenté (Friedman, 1983). Cependant, l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, énalapril, administré aux fœtus de rats retarde la fermeture du CA et il peut réouvrir le CA fermé quand il est administré à 3 heures de vie postnatale (Takizawa, 1994a). Plusieurs études rapportent la persistance de l'ouverture du CA chez les NN (PDA) à la consommation maternelle des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Même si ces médicaments peuvent traverser la barrière placentaire, la revue de la littérature ne supporte pas une association entre ces deux phénomènes (Hanssens, 1991).

Le CA se contracte en réponse à l'adrénaline via les récepteurs α -adrénergiques, (Kovalcik, 1963) et à la bradykinine (Kovalcik, 1963; Aronson, 1970). Les concentrations de la bradykinine dans le sang ombilical humain sont beaucoup plus élevées que chez l'adulte (Melmon, 1968). Le CA de rat se contracte également en réponse aux hormones stéroïdes telles les corticostéroïdes (Momma, 1981) et la progestérone (Pulkkinen, 1986). Cet effet des stéroïdes est probablement relié à la diminution de la sensibilité du CA à PGE_2 et à PGI_2 (Clyman, 1981). Le mécanisme d'action de la progestérone est indéterminé mais contrairement aux autres corticostéroïdes (Momma & Takao, 1989), elle n'interagit pas avec la voie de l'indométhacine (Pulkkinen, 1986).

En résumé, les principaux facteurs responsables du maintien de l'ouverture du CA *in utero* sont la faible PO_2 , la concentration élevée de PGE_2 circulante et la production locale de PGE_2 et PGI_2 . La tension d'oxygène fœtale maintient le potentiel membranaire des cellules musculaires lisses dans un état hyperpolarisé, ce qui inhibe l'entrée du calcium extracellulaire. Les PGs libérés localement et en circulation agissent via les récepteurs EP_{2-4} et les IP couplées aux protéines G afin de maintenir des concentrations importantes d'AMPC qui diminue grandement la sensibilité des protéines contractiles du CA au calcium. Les effets combinés de ces 2 voies rendent le CA presque totalement insensible à toute stimulation contractile même massive comme celle due à des concentrations micromolaires de noradrénaline. Après la naissance, la tension d'oxygène augmente et dépolarise le ML du CA en fermant les canaux potassiques rectificateurs retardés, ce qui entraîne une entrée de calcium extracellulaire par les canaux Ca_L . De plus, les concentrations de PGE_2 diminuent grandement en quelques heures seulement après la

naissance; les niveaux d'AMPc dans le ML diminuent également, ce qui lève l'inhibition de la réponse des protéines contractiles au calcium. Cette réponse est soit élevée de façon intrinsèque soit stimulée par la PO₂ élevée en postnatal. L'ensemble de ces changements aboutit directement à la contraction du CA, à la diminution de la sensibilité aux vasodilatateurs et à une augmentation de la sensibilité aux vasoconstricteurs. La contraction du CA stimule ensuite le remodelage du vaisseau qui rend la fermeture irréversible.

1.8.1.4 Thérapies nouvelles potentielles

1.8.1.4.1. Persistance de l'ouverture du canal artériel (PDA)

La persistance de l'ouverture du CA après la naissance est une complication fréquente de la prématurité dont le traitement initial, la ligature chirurgicale, présentait beaucoup d'inconvénients. Des études sur le CA des agneaux (Coceani, 1975) et des rats (Sharpe, 1974) ont permis l'utilisation de l'inhibiteur non sélectif des COX, l'indométhacine, comme traitement pharmacologique de cette condition chez l'humain (Gersony, 1986; Hammerman, 1995). Cependant, l'administration d'indométhacine entraîne des effets secondaires majeurs tels la dysfonction rénale et l'hémorragie gastro-intestinale, ce qui ouvre la voie au développement de médicaments plus sélectifs.

1.8.1.4.1.1. Antagoniste du récepteur EP₄. En supposant que les récepteurs EP dans le CA humain sont semblables à ceux du lapin, l'antagoniste du récepteur EP₄ constituerait un traitement plus efficace et moins toxique du PDA que l'indométhacine (Smith, 1994). Le récepteur EP₄ est exprimé dans plusieurs tissus tels le cœur, les poumons, le thymus et les reins (Honda, 1993; Bastien, 1994; Nishigaki, 1995). Le CA, comme beaucoup de tissus,

contient une population mixte de récepteurs EP qui médient des effets opposés (Coleman, 1990). Par conséquent l'hypothèse portant sur les effets secondaires diminués de l'antagoniste du EP₄ est improbable.

1.8.1.4.1.2. Inhibiteur spécifique des isoformes de COX. Des données de notre laboratoire ont permis d'établir que COX-2 est l'isoforme majeur dans le CA de NN (Guerguerian, 1998) d'où l'intérêt d'utiliser des inhibiteurs sélectifs de COX-2 pour le traitement de PDA. Cependant, il a été démontré que les enfants souffrant de PDA avaient un taux de PGE₂ circulante plus élevé que la normale (Lucas & Mitchell, 1978). Une étude préliminaire a démontré que DuP697, un inhibiteur de COX-2 sélectif modéré, n'a aucun effet sur la concentration de PGE₂ circulante ni sur l'ouverture du CA chez le NN d'agneau tandis que l'indométhacine diminue la PGE₂ circulante et induit la fermeture du CA, ce qui impliquerait l'utilisation des inhibiteurs sélectifs de COX-1 pour la fermeture de CA dans les cas de PDA.

1.8.1.4.1.3. Bloqueurs de canaux potassiques. Divers bloqueurs de canaux potassiques ont été décrits (Kuriyama, 1995) et leur utilisation est envisageable pour le traitement de PDA étant donné le rôle des canaux potassiques rectificateurs retardés dans la contraction du CA induite par l'oxygène (Tristani-Firouzi, 1996). Cependant, la fermeture médicamenteuse du CA ne s'effectue que chez les NN prématurés (Gersony, 1986). Puisque la contraction induite par l'O₂ est peu développée chez l'animal préterme, l'utilisation de cette voie pour fermer le CA serait une stratégie moins avisée que l'inhibition des puissants systèmes dilatateurs du CA fœtal.

1.8.1.4.2. Circulation systémique canal-dépendante

Le terme "circulation CA-dépendante" s'applique à une variété de maladies congénitales (Fig. 1.10) qui nécessitent le maintien de l'ouverture du CA après la naissance pour assurer la survie (Freed, 1981; Gersony, 1986). Le CA joue 3 rôles: (a) maintenir un débit pulmonaire adéquat (atrésie pulmonaire); (b) maintenir un débit sanguin systémique adéquat (anomalies de la crosse aortique); et (c) améliorer le mélange des circulations systémique et pulmonaire (transposition des gros vaisseaux). PGE₁/PGE₂ sont utilisés en clinique pour maintenir artificiellement le CA ouvert jusqu'à la chirurgie. Les PGEs ne sont pas efficaces quand le CA est complètement fermé et leur efficacité est plus élevée quand le CA est à un niveau minimal de contraction (Clyman, 1983). L'administration intraveineuse de PGE₁ entraîne des effets secondaires majeurs tels l'arrêt cardiaque, l'apnée, les convulsions, l'hypotension et la fièvre (Gersony, 1986).

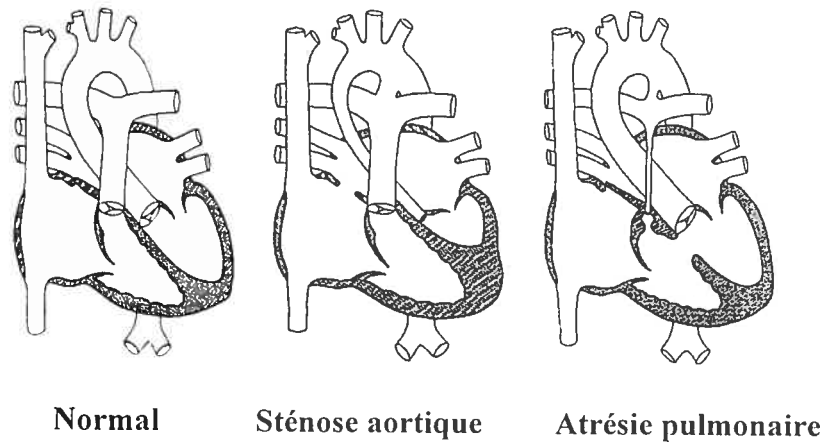


Figure 1.10. Rôle des prostaglandines de type E et contrôle du tonus du canal artériel dans des situations physiologiques (normal) et pathologiques (sténose aortique et atrésie pulmonaire) à la naissance.

1.8.1.4.2.1. Agoniste du récepteur EP₄. En supposant que les récepteurs EP dans le CA humain sont semblables à ceux du lapin, un agoniste sélectif du récepteur EP₄ constituerait un traitement plus efficace et moins toxique que les PGEs pour maintenir le CA ouvert (Smith, 1994) puisqu'il n'agirait pas sur les EP₁, EP₂, or EP₃ qui sont présents de façon ubiquitaire (Coleman, 1990; Abramovitz, 1995). Le récepteur EP₄ est exprimé dans plusieurs tissus (Honda, 1993; Bastien, 1994; Nishigaki, 1995) qui possèdent des populations mixtes de récepteurs EP (Coleman, 1990), ce qui suggère la probabilité d'effets secondaires.

1.8.1.4.2.2. Activeurs des canaux potassiques. Le potentiel membranaire est crucial pour le contrôle de la fermeture du CA. Les agents qui agissent sur les canaux potassiques sont de bons candidats de thérapie dans les maladies où la circulation est CA-dépendante. En absence d'indométhacine, le CA est plus sensible que les autres vaisseaux sanguins à l'activateur des canaux K_{ATP} cromakaline (Smith & McGrath, 1994). Aucune étude sur l'effet de ces drogues dans la fermeture du CA n'a été effectuée à ce jour.

1.8.1.4.2.3. Donneurs d'oxyde nitrique. Les donneurs de NO[•] sont de puissants vasodilatateurs du CA fœtal *in vivo* (Walsh, 1988) et du CA isolé *in vitro* (Walsh & Mentzer, 1987) en absence d'indométhacine. Cependant, on devrait comparer l'efficacité à maintenir l'ouverture du CA et les effets secondaires de ces agents par rapport à la PGE₂ chez le NN.

1.8.1.4.2.4. Antagoniste du récepteur ET_A. Coceani et al. ont proposé un modèle de l'action de ET-1 via le récepteur ET_A dans la contraction du CA induite par l'O₂ (Coceani, 1992) mais aucune étude n'a été effectuée sur l'effet des antagonistes de ce récepteur dans le CA. Cependant, les récepteurs ET_A jouent un rôle ubiquitaire dans le maintien de l'homéostasie cardiaque (Masaki, 1994), ce qui limite l'efficacité clinique éventuelle de leurs antagonistes sur le tonus du CA.

1.8.1.5 Conclusions

A- Plusieurs facteurs-clé agissent en synergie pour dilater les cellules musculaires lisses du CA *in utero* tels (1) la PGE₂ locale et circulante qui agit via les récepteurs EP_{2,4} qui sont couplés positivement à l'AC, ce qui produit de l'AMPc qui diminue la sensibilité des protéines contractiles au calcium (et qui peut altérer [Ca²⁺]_i) et (2) les récepteurs EP₃ qui sont couplés aux canaux K_{ATP} ainsi que la tension fœtale d'oxygène qui gardent les canaux potassiques ouverts, ce qui hyperpolarise la membrane et inhibe l'entrée de calcium extracellulaire. Ces facteurs potentialisent l'effet vasodilatateur de plusieurs systèmes comme celui du NO.

B- À la naissance, l'augmentation de la tension d'oxygène ferme les canaux potassiques rectificateurs et dépolarise la membrane, ce qui permet l'entrée du calcium dans les cellules ML par les canaux Ca_L. La sensibilité des protéines contractiles est élevée (de façon intrinsèque ou stimulée par la PO₂ augmentée) et l'inhibition de cette sensibilité au calcium par la PGE₂ est perdue. La combinaison de l'entrée de calcium extracellulaire et de l'augmentation de la sensibilité des protéines contractiles au calcium entraîne une contraction très intense, une insensibilité aux vasodilatateurs restants et une sensibilité accrue aux vasoconstricteurs.

C- PGE₂ exogène maintient l'ouverture du CA chez le NN et les inhibiteurs de COX ferment le CA fœtal et néonatal. Il y a un potentiel évident pour le développement de médicaments très sélectifs dans le but de contrôler le diamètre du CA chez le NN humain malade et particulièrement des agonistes ou antagonistes sélectifs du récepteur EP₂₋₄ et/ou des médicaments qui régulent l'activité des canaux potassiques.

D- Des inhibiteurs sélectifs de COX-2 devraient permettre une thérapie anti-PG chez la mère sans fermeture du CA fœtal *in utero*.

1.9 Rationnelles de recherche

Comme nous venons de le voir, le contrôle du diamètre du CA a une grande importance clinique. La contraction et la fermeture *in utero* du CA, accompagnée ou non d'insuffisance cardiaque, est un effet secondaire reconnu de l'administration maternelle des inhibiteurs des cyclooxygénases (COX) (Van den Veyver & Moise, 1993) tandis que la persistance de l'ouverture du CA après la naissance est une complication fréquente de la naissance prématurée. Inversement, la survie de nouveaux-nés à terme qui souffrent de certaines cardiopathies congénitales (Fig. 1.10) dépend du maintien de l'ouverture du CA après la naissance (Gersony, 1986). Par conséquent, la compréhension du rôle des PGs dans le contrôle du tonus du CA mène directement au développement de thérapies en clinique.

1.10 Hypothèses de recherche

Les prostaglandines, surtout la PGE₂, joue un rôle primordial dans le maintien de l'ouverture du CA fœtal (Clyman, 1978; Coceani, 1978). Cependant, la réactivité de ce vaisseau à la PGE₂ est significativement diminuée après la naissance, ce qui facilite la fermeture du CA (Clyman, 1983; Abrams, 1995). Les mécanismes de cette diminution de réponse à la PGE₂ restent méconnus. Quatre sous-types de récepteurs couplés aux protéines G qui médient les effets de la PGE₂ ont été identifiés et clônés EP₁, EP₂, EP₃, et EP₄ (Coleman, 1994), mais les sous-types de récepteurs EP impliqués dans le CA demeurent non identifiés. Nous avons postulé que **des modifications du type et/ou de la densité des récepteurs EP en fonction de l'âge pourraient contribuer à la diminution de réponse du CA du nouveau-né (NN) à la PGE₂**. Cette hypothèse semble justifiée par les résultats d'une étude préliminaire effectuée sur le fœtus (F) proche-terme et le NN de porcelet (Bhattacharya, 1999). Afin de confirmer nos observations et d'élucider le mécanisme, nous avons entrepris une étude similaire chez l'agneau (Bouayad, 2001).

Par ailleurs, une autre façon de contrôler le tonus du CA serait de déterminer les facteurs qui entraînent une importante augmentation des niveaux de PGE₂ observés durant la période périnatale. Une induction ontogénique de la cyclooxygénase inducible (COX-2) est connue mais ne constitue pas une explication suffisante. C'est pour cette raison que nous stipulons **un rôle de la forme inductible de la synthase spécifique de PGE₂, la PGES membranaire (PGESm)**. L'ensemble de ces résultats peut contribuer à développer de nouveaux traitements pour contrôler le tonus vasculaire du CA.

1.11 Modèles expérimentaux

Dans la première partie de cette thèse qui traite des récepteurs EP de la PGE₂, le suivi des effets des ligands des récepteurs EP sur le tonus du CA a été fait par échocardiographie Doppler. Les brebis (120-140 jours de gestation) ont été anesthésiées avec de la kétamine en alternance avec du diazépame puis une césarienne a été effectuée pour sortir le fœtus. L'agneau est un bon modèle expérimental puisque les premières études sur le CA durant les années 1970 ont démontré que la circulation fœtale et la physiologie cardiaque de l'agneau sont similaires à celles des fœtus humains (Rudolph & Heymann, 1968; Kaplan & Rudolph, 1969; McMurphy, 1972). Le fœtus demeure relié à la mère par le placenta et la circulation fœtale est maintenue en plaçant la tête du fœtus dans un gant rempli de salin. La température du fœtus est maintenue à 38.5°C par des lampes chauffantes pendant toute la durée de l'expérience. Un cathéter a été placé dans l'artère fémorale pour mesurer la pression artérielle moyenne tandis qu'un cathéter placé dans la veine jugulaire a servi à l'injection des drogues testées. Les gaz sanguins artériels ont été mesurés avant et après l'injection de chaque drogue. L'image du CA a été obtenue grâce à une vue parasternale gauche (second espace intercostal). Le CA a été préalablement précontracté jusqu'à 50% avec l'indométhacine et la réponse au sulprostone (agoniste EP₃) a été déterminée en mesurant le plus petit diamètre du vaisseau sur une représentation en deux dimensions de l'échocardiogramme avant et chaque 5-10 minutes après l'injection des drogues.

Dans la seconde partie de la thèse qui traite des PGE₂ synthases dans le CA, les vaisseaux ont été prélevés chez des fœtus (100-105 jours de gestation; terme = 114 jours) et des nouveau-nés de porcelets à terme sacrifiés dans les 3 premières heures qui suivent leur

naissance par voie vaginale avec une injection intracardiaque de pentobarbital et sous anesthésie avec l'halothane. Les tissus ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à ce que les tests biochimiques aient été effectués. Toutes les études animales ont été approuvées par le comité d'éthique du centre de recherche de l'Hôpital Ste-Justine. Les substances et les réactifs utilisés ainsi que la description détaillée des procédures chirurgicales, les méthodes de dosages biochimiques et les analyses statistiques sont décrites dans les chapitres suivants.

1.12 Objectifs expérimentaux

1) Élucider la nature et la densité totale des sous-types des récepteurs EP de la PGE_2 dans le canal artériel durant la période périnatale, chez le fœtus proche-terme et le nouveau-né d'agneau afin de mettre en évidence le potentiel thérapeutique de ces récepteurs en clinique quant au contrôle du tonus du CA. Pour ce faire, nous avons eu recours à des études de liaison de radioligand (saturation et déplacement), de dosage radioimmunologique de messenger secondaire et de vasomotricité *ex vivo* et *in vivo* (Bouayad, 2001).

2) L'étude précédente a clairement démontré que tous les récepteurs EP présents dans le CA du foetus proche-terme ont un effet vasodilatateur. Cibler l'ensemble de ces récepteurs afin de fermer le CA serait une approche complexe qui causerait des effets secondaires importants. Nous avons donc cherché à contrôler les enzymes responsables de la synthèse de la PGE_2 (PGES et COX) dans le CA juste avant la naissance. Pour ce faire, nous avons procédé à des immunobuvardages de type Western, à des dosages

radioimmunologiques et à des études de vasomotricité en chambre d'organes (Bouayad, 2003).

CHAPITRE 2

CARACTÉRISATION DES RÉCEPTEURS DE PGE₂ DANS LE CANAL ARTÉRIEL FŒTAL ET NÉONATAL DE L'AGNEAU

(CHARACTERIZATION OF PGE₂ RECEPTORS IN FETAL AND NEWBORN LAMB
DUCTUS ARTERIOSUS)

Bouayad A, Kajino H, Waleh N, Fouron JC, Andelfinger G, Varma DR, Skoll A, Vazquez A, Gobeil F Jr, Clyman RI, Chemtob S. **Characterization of PGE₂ receptors in fetal and newborn lamb ductus arteriosus.** *Am J Physiol* 280(5):H2342-9, 2001.

Résumé

Nous avons démontré l'année précédente que chez le porcelet, le CA du nouveau-né exprime moins de récepteurs EP que celui du fœtus, ce qui peut contribuer à la diminution de la réactivité du CA à la PGE₂ chez le nouveau-né. Par ailleurs, les effets de la PGE₂ sur le CA du nouveau-né semblent être médiés par les récepteurs EP₂ uniquement. On pourrait alors suggérer l'utilisation d'un agoniste sélectif des EP₂ afin de maintenir pharmacologiquement un CA ouvert chez des enfants qui souffrent de certaines malformations cardiaques congénitales à circulation systémique-canal artériel dépendante. Mais avant de passer à l'application humaine, il faudrait s'assurer de l'impact des variations inter-espèces sur la nature et le nombre des récepteurs EP du canal artériel. C'est pour cette raison que l'on s'est proposé de caractériser les récepteurs EP chez le fœtus proche - terme et le nouveau-né d'un autre mammifère: l'agneau afin de le comparer aux résultats préalablement obtenus chez le porcelet.

Nous avons déterminé les sous-types des récepteurs EP par saturation des sites de liaison avec la [³H]PGE₂ et par inhibition compétitive de la liaison de la PGE₂ sur des membranes isolées de CA chez le fœtus (F) (75-90% de gestation) et le nouveau-né (NN) (âge < 1 jour) de porcelet. Nous avons étudié les effets de la stimulation des récepteurs EP sur la production d'AMPC *in vitro* ainsi que sur le diamètre du CA du F *ex-vivo* et *in vivo*.

La densité totale des récepteurs EP est 3 fois plus élevée chez le fœtus que chez le nouveau-né d'agneau (B_{max} = 21 vs 8 fmole/mg protéines). Cette diminution est sélective puisque les sous-types de récepteurs EP_{2,3,4} de la PGE₂, mais non EP₁, sont exprimés dans le CA fœtal; tandis que seul EP₂ existe -en quantité similaire à celle du F- dans le CA du

NN. Par ailleurs, la production d'AMPC induite par des ligands spécifiques à chacun des récepteurs EP a démontré que les EP₂ et EP₄ sont couplés à une protéine Gs tandis que les EP₃ sont couplés à une Gi/Go dans le CA du fœtus de brebis. *In vivo*, le sulprostone (agoniste EP₃) a causé une dilatation du CA pré contracté avec l'indométacine (inhibiteur de la cyclooxygénase, enzyme responsable de la synthèse des prostaglandines). Cette dilatation du CA médiée par les EP₃ est inhibée *-ex-vivo-* par le glibenclamide, inhibiteur des canaux potassiques-ATP sensibles.

Chez l'agneau, l'ouverture du CA *in utero* est médiée par 3 sous-types de récepteurs EP de PGE₂: les EP₂ et EP₄ qui sont AMPC-dépendants (couplés à la stimulation de l'adénylate cyclase via la protéine Gs) et les EP₃ qui semblent être couplés aux canaux K_{ATP} sensibles via une Gi ou une Go. De plus, le CA du nouveau-né exprime 3 fois moins de récepteurs EP que celui du fœtus en fin de gestation et les effets de la PGE₂ sur le CA du nouveau-né semblent être médiés par les récepteurs EP₂ uniquement, ce qui reproduit exactement ce qui a été observé chez le porcelet. Ceci suggère que la variation ontogénique des récepteurs EP du CA est conservée chez plusieurs espèces de mammifères développés. Par conséquent, le potentiel thérapeutique d'un agoniste sélectif des EP₂, qui maintiendrait ouvert le CA chez des enfants dont la circulation systémique est dépendante de ce vaisseau, se trouve alors confirmé.

**Characterization of PGE₂ receptors
in fetal and newborn lamb ductus arteriosus**

Asmàa Bouayad, M.Sc.,^{1*} Hiroki Kajino, M.D.,^{3*} Nahid Waleh, Ph.D.,³ Jean-Claude Fouron, M.D.,¹ Gregor Andelfinger, M.D.,¹ Daya R Varma, M.D., Ph.D.,² Amanda Skoll, M.D.,¹ Anne-Marie Guerguerian, M.D.,¹ Alejandro Vazquez, Ph.D.,¹ Fernand Gobeil Jr, Ph.D.,¹ Ronald I. Clyman, M.D.,³ and Sylvain Chemtob, M.D., Ph.D.^{1,2}

* Both authors have equally contributed to the submitted work.

¹Departments of Cardiology, Pediatrics, and Physiology, Université de Montréal, Quebec H3T 1C5; ²Departments of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Quebec H3G 1Y6;

³Cardiovascular Research Institute and Department of Pediatrics, University of California San Francisco, San Francisco, CA 94143. Study was supported by grants from Medical Research Council of Canada, Heart & Stroke Foundation of Quebec and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, and from U.S. Public Health Service, NIH, NHLBI HL46691 and HL56061.

Short title: A novel role for EP₃ receptors.

Correspondence author: Sylvain Chemtob, M.D., Ph.D., FRCP(C)

Research Center, Ste-Justine Hospital

3175 Côte Ste-Catherine

Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5

Tel: (514) 345-4692

Fax: (514) 345-4801

Email: [REDACTED]

Abstract

Although the role of prostaglandin E₂ (PGE₂) in maintaining ductus arteriosus (DA) patency is well-established, the specific PGE₂ receptor subtype(s) (EP) involved have not been clearly identified. We used late gestation fetal and neonatal lambs to study developmental regulation of EP receptors. In the fetal DA radioligand binding and RT-PCR assays failed to detect EP₁ but detected EP₂, EP_{3D}, and EP₄ receptors in equivalent proportions; in the newborn DA B_{max} was 1/3 of that found in the fetus and only EP₂ was detected. Stimulation of EP₂ and EP₄ increased cAMP formation and was associated with DA relaxation. Though stimulation of EP₃ inhibited cAMP formation, it surprisingly relaxed the fetal DA both *in vitro* and *in vivo*. This EP₃-induced relaxation was specifically diminished by the K_{ATP} channel blocker glybenclamide. In conclusion, PGE₂ dilates the late gestation fetal DA through pathways that involve either cAMP (EP₂, EP₄) or K_{ATP} channels (EP₃). The loss of EP₃ and EP₄ receptors in the newborn DA is consistent with its decreased responsiveness to PGE₂.

Keywords: ductus arteriosus, EP receptors, PGE₂, K_{ATP} channels.

Introduction

The ductus arteriosus (DA) performs two major functions: to remain patent during fetal life and to close rapidly after birth in order to separate the pulmonary and systemic circulations (18). Prostaglandins, in particular PGE₂, play a major role in maintaining the patency of the fetal DA (11, 13, 14). The relaxant effects of PGE₂ have been attributed to its ability to increase intracellular cAMP concentrations (16, 36). Immediately after birth, the DA's response to PGE₂ is markedly reduced (2, 10), thereby promoting DA closure. The mechanisms for this decreased responsiveness to PGE₂ are not well understood.

PGE₂ exerts its effects through a diverse group of receptors classified as EP₁, EP₂, EP₃ and EP₄ (15). Although pharmacological evidence suggests that EP₄ may be the main functional PGE₂ receptor in fetal rabbit DA (33), genetic disruption of this receptor does not induce DA closure in either fetal or newborn mice (29). Thus at present the types of PGE₂ receptors that govern DA tone are uncertain. We have recently found that the DA of the fetal pig expresses three EP receptor subtypes that would appear to have different effects on ductus contractile tone: we identified 2 cAMP stimulating EP receptors (EP₂ and EP₄) and one cAMP inhibiting receptor (EP₃) (5); in contrast, we detected only EP₂ in the newborn pig (5). However, it remains to be explained how loss of a cAMP inhibiting (EP₃) and a cAMP stimulating (EP₄) EP receptor can result in decreased responsiveness of the newborn DA to PGE₂.

We therefore proceeded to determine the developmental profile of EP receptor expression in another species, ovine, and to examine the effects of EP receptor stimulation on DA signaling events and contractile responses. Our findings reveal that the fetal lamb expresses, in equal proportions, the same three EP receptor subtypes detected in the fetal pig (5); similarly, EP₂ is the only EP receptor identified by binding studies in the newborn ovine DA. Although stimulation of cAMP-generating EP₂ and EP₄ receptors resulted in the expected

DA relaxation, surprisingly stimulation of cAMP-inhibiting EP₃ receptors also produced relaxation; this effect was mediated via a previously undescribed cAMP-independent pathway for EP₃ involving activation of K_{ATP} channels. The loss of a relaxant EP₃ receptor in the newborn DA is consistent with decreased responsiveness of the DA to PGE₂ in the immediate neonatal period.

Materials and Methods

Materials

AH6809, AH23848B and GR63799X were generously provided by Dr Simon Lister (Glaxo-Wellcome, UK), butaprost by Dr Harold Kluender (Bayer), M&B28767 by Dr Jean Hough (Rhone-Poulenc Rorer, UK) and the PGI₂ analog (cicaprost) by Dr Fiona McDonald (Schering AG, Berlin). 16,16-dimethyl PGE₂ and carbaprostacyclin were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) and [³H]PGE₂ (165 Ci/mmol) from Amersham Pharmacia, Biotech (Mississauga, ON); all other chemicals were from Sigma Chemical (St Louis, MO).

Tissue collection

Pregnant ewes were anesthetized with ketamine-diazepam and fetal lambs (mixed Western breed) were delivered by caesarian section at 135±3 days gestation (range: 125-140 days; term: 145 days). The fetus was given ketamine (30 mg/kg iv) before exsanguination to obtain DA; the same procedure was used to obtain DA from the newborn (<8 h after birth). Vessels were frozen immediately after removal with liquid N₂ and stored at -80°C. These procedures were approved by the Committee on Animal Research at the University of California, San Francisco.

Radioligand binding assays

[³H]PGE₂ binding and displacement studies were performed as described previously (5, 21). Briefly, aliquots of DA membranes (100 - 200 µg protein) were incubated at 37°C for 30 min in 100 µl of 10 mM PBS buffer (pH 7.4) containing soybean trypsin inhibitor (1 mg/mL) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 5%). [³H]PGE₂ was added in the absence

or presence of increasing doses of a nonselective EP agonist (16,16-dimethyl PGE₂), an EP₁ antagonist (AH6809), an EP₂ agonist (butaprost), an EP₃ agonist (M&B28767) and an EP₄ antagonist (AH23848B). Receptor density (B_{max}) and IC₅₀ was determined using the computer program PRISM (GraphPad, CA).

cAMP measurements

DA homogenates (100 µg protein) were incubated at 37°C for 10 min in an assay mixture (100 µL) containing in mM: 10 Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 ATP, 7.5 MgCl₂, 15 creatine phosphate, 185 U/mL creatine phosphokinase, 200 µg/mL aspirin, 0.5 EGTA, 0.5 IBMX, 1 dithiothreitol, 1 benzamidine, 0.1 PMSF, and 100 µg/mL soybean trypsin inhibitor (5, 21). The reaction was terminated with 200 µL of acidic ethanol. After centrifugation, cAMP was measured by radioimmunoassay (Diagnostic Products).

Isometric tension *in vitro*

The DA was divided into 1 mm-thick rings that were placed in separate 10-ml organ baths in a darkroom as previously described (11, 12). The rings were suspended between two stainless steel hooks at 38°C in a modified Krebs buffer (pH 7.4) of the following composition (mM): 118 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 0.9 MgSO₄, 1 KH₂PO₄, 11.1 glucose, 23 NaHCO₃ (pH 7.4); the buffer was equilibrated with 5% CO₂, 30% O₂ and 65% N₂. In some rings the luminal endothelium was removed by scraping the surface with a fine wire as previously described (12). The bath solution was changed every 20 min. Isometric tension was measured by Grass FTO3C force transducers (Quincy, MA). The tissues were equilibrated with 30% O₂, 65% N₂ and 5% CO₂ until the tension reached a plateau (approximately 100-120 min). Indomethacin (5.6 µM) was then added to the bath solution, and the rings were allowed to reach a new

steady-state tension over the next 60-90 min. The NO synthase inhibitor, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (0.1 mM), was then added. The rings were exposed to indomethacin and L-NAME for the remainder of the study protocol. *Maximal contraction* was determined from the response to 100 mM KCl.

Sensitivity of the DA to relaxing agents was determined from vessels precontracted with indomethacin and L-NAME (*Precontraction Tension*). Cumulative dose-response curves were constructed for PGE₂, butaprost, M&B28767 and GR63799X (also an EP₃ agonist), cicaprost and carbaprostacyclin (PGI₂ analogs), as well as cAMP stimulants and mimetics (forskolin, and 8-bromo-cAMP). EC₅₀ values (concentration which produces 50% of maximal response) were determined from each dose-response curve. In some experiments, a cumulative dose-response curve was performed to a relaxing agent after the tissue had been equilibrated with either an EP₄ receptor antagonist (AH23848B), or one of the following K⁺ channel inhibitors (4-aminopyridine (4AP)), iberiotoxin, or glybenclamide) (28). In all experiments, we allowed the tension in the rings to reach a new steady-state plateau after a drug addition before another concentration or experimental agent was added to the bath. After the addition of all pro-relaxant drugs, sodium nitroprusside (0.1 mM) was added to each ring to determine its *minimal tension*. The difference in tensions between the *maximal contraction* and *minimal tension* was considered the *maximal active tension* (20 ± 3 g, n = 120). The difference in tensions between the *precontraction tension* (with indomethacin and L-NAME) and the *minimal tension* (with sodium nitroprusside) was considered the net tension (15 ± 3 g, n = 120). The tension was expressed as either the absolute force (g) or a percentage of either the net tension or the *maximal active tension*. Tissues were removed from the baths after the experiments and wet weights recorded.

Effects of different agents on DA tone *in vivo*

Pregnant ewes (120-140 days of gestation) were anesthetized with ketamine (30 mg/Kg, iv). A caesarian section was performed and the fetus with intact placental circulation was exteriorized and its head submerged in warm saline to prevent breathing. Body temperature was maintained at 38.5°C by an overhead lamp. The femoral artery was cannulated for blood pressure recording using a pressure transducer (Gould., Valley View, OH) and the jugular vein was cannulated for administration of drugs. Arterial blood gas was measured with an ABL300 blood gas analyzer (Radiometer, Copenhagen) before and after each drug infusion.

Doppler echocardiography of DA: Echocardiographic Doppler studies were performed with an Acuson 128 XP/10c real-time ultrasonographic imaging system that used 7.5- and 5-MHZ transducers in combination with range-gated Doppler as previously described (6). The Doppler signals were filtered by a 100-Hz high-pass filter. The DA was visualized through a left parasternal approach (second intercostal space), and the angulation of the transducer was such that the ultrasonographic beam was always parallel to or within 20 degrees of the orientation of the blood flow. The DA was precontracted with indomethacin (0.75 mg/kg) to <50% of the original diameter. Vasorelaxant responses to sulprostone (EP₃ agonist) were determined by measuring the smallest diameter of the vessel on a two-dimensional representation of the echocardiogram before and every 5-10 minutes after the drug injections; each measurement of the DA diameter was repeated twice and expressed in mm.

Preparation of total RNA, reverse transcription and polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from fetal DA tissue using the QIAGEN RNeasy mini kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. 3 µg of total

RNA was reverse transcribed with 100 units of Moloney murine leukemia virus Rnase H reverse transcriptase (Life Technologies, Inc.) in the presence of random hexanucleotide primers as described elsewhere (30, 38). The cDNAs were used for the amplification of specific fragments of EP₂, EP₃ and EP₄ receptors by PCR following standard procedures (30, 38). To amplify a fragment comprising the transmembrane domain I and the second intracellular loop of the EP₂ receptor, the forward primer 5'-ATCTTGGGGTGGTGGGCAA-3' and the reverse primer 5'-CGCTTGCCACGTAGTGGCT-3' were used. To amplify an EP₃ receptor fragment comprising the transmembrane domains IV and V, the forward 5'-GTGCTCGCCTTCGCCCTGTT-3 and reverse 5'-GCCTTGGCCCTGCAGCGGGA-3' primers were used. To amplify C-termini of the EP_{3A,B,C} isoforms, the forward primer 5'-ATAATGATGTTGAAAATGAT-3' was used in combination with the reverse primers R3 5'-CTACTGATGCTCAAGTGTATG-3' and R4 5'-GCCCCCTTCCTCTCCTTGCTT-3'. Primer R5 5'-ATTCATTGGATAGTGAGATAGTC-3' was used to amplify the EP_{3D} C-terminal. The forward and reverse primers used to amplify the EP₄ receptor were 5'-AAGTCGCGCAAGGAGCAGAA-3' and 5'-CTTGTCCACGTAGTGGCTGT-3', respectively. The PCR products were subcloned into the pPCR-Script Amp SK(+) plasmid (Stratagene, La Jolla, CA) and sequenced using an ABI prism 310 Genetic Analyzer sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical analysis

Data were analyzed by Student's *t* test and by two-way ANOVA factoring for time or concentration and treatment; for comparisons among means Bonferroni correction was used. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data were expressed as means \pm SEM.

Results

Competitive displacement of [³H]PGE₂ in the fetal DA

EP₂, EP₃ and EP₄ receptor ligands caused comparable displacement of specifically bound [³H]PGE₂ from fetal DA membrane preparations; the EP₁ receptor antagonist AH6809 was virtually ineffective (Fig. 1A, 1B, Table 1).

Effects of different agents on cAMP production in the fetal DA

Both the nonselective EP receptor agonist 16,16-dimethyl PGE₂ and the selective EP₂ receptor agonist butaprost increased cAMP production in the fetal lamb DA (Table 2). In contrast, the selective EP₃ receptor agonist GR63799X had no effect on cAMP production by itself but inhibited forskolin-stimulated cAMP production (Table 2). In the absence of currently available EP₄ agonists, the role of EP₄ was tested using the EP₄ antagonist AH23848B in the presence of 16,16-dimethyl PGE₂; AH23848B alone did not alter cAMP production but decreased 16,16-dimethyl PGE₂-induced stimulation of cAMP formation (Table 2), which suggests that stimulation of EP₄ receptors accounts for some of the increased cAMP production induced by the nonselective EP receptor agonist.

Effects of different agents on fetal DA tension *in vitro*

The fetal DA contracted spontaneously ($77 \pm 8\%$ of *maximal active tension*) following addition of indomethacin and L-NAME in the presence of 30% oxygen. As anticipated, agents that either stimulated (forskolin) or elevated (8-Br-cAMP) intracellular cAMP relaxed the constricted fetal DA (Fig. 2E, 2F). Similarly, stimulation of EP receptors that increase cAMP also relaxed the DA; both the nonselective EP agonist PGE₂ and the selective EP₂ agonist butaprost modestly relaxed the DA (Fig. 2B), and inhibition of the EP₄ receptor with AH23848B shifted PGE₂ curve dose-response to the right (Fig. 2C, Table 3). PGE₂ was >1000

fold more potent than the PGI₂ analogs cicaprost and carbaprostacyclin (Fig. 2A, Table 3). In contrast, although EP₃ stimulation decreased cAMP production (Table 2), activation of EP₃ receptors with M&B28767 or GR63799X caused >70% relaxation of the fetal DA (Fig. 2D).

Effects of PGE₂ analogs on the diameter of the fetal DA *in vivo*

We also tested the effects of EP₃ stimulation on DA tone *in vivo*. Infusion of the EP₃ receptor agonist sulprostone reversed the indomethacin-induced contraction of the fetal DA *in vivo* (Fig. 3) consistent with our *in vitro* results (Fig. 2D); a similar effect was seen with 16,16-dimethyl PGE₂ (data not shown).

Role of K⁺ channels on EP receptor-induced fetal DA relaxation

Since EP₃ receptor stimulation caused DA relaxation, despite reducing cAMP generation, we examined whether EP receptor stimulation might relax the DA through other signaling pathways. K⁺ channels have previously been shown to play a role in ductus arteriosus tone (25, 34). We performed PGE₂ dose response curves in the presence and absence of specific K⁺ channel inhibitors. The relaxant effects of PGE₂ were not affected by the K_v and K_{Ca}-channel blockers, 4-aminopyridine and iberiotoxin, respectively (Table 3). However, the K_{ATP} channel blocker glybenclamide significantly inhibited the relaxation caused by the EP₃ agonist M&B28767. Removal of luminal endothelial cells neither altered the PGE₂ or M&B28767 induced relaxation of the DA nor did it modify the inhibitory effects of glybenclamide on PGE₂ and M&B28767 induced relaxation (data not shown). Glybenclamide did not affect relaxation caused by agonists that increase cAMP (butaprost, forskolin, and 8-Br-cAMP) (Table 3).

Detection of EP receptor subtypes and isoforms in the fetal DA by PCR

We amplified an EP₃ receptor fragment from the ovine DA that encompassed transmembrane domains IV and V of the receptor; its sequence was 100% homologous with the corresponding bovine sequence (26). Hence, we designed oligonucleotide primers based on the bovine sequence to identify which of the different EP₃ receptor carboxy-terminal isoforms might be present in the fetal DA (26). Only the EP_{3D} isoform fragment was successfully amplified from the ovine fetal DA. The PCR product was identical to the bovine EP_{3D} sequence (26).

Using EP₂-specific primers, we amplified an EP₂ receptor fragment from the ovine fetal DA that had 90, 87 and 85% homology with the corresponding sequences from the human, mouse and rat EP₂ receptor, respectively (4, 19, 31). Using EP₄ specific primers, we also amplified an EP₄ fragment, which was virtually identical to the reported ovine EP₄ receptor sequence (GenBank accession AF035418) and had 94% homology with the corresponding sequence of the human EP₄ receptor (24). The presence of EP₂, EP_{3D} and EP₄ receptor mRNAs in the fetal ovine DA is consistent with our displacement binding data (Fig. 1 and Table 1).

Competitive displacement of [³H]PGE₂: comparison between the fetal and newborn DA

In contrast with the fetus, the EP₂ receptor agonist butaprost was capable of displacing virtually all of the [³H]PGE₂ from newborn (< 8h old) DA membranes (Fig. 1C, 1D, Table 1); EP₁, EP₃ and EP₄ receptors were essentially undetectable. The calculated B_{max} for the EP₂ receptor in the newborn was the same as that calculated for the EP₂ receptor in the fetus (Fig. 1B, 1D).

Acknowledgments

Authors thank Mrs. Hendrika Fernandez, Manon Lessard, Marie-Thérèse Rabeau, and Francoise Mauray for their expert technical assistance. This study was supported by the Medical Research Council of Canada and the National Institutes of Health.

Reference List

1. **Abramovitz, M, Adam, MA, Boie, Y, Carrière, MC, Denis, D, Godbout, C, Lamontagne, S, Rochette, C, Sawyer, N, Tremblay, NM, Belley, M, Gallant, M, Dufresne, C, Gareau, Y, Ruel, R, Juteau, H, Labelle, M, Ouimet, N, and Metters, KM.** The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochem. Biophys. Acta* 1483: 285-293. 2000.
2. **Abrams, SE, Walsh, KP, Cohen, SJ, and Clarckson, MJ.** Responses of post-mortem arterial duct to oxygen, prostaglandin E₂, and nitric oxide donor, 3-morpholinosyadenosine, in lambs and their clinical implications. *Brit. Heart J.* 73: 177-181. 1995.
3. **Armstead, WM.** Role of nitric oxide and cAMP in prostaglandin-induced pial arterial vasodilation. *Am. J. Physiol.* 268(4 Pt 2): H1436-H1440. 1995.
4. **Bastien, L, Sawyer, N, Grygorczk, R, Metters, KM, and Adam, MA.** Cloning, functional expression and characterization of the human prostaglandin E₂ receptor EP₂ subtype. *J. Biol. Chem.* 269: 11873-11877, 1994.
5. **Bhattacharya, M, Asselin, P, Hardy, P, Guerguerian, AM, Shichi, H, Hou, X, Varma, DR, Bouayad, A, Fouron, JC, Clyman, RI, and Chemtob, S.** Developmental changes in prostaglandin E₂ receptor subtypes in porcine ductus arteriosus. *Circulation* 100: 1751-1756, 1999.

6. **Bonnin, P, Fouron, JC, Teyssier, G, Sonesson, SE, and Skoll, A.** Quantitative assessment of circulatory changes in the fetal aortic isthmus during progressive increase of resistance to umbilical blood flow. *Circulation* 88(1): 216-222, 1993.
7. **Bouchard, JF, Dumont, E, and Lamontagne, D.** Evidence that prostaglandins I₂, E₂, and D₂ may activate ATP sensitive channels in the isolated rat heart. *Cardiovasc. Res.* 28(6): 901-905, 1994.
8. **Carrier, GO, Fuchs, LC, Winecoff, AP, Giulumian AD, and White, RE.** Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K⁺ channels. *Am. J. Physiol.* 273(1 Pt 2): H76-H84, 1997.
9. **Chen, J, Champa-Rodriguez, ML, and Woodward, DF.** Identification of a prostanoid FP receptor population producing endothelium-dependent vasorelaxation in the rabbit jugular vein. *Br. J. Pharmacol.* 116(7): 3035-3041. 1995.
10. **Clyman, RI, Mauray, F, Roman, C, Heymann, MA, and Payne, B.** Factors determining the loss of ductus arteriosus responsiveness to Prostaglandin E₂. *Circulation* 18: 433-436, 1983.
11. **Clyman, RI, Mauray, F, Roman, C, and Rudolph, AM.** PGE₂ is a more potent dilator of the lamb ductus arteriosus than either PGI₂ or 6-keto-PGF_{1α}. *Prostaglandins* 16: 259-264, 1978.

12. **Clyman, RI, Waleh, N, Black, SM, Riemer, RK, Mauray, F, and Chen, YK.** Regulation of ductus arteriosus patency by nitric oxide in fetal lambs. *Pediatr. Res.* 43: 633-644, 1998.
13. **Cocconi, F, Bodach, E, White, E, Bishai, I, and Olley, PM.** Prostaglandin I₂ is less relaxant than prostaglandin E₂ on the lamb ductus arteriosus. *Prostaglandins* 15: 551-556. 1978.
14. **Cocconi, F and Olley, PM.** The control of cardiovascular shunts in the fetal and the perinatal period. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66: 1129-1134, 1987.
15. **Coleman, RA, Smith, WL, and Narumiya, S.** International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution and structure of receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46: 205-229, 1994
16. **Crichton, CA, Smith, GCS, and Bouth, GL.** Alpha toxin permeabilized rabbit fetal ductus arteriosus is more sensitive to Ca²⁺ than aorta or main pulmonary artery. *Cardiovasc. Res.* 33: 223-229. 1997.
17. **HAMPL, V, Huang, JM, Weir, EK, and Archer, SL.** Activation of the cGMP-dependent protein kinase mimics the stimulatory effect of nitric oxide and cGMP on calcium-gated potassium channels. *Physiol. Res.* 44(1): 39-44. 1995.
18. **Heymann, MA and Rudolph, AM.** Control of the ductus arteriosus. *Physiol. Rev.* 55: 62-78, 1975.

19. **Honda, A, Sugimoto, Y, Namba, T, Watabe, A, Irie, A, Negishi, M, Narumiya, S, and Ichikawa, A.** Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₂ subtype. *J. Biol. Chem.* 268: 7759-7762, 1993
20. **Kotani, M, Tanaka, I, Ogawa, Y, Usui, T, Mori, K, Ichikawa, A, Narumiya, S, Yoshimi, T, and Nakao, K.** Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP₃ subtype generated by alternative messenger RNA splicing: multiple second messenger systems and tissue-specific distributions. *Mol. Pharmacol.* 48(5): 869-879, 1995.
21. **Li, DY, Varma, DR, Chatterjee, TK, Fernandez, H, Abran, D, and Chemtob, S.** Fewer PGE₂ and PGF_{2α} receptors in brain synaptosomes of newborn than of adult pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267: 1292-1297. 1993.
22. **Liu, F, Wan, Q, Pristupa, ZB, Yu, XM, Wang, YT, and Niznik, HB.** Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D₅ and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* 403(6767): 274-280, 2000.
23. **Marceau, F, Larrivee, JF, Saint-Jacques, E, and Bachvarov, DR.** The kinin B₁ receptor: an inducible G protein coupled receptor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75(6): 725-730, 1997.
24. **Mori, K, Tanaka, I, Kotani, M, Miyaoka, F, Sando, T, Muro, S, Sasaki, Y, Nakagawa, O, Ogawa, Y, Usui, T, Ozaki, S, Ichikawa, A, Narumiya, S, and Nakao, K.** Gene expression of the human prostaglandin E receptor EP₄ subtype:

- differential regulation in monocytoid and lymphoid lineage cells by phorbol ester. *J. Mol. Med.* 74: 333-336, 1996.
25. **Nakanishi, T, Gu, H, Hagiwara, N, Momma, K.** Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit. *Circ. Res.* 72(6): 1218-1228, 1993.
 26. **Namba, T, Sugimoto, Y, Negishi, M, Irie, A, Ushikubi, F, Kakizuka, A, Ito, S, Ichikawa, A, and Narumiya, S.** Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP₃ determines G-protein specificity. *Nature* 365: 166-170, 1993.
 27. **Narumiya, S, Sugimoto, Y, and Ushikubi, F.** Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79(4): 193-226, 1999.
 28. **Nelson, MT and Quayle, JM.** Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268 (*Cell Physiol.* 37): C799-C822, 1995.
 29. **Nguyen, MT, Camenisch, T, Snouwaert, JH, Hicks, E, Coffman, TM, Anderson, PAW, Malouf, NN, and Koller, BH.** The prostaglandin receptor EP₄ triggers remodeling of cardiovascular system at birth. *Nature* 390: 78-81, 1997.
 30. **Olszewski, NE, Gast, RT, and Ausubel, FM.** A dual-labeling method for identifying differentially expressed genes: use in the identification of cDNA clones that hybridize

to RNAs whose abundance in tomato flowers is potentially regulated by giberellins. *Gene* 77(1): 155-162, 1989.

31. **Sando, T, Usui, T, Tanaka, I, Mori, K, Sasaki, Y, Fukuda, Y, Namba, T, Sugimoto, Y, Ichikawa, A, Narumiya, S, and Nakao, K.** Molecular cloning and expression of rat prostaglandin E receptor EP₂ subtype. *Cell Mol. Biol. Res.* 200: 1329-1333, 1994.
32. **Simonson, MS and Dunn, MJ.** Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J.* 4(12): 2989-3000, 1990.
33. **Smith, GC, Coleman, RA, and McGrath, JC.** Characterization of dilator prostanoid receptors in fetal rabbit ductus arteriosus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271: 390-396, 1994.
34. **Tristani-Firouzi, M, Reeve, HL, Tolarova, S, Weir, EK, and Archer, SL.** Oxygen-induced constriction of rabbit ductus arteriosus occurs via inhibition of a 4-aminopyridine-, voltage-sensitive potassium channel. *J. Clin. Invest.* 98(9): 1959-1965, 1996.
35. **von der Weid, PY.** ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle cells of guinea-pig mesenteric lymphatics: role in nitric oxide and beta-adrenoceptor agonist-induced hyperpolarizations. *Br. J. Pharmacol.* 125(1): 17-22, 1998.

36. **Walsh, RS, and Mentzer, RM.** Role of cyclic nucleotides in relaxation of fetal lamb ductus arteriosus. *Surgery* 102: 313-318, 1987.

37. **Wellman, GC, Quayle, JM, and Standen, NB.** ATP-sensitive K⁺ channel activation by calcitonin-gene related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *J. Physiol.* 507(Pt 1): 117-129, 1998.

38. **Ziober, BL, Chen, YQ, Ramos, DM, Waleh, N, and Kramer, RH.** Expression of the alpha7beta1 laminin receptor suppresses melanoma growth and metastatic potential. *Cell Growth Differ.* 10(7): 479-490, 1999.

Table 1. *Competitive inhibition of [³H]PGE₂ binding to ductus arteriosus membranes from fetal and newborn lambs by different agents.*

Competing agents	Fetus		Newborn	
	% Inhibition*	IC ₅₀ (nM)	% Inhibition*	IC ₅₀ (nM)
16,16-DMPGE ₂	100 ± 10	4.3 ± 2.7	96 ± 4	6 ± 4
AH6809	4 ± 1	ND	5 ± 5	ND
Butaprost	26 ± 5	1608 ± 248	95 ± 5	3020 ± 830
M&B28767	38 ± 4	1.4 ± 0.1	0	ND
AH23848B	37 ± 2	3340 ± 1307	0	ND

* Refers to percent inhibition of bound [³H]PGE₂.

[³H]PGE₂ was 10 nM and 8.6 nM for the fetus and the newborn, respectively.

Values are means ± SEM of 3-4 experiments; 16,16-DMPGE₂: 16,16-dimethyl PGE₂;

ND: not determined because percent inhibition of [³H]PGE₂ binding is too low for accurate determinations.

Table 2. Net cAMP synthesis by ductus arteriosus from near-term fetal lamb.

Agents	Net cAMP synthesis (pmol/mg protein/min)
16,16-DM PGE ₂ (1 μM)	2.54 ± 0.46
Butaprost (1 μM)	1.56 ± 0.28*
GR63799X (0.5 μM)	0.31 ± 0.14
Forskolin (0.1 μM)	25.61 ± 1.01
Forskolin (0.1 μM) + GR63799X	20.77 ± 0.14†
AH23848B (10 μM)	0.60 ± 0.23*
16,16-DM PGE ₂ (1 μM) + AH23848B (10 μM)	1.31 ± 0.05*

Ductus homogenates (100 μg) were incubated with indicated agents for 10 minutes at 37°C. Net cAMP synthesis was corrected for basal (unstimulated) synthesis of cAMP which was 3.82 ± 0.7 pmol/mg protein/min. Data are means ± SEM of 3 experiments. 16,16-DMPGE₂: 16,16-dimethylPGE₂. * $p < 0.05$ vs 16,16-DMPGE₂, † $p < 0.05$ vs forskolin alone.

Table 3. *Effects of K⁺ channel blockade on EC₅₀ of ductus arteriosus relaxation induced by EP receptor stimulation and cAMP elevating agents.*

Agents	EC ₅₀ (nM)
PGE ₂	0.4 ± 0.1
Cicaprost	700 ± 61*
Carbaprostacyclin	1200 ± 122*
PGE ₂ + AH23848B (25 μM)	1.2 ± 0.5*
PGE ₂ + AH23848B (50 μM)	3.4 ± 1.3*
PGE ₂ + 4-aminopyridine (3 mM)	0.5 ± 0.1
PGE ₂ + iberiotoxine (50 nM)	0.3 ± 0.2
PGE ₂ + glybenclamide (10 μM)	2.8 ± 0.6*
M&B28767	90 ± 18
M&B28767 + glybenclamide (10 μM)	321 ± 64†
Forskoline	370 ± 89
Forskoline + glybenclamide (10 μM)	400 ± 63
Butaprost	4400 ± 267
Butaprost + glybenclamide (10 μM)	4700 ± 334
8-Br-cAMP	3.7 ± 4.1 × 10 ⁵
8-Br-cAMP + glybenclamide (10 μM)	4.3 ± 4.1 × 10 ⁵

Values are means ± SEM of 3-11 experiments. **p*<0.05 vs PGE₂. †*p*<0.05 vs M&B28767.

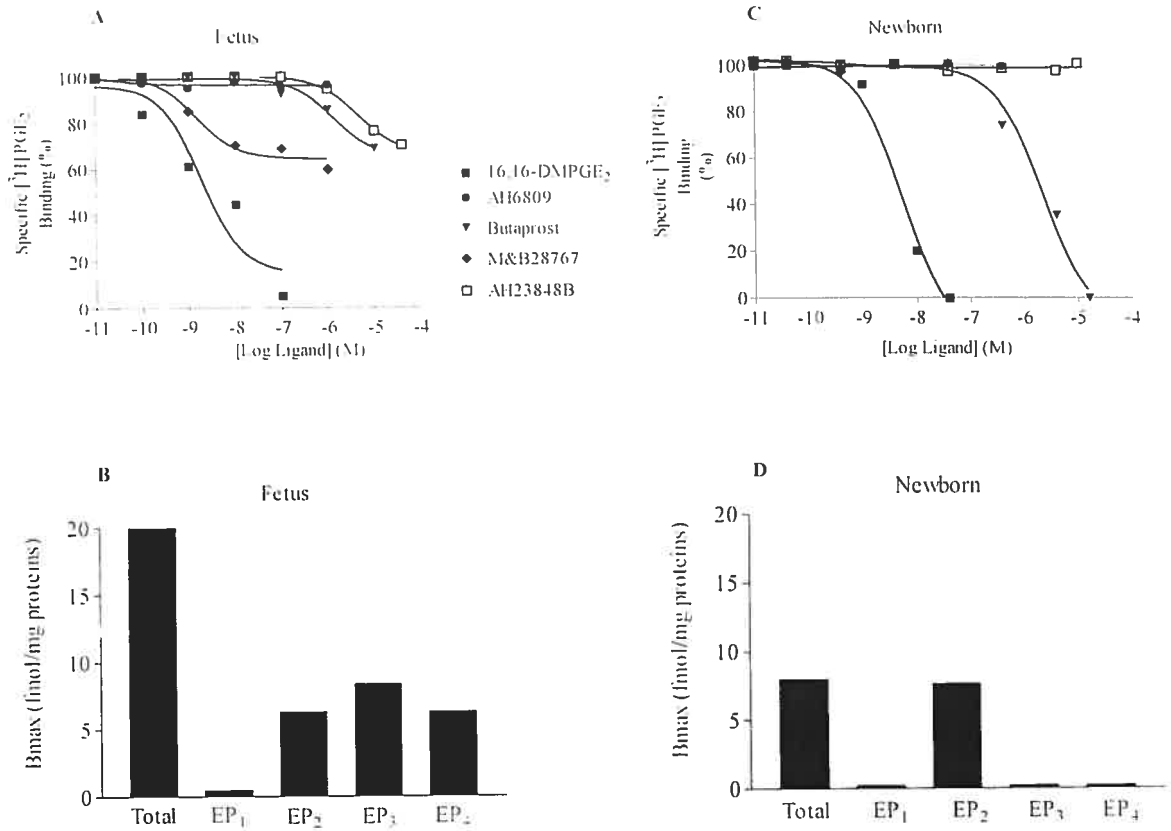


Figure 2.1. Representative displacement curves of specifically bound [³H]PGE₂ from lamb ductus arteriosus membrane preparations from fetal (A, B) and newborn (C, D) lambs. Estimated Bmax (receptor density) (B and D) was calculated as total maximum binding x the proportion of displacement by indicated EP ligands; values are mean ± SEM of 3-4 experiments. DMPGE₂, 16,16-dimethyl PGE₂ (nonselective EP receptor agonist); AH6809 (EP₁ selective antagonist); butaprost (EP₂ selective agonist); M&B 28767 (EP₃ selective agonist); AH23848B (EP₄ antagonist).

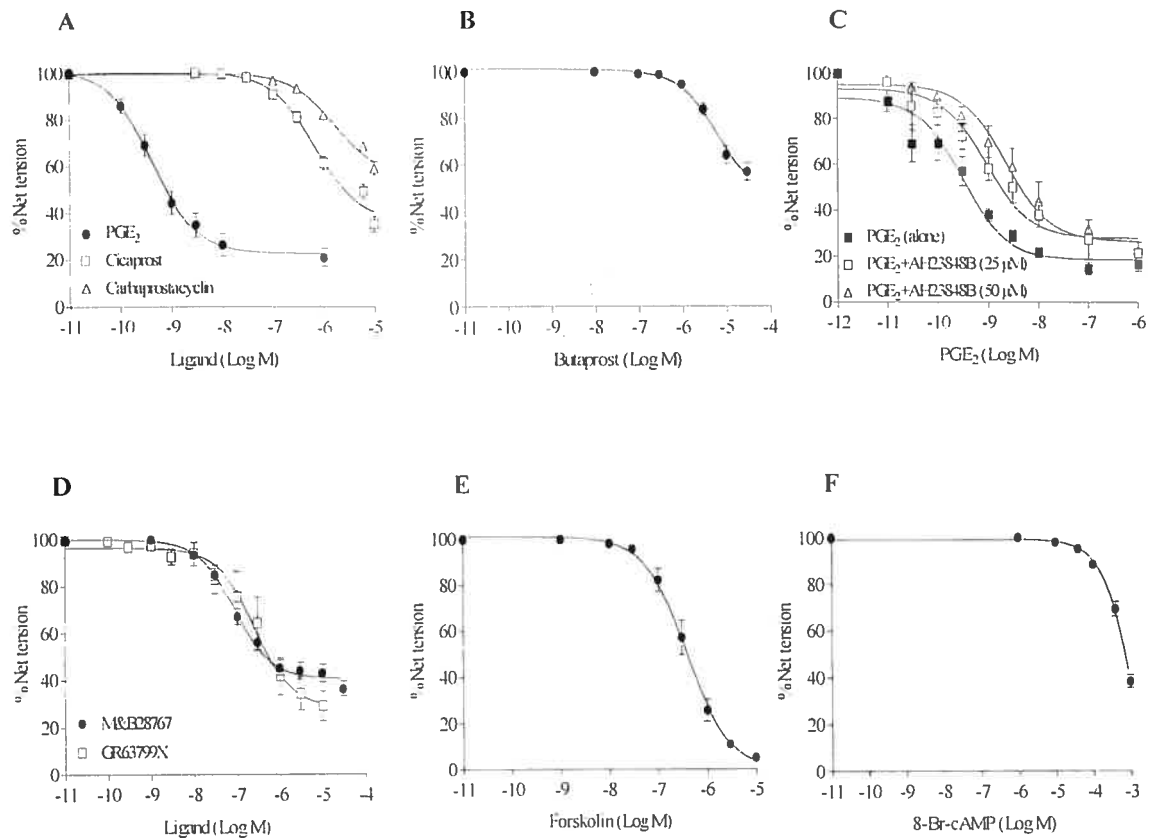


Figure 2.2. Vasomotor response of fetal ductus to prostaglandins, prostaglandin analogs, and cAMP-elevating agents. DA rings were precontracted with 30% oxygen + indomethacin (5.6 μ M) + L-NAME (0.1 mM). Dose-response to indicated compounds was determined. Values are mean \pm SEM of 3-11 experiments.

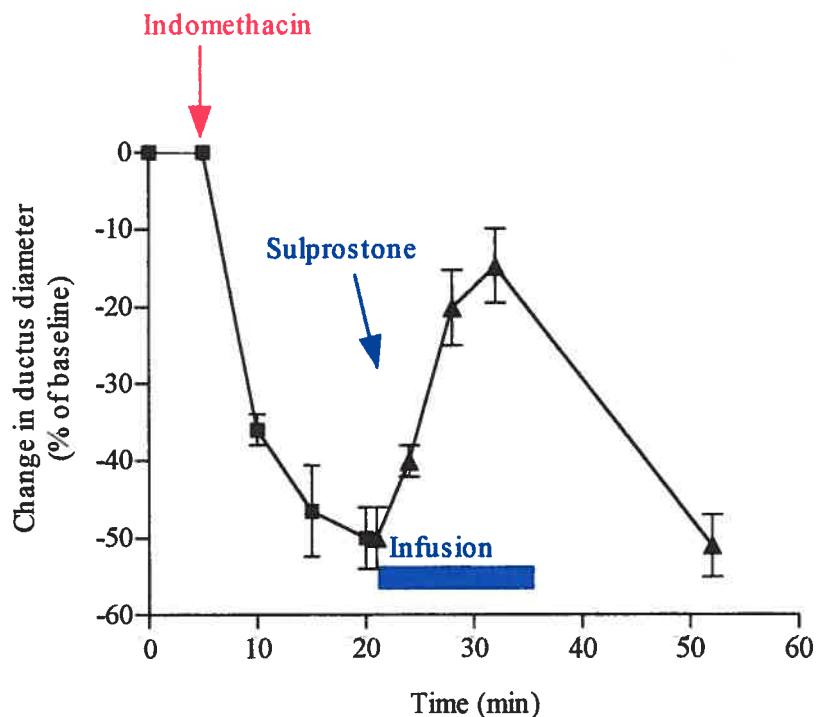


Figure 2.3. Effects of EP₃ agonist sulprostone on percent change in DA diameter of fetal lambs. Animal preparation is described in Methods. DA was precontracted with indomethacin (0.75 mg/kg iv) and once its diameter was <50% of the original diameter, sulprostone (0.083 μ g/kg/min iv) was infused (indicated by shaded area along the abscissa). DA diameter was measured by echocardiogram. Values are mean \pm SEM of 3 experiments. * $p < 0.05$ compared to pre-sulprostone infusion.

CHAPITRE 3

RÉGULATION ONTOGÉNIQUE DE LA SYNTHÈSE DE LA PROSTAGLANDINE (PG) E₂ DANS LE CANAL ARTÉRIEL DE PORCELET

(DEVELOPMENTAL REGULATION OF PROSTAGLANDIN (PG) E₂ SYNTHESIS IN
THE PIG DUCTUS ARTERIOSUS)

Bouayad A, Fouron J-C, Hou X, Peri KP, Clyman RI and Chemtob S. **Developmental regulation of prostaglandin (PG) E₂ synthesis in the pig ductus arteriosus.** *Am J Physiol* 2003, en préparation.

Résumé

La synthèse de PGE₂, qui est le plus important vasodilatateur du canal artériel (CA), est catalysée par les PGE₂ synthases (PGES). Les facteurs impliqués dans l'augmentation périnatale de la synthèse de PGE₂ dans le CA ne sont pas connus. Nous avons étudié l'ontogénie des formes cytosolique et microsomiale de PGES (PGESc et PGESm) ainsi que celle de la cyclooxygénase (COX)-2 et de PLA2 dans le CA du fœtus et du nouveau-né (NN) de porcelet. L'expression protéique de PGESm et de COX-2 ainsi que les niveaux de PGE₂ étaient ≈7 fois plus élevés dans le CA du NN par rapport à celui du fœtus (75-90% gestation), tandis que cette augmentation était ≤2 fois dans l'aorte descendante et l'artère pulmonaire principale. L'expression de PGESc et de PLA2c ne semblait pas différer entre le fœtus et le NN. Étant donné que le facteur d'activation plaquettaire (PAF) peut réguler l'expression de COX-2, sa concentration a été mesurée dans le CA. Les niveaux de PAF sont plus élevés dans le CA du NN par rapport à celui du fœtus. PAF (6 h) déclenche une augmentation dose-dépendante de l'expression de PGESm et de celle de COX-2 ainsi qu'une augmentation de la concentration de PGE₂ dans le CA fœtal vers des valeurs proches de celles du NN. L'expression de PGESc, de PLA2c et de COX-1 dans le CA n'était pas affectée par PAF. PAF a également provoqué une contraction du CA fœtal qui était prolongée après traitement avec l'inhibiteur de l'activité de PGESm, le MK-886. Le traitement prolongé (6 h) de CA de NN avec des antagonistes du récepteur de PAF (BN52021 et THG315) a entraîné une profonde diminution de l'expression de PGESm et de COX-2 ainsi que celle des niveaux de PGE₂ tandis que le tonus vasculaire du CA a augmenté. Par conséquent, nous pouvons conclure que PAF contribue à la régulation du tonus vasculaire du CA en régulant l'expression de PGESm, de COX-2 et les niveaux de PGE₂ qui lui sont associés.

Developmental regulation of prostaglandin E₂ synthase in pig ductus arteriosus

ASMÀA BOUAYAD¹, JEAN-CLAUDE FOURON¹, XIN HOU¹, MARTIN BEAUCHAMP¹, CHRISTIANE QUINIOU¹, DANIEL ABRAN², KRISHNA PERI², RONALD I. CLYMAN³, DAYA R. VARMA⁴, SYLVAIN CHEMTOB^{1,4}

¹*Departments of Pediatrics and Pharmacology, Ste-Justine Hospital Research Center, Université de Montréal, QC H3T 1C5, Canada;* ²*Theratechnologies Inc, Montreal, H4S 2A4, Canada;* ³*Pediatrics, Cardiovascular Research Institute, UCSF, CA 94143;* ⁴*Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Qc H3G 1Y6.*

Short title: PGE₂ Synthase

Correspondence: Sylvain Chemtob, M.D., Ph.D., FRCP(C)
Research Center, Ste-Justine Hospital
3175 Côte Ste-Catherine
Montreal, QC, H3T 1C5
Tel: (514) 345-4921. ext 2978; Fax: (514) 345-4801
Email: [REDACTED]

Bouayad A, Fouron J-C, Hou X, Beauchamp M, Qiniou C, Abran D, Peri K, Clyman RI and Chemtob S. The synthesis of PGE₂, the most important vasodilator of the ductus arteriosus (DA), is catalyzed by PGE₂ synthases (PGES). The factors implicated in increased PGE₂ synthesis in the perinatal DA are not known. We studied the ontogeny of both microsomal and cytosolic PGES (respectively, mPGES and cPGES) along with that of cyclooxygenase (COX)-2 and cPLA₂ in the DA of fetus and newborn (NB) pigs. mPGES and COX-2 protein expression as well as PGE₂ levels were approximately 7-fold higher in the DA of the immediately postnatal NB than of the fetus at 75-90% gestation, while in the aorta and pulmonary artery the expression of mPGES and COX-2 and the levels of PGE₂ were only ≤ 2 -fold higher in the NB; immunoreactivity to cPGES and cPLA₂ did not differ between fetus and NB. Because platelet activating factor (PAF) could regulate COX-2 expression, the former was measured in DA; PAF levels were greater in DA of the NB than of the fetus. PAF (6 h) elicited a dose-dependent increase in mPGES and COX-2 expression as well as a rise in PGE₂ concentrations in DA of the fetus towards higher values seen in the NB; cPGES, cPLA₂ and COX-1 expressions in DA were not affected by PAF. Also, PAF induced contraction of fetal DA, which was sustained after treatment with putative mPGES inhibitor MK-886, but not otherwise. Concordantly, in NB DA PAF receptor antagonists, BN52021 and especially THG315 (6 h), markedly reduced the higher mPGES and COX-2 expression as well as the PGE₂ concentrations, and increased DA contractile tone; acutely (1 h) BN52021 and THG315 did not alter these parameters. It is concluded that PAF contributes in regulating DA tone by governing mPGES, COX-2 and ensuing PGE₂ levels in the perinate.

Keywords: PGE₂ synthase, platelet activating factor, cyclooxygenase 2, cytosolic PLA₂, ductus arteriosus.

PROSTAGLANDIN E₂ (PGE₂) is the most important vasodilator of the ductus arteriosus (DA) (Clyman 1978; Coceani 1978). Cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) causes the release of arachidonic acid, which is converted into PGH₂ by cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2; PGH₂ is then converted to PGE₂ by PGE₂ synthases (PGES). Two glutathione-dependent PGES isoforms have been recently identified (Jakobsson, 1999; Tanioka, 2000; Murakami, 2000). The constitutive PGES, cPGES, is a 26-kDa cytosolic protein (Tanioka, 2000) that is abundantly expressed in many tissues and cell lines (Tanioka, 2000). The inducible isoform, mPGES (also termed mPGES-1), is a 16-kDa microsomal protein that can be expressed and regulated in a cell type-specific manner (Jakobsson, 1999; Murakami, 2000). It is highly inducible by pro-inflammatory factors and believed to be coupled principally to COX-2 (Tanioka, 2000; Murakami, 2000; Ueno, 2001; Han, 2002).

PGE₂ levels increase in the circulation and numerous tissues at the onset of parturition, peak soon before birth (Jones, 1993) and then decline rapidly after birth (Mitchell, 1978; Jones, 1993; Li, 1995; Li, 1996). The factors responsible for changes in PGE₂ levels in the perinate have not been clearly identified. COX-2 is developmentally regulated (Slater, 1994; Slater, 1999; Peri, 1995; Guerguerian, 1998), but does not explain the relatively selective increase in PGE₂ during the perinatal period (Abram, 1995; Jones, 1993). On the other hand, specific ontogenic changes in PGES isoforms may clarify this developmental process. In this regard, specific regulation of PGE₂ formation would constitute a novel and more selective approach to controlling DA tone.

Platelet-activating factor (PAF) is a potent pro-inflammatory cytokine which induces COX-2 expression (Bazan, 1997; Marrache, 2002). PAF production appears increased in the perinate (Ibe, 1998; Ibe, 2001). Based on the evidence presented PAF may

contribute in regulating expression of COX-2 and coupled mPGES as well as PGE₂ levels, in DA; but this remains to be determined. We therefore investigated the developmental changes in mPGES and COX-2 expression in the DA of the pig, and the possible role of PAF in their regulation. Our findings reveal a developmental increase in mPGES expression along with that of COX-2 in the DA, which is regulated at least in part by PAF and impacts on DA tone.

Material and methods:

Animals. Fetal pigs at approximately 75-90% gestation (term, 114 days) and newborn piglets within 2 h of vaginal birth were used. Animals were anesthetized with halothane and killed with pentobarbital (120 mg/kg, intracardiac). Tissues were rinsed in ice cold Krebs buffer (pH 7.4) of the following composition (mM): NaCl 120, KCl 4.5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.0, NaHCO₃ 27, KH₂PO₄ 1.0, and glucose 10 and then frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until assayed.

Western blot analysis. Frozen tissue was homogenized with lysis buffer consisting of 10 mM Tris · HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.02% ASA, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, and 100 µg/ml trypsin inhibitor and centrifuged twice for 15 min at 1000g at 4°C. Immunoblots were performed as described (Peri, 1995; Marrache, 2002). Equal amounts of supernatant (30-40 µg protein/lane) in SDS-containing sample buffer were boiled for 5 min (Laemmli, 1970) and proteins were resolved by 15% and 8% SDS-PAGE for c/mPGES and COX-2/cPLA2, respectively, and related to control β-actin. The proteins were electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Towbin, 1979). The filters were blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline (TBS) (10 mM Tris·HCl, pH 7.4/100 mM NaCl) containing 0.1% (vol/vol) Tween 20 (0.1% T-TBS) and 5% (wt/vol) nonfat dried milk. The membrane was subsequently incubated overnight at 4°C in 0.1% T-TBS with 5% (wt/vol) nonfat dried milk with the corresponding IgG primary antibodies: polyclonal rabbit anti-human mPGES (1:500) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), monoclonal anti-mouse cPGES (1:500) (gift from Dr. David Toft, Mayo Clinic, Rochester, MI), polyclonal rabbit anti-mouse COX-2 (1:250) (Biomol Research, Philadelphia, PA), polyclonal rabbit anti-human cPLA2 (1:500) (Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz,

CA), polyclonal anti-human β -actin (Abcam Ltd, Cambridge, UK). After washing, secondary horseradish peroxidase-linked anti-rabbit antibodies (1:2,500; Pierce, Rockford, IL) were applied for 1 h at 25°C. Detection of signal was enhanced using chemiluminescence (PerkinElmer, Boston, MA), and the resulting bands analyzed densitometrically. Positive control for mPGES was ram seminal vesicle microsomes (5 mg/ml) from Oxford Biomedical research (Oxford, MI), while positive control for cPGES was purified human protein over-expressed in mouse cells hybridized with cancerous cells provided by D.O. Toft (Mayo Graduate School, Rochester, MI).

PAF assay. DA homogenates were prepared in 10% dimethyldichlorosilane siliconised glass tubes as previously described (Beauchamp, 2002). PAF extraction was conducted on octadecylsilyl silica columns (Nishida & Markey, 1996) and quantified with the scintillation proximity assay (SPA) commercial kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) (Hart, 1979). Cross-reactivity of the antibody for other structurally related lipids was less than 0.06% (lyso-PAF <0.01%) and interassay variability less than 5%.

PGE₂ assay. PGE₂ was measured by radioimmunoassay as described previously (Abran, 1994; Hardy, 1994; Guerguerian, 1998).

Vasomotor responses of DA. Isometric tension of DA was determined as described (Bouayad, 2001; Kajino, 2000). DA was cut into 2 mm rings, and suspended between two stainless steel wires at initial tension of \approx 2g in 20 ml tissue baths containing Krebs buffer aerated with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. Isometric tension was recorded using force transducers (Kent Scientific Corporation, CT). Preparations were allowed to equilibrate until the tension became stable before test agents were added. Time-dependent response to

C-PAF (1 μM) in the absence and the presence of putative mPGES inhibitor MK-886 (10 μM) (Mancini, 2001) was determined over a 6 h period.

Statistical analysis. Ontogenic variation of mPGES, COX-2, cPLA2 and cPGES protein expression was assessed by unpaired Student's *t* test; while effects of various agents on ductal tension was determined by two-way analysis of variance factoring for time and treatment. Comparison among means tests was performed by the Tukey-Kramer method. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Data are expressed as mean \pm SEM.

Results

PGES, COX-2 and cPLA2 expression and PGE₂ and PAF levels in fetal and immediate post-natal newborn DA

The expression of mPGES and COX-2 proteins in the DA of pigs immediately post-natally (within 2 h of birth) was 6-7-fold higher than in the DA of fetus (Fig. 1A, B); while in adjacent aorta and pulmonary artery there was only a 2-3-fold higher expression of these proteins in the NB. Expression of cPGES and cPLA2 was relatively unchanged between ages in all tissues (Fig. 1C, D). The increase in mPGES and COX-2 protein in NB DA was paralleled by a rise in PGE₂ (Fig. 2A).

Effects of PAF on PGES and COX-2 expression and PGE₂ levels in fetal DA

Because PAF generation is suggested to augment in the perinatal period (Ibe, 1998; Ibe, 2001) and is reported to induce COX-2 expression (Bazan, 1997; Marrache, 2002), we tested if PAF can induce mPGES and COX-2 in DA from fetus. PAF concentration in the DA of NB pigs was indeed significantly greater than in fetal tissues (Fig. 3A). PAF caused a dose-dependent increase in mPGES and COX-2 expression in the fetal DA (6 h incubation), associated with a time-dependent rise in PGE₂ levels (Fig. 3C-E), towards the higher values seen in the NB (Figs. 1 and 2). COX-1 (not shown), as well as cPGES and cPLA₂ expressions were not affected by PAF (0.1 μM; Fig. 3B). Concordant with these results. PAF (1 μM) induced a rapid rise in DA tone which in contrast to the contractant KCl (100 mM) resumed basal values by 6 h (Fig. 5); this effect was prevented by mPGES inhibitor MK-886 (Mancini, 2001).

Effects of endogenous PAF on mPGES, COX-2 and PGE₂ levels in DA of the perinate

We determined the role of endogenous PAF on mPGES, COX-2 and PGE₂ levels in NB DA using distinct PAF receptor antagonists. Treatment of DA from NB with PAF receptor antagonists BN52021 (0.1 μM; Beauchamp, 2002) and THG315 (0.1 μM; Beauchamp, 2002) for 6 h (but not <2 h) decreased mPGES expression of by 50-85% (Fig. 4A) and COX-2 by 75-85% (Fig. 4B), but not that of cPGES and cPLA₂; this was associated with a corresponding reduction in DA PGE₂ levels (Fig. 4C). Moreover, BN52021 and THG315 caused a concordant delayed rise in DA tone starting by 2 h exposure (Fig. 5).

Discussion

The mechanisms that govern PGE₂ formation in DA during development are so far unknown. Although COX-2 has been shown to contribute significantly to prostanoid formation in the DA, its expression and activity cannot explain the specific and important increase in PGE₂ in this tissue with advancing gestation. Our findings indicate that mPGES like COX-2 is developmentally regulated in DA. This effect seems contributed by PAF, which is augmented in perinatal DA. Moreover, regulation and expression of mPGES and COX-2 by PAF coincides with concordant changes in PGE₂ levels and DA tone.

The expression of mPGES, like that of COX-2, is regulated by inflammatory mediators (Thivierge & Rola-Pleszczynski, 1995; Bazan & Allan, 1996; Lukiw, 1998; Jakobsson, 1999; Murakami, 2000; Han, 2002). Although PAF levels are suggested to increase in the perinate (Ibe, 2001), its role in the physiological regulation of these proteins in DA is unknown. We present evidence that PAF contributes to mPGES and COX-2 expression and impact on ductal tone. 1) PAF levels were increased 3-fold in the immediate NB DA compared to fetus (Fig. 3A). 2) Inhibition of endogenous PAF signaling through PAF receptor blockade dramatically decreased mPGES and COX-2 expression as well as PGE₂ levels in the NB DA (Fig. 3C, D): this was associated with a delayed increase in DA tone observed starting at 2 h of exposure (Fig. 5). Observations infer a short half-life for the products of mPGES and COX-2 genes, as previously reported (Han, 2002). 3) In fetal DA PAF stimulated a dose-dependent increase in mPGES and COX-2 expression and in PGE₂ levels (Fig. 4B, C, D); these findings are consistent with a role for the immediate-early gene COX-2 in the perinatal DA (Clyman, 1999; Takahashi, 2000). 4) PAF also caused a rapid rise in DA tone but this effect was transient, such that its time-course coincided with

the increase in mPGES, COX-2 and PGE₂ (Fig. 5); furthermore, loss of sustained DA tone was prevented with MK-886, an eicosanoid synthesis blocker which inhibits mPGES (Mancini, 2001).

Microsomal PGES and COX-2 seem to exhibit a similar ontogenic and regulatory profile in DA. Our results suggest a physiological functional coupling between COX-2 and mPGES that would play a critical role in the perinatal increase of PGE₂ levels. Such a coupling has been proposed in isolated cell systems, namely in transfected HEK293 cells exposed to pro-inflammatory agents (Murakami, 2000; Han, 2002); whereas COX-1 preferentially coupled to cPGES and was not affected by inflammatory mediators (Tanioka, 2000). Our *in vivo* findings in DA are consistent with these reported *in vitro* observations.

The mechanisms responsible for the perinatal rise in PAF levels are not known. Possible regulating factors can be proposed. These include the activity of the catabolic enzyme PAF acetylhydrolase which varies with development yielding higher activities in the adult than the fetus (Ohshige, 1999). Also, a number of mediators known to induce PAF formation such as cytokines (Valone, 1988), endothelin (Mustafa, 1995), angiotensin (Neuwirth, 1989), exhibit increased levels in the perinatal period, and likewise may contribute to high PAF levels in the perinate.

In summary the present paper provides a mechanism for the increase in the levels of the important DA autocooid, PGE₂, at the end of gestation, specifically through a developmental regulation of mPGES and COX-2 contributed by PAF. Because all PGE₂ receptors in the DA evoke vasorelaxation of this tissue (Bouayad, 2001), and since COX-2 inhibitors may cause serious renal complications especially to the developing subject (Kajino, 2002), one

may postulate that mPGES which catalyzes the formation of the ligand common to all PGE₂ receptors could be a preferred therapeutic target in the control of DA tone.

Acknowledgements:

A. Bouayad is recipient of a Ste-Justine Hospital Foundation fellowship. This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research, Heart and Stroke Foundation of Quebec and Fonds de la Recherche en Santé du Québec, and from U.S. Public Health Service, NIH, NHLBI HL46691. M Beauchamp is a recipient of a studentship from the Canadian Institute of Health Research, and S Chemtob holds a Canada Research Chair.

Reference List

1. Abran, D, Varma DR, Li DY, and Chemtob S. Reduced responses of retinal vessels of the newborn pig to prostaglandins but not to thromboxane. *Can J Physiol Pharmacol* 72:168-173, 1994.
2. Abran, D, Li DY, Varma DR, and Chemtob S. Characterization and ontogeny of PGE₂ and PGF₂ alpha receptors on the retinal vasculature of the pig. *Prostaglandins* 50: 253-67, 1995.
3. Bazan, HE, Tao Y, DeCoster MA, and Bazan NG. Platelet-activating factor induces cyclooxygenase-2 gene expression in corneal epithelium. Requirement of calcium in the signal transduction pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2492-2501, 1997.
4. Bazan, NG, and Allan G. Platelet-activating factor in the modulation of excitatory amino acid neurotransmitter release and of gene expression. *J Lipid Mediat Cell Signal* 14: 321-330, 1996.

5. Beauchamp, MH, Marrache AM, Hou X, Gobeil F Jr, Bernier SG, Lachapelle P, Abran D, Quiniou C, Brault S, Peri KG, Roberts J 2nd, Almazan G, Varma DR, Chemtob S. Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 3327-37, 2002.
6. Bhattacharya, M, Asselin P, Hardy P, Guerguerian AM, Shichi H, Hou X, Varma DR, Bouayad A, Fouron JC, Clyman RI, and Chemtob S. Developmental changes in prostaglandin E₂ receptor subtypes in porcine ductus arteriosus. Possible contribution in altered responsiveness to prostaglandin E₂. *Circulation* 100: 1751-1756, 1999.
7. Bouayad, A, Kajino H, Waleh N, Fouron JC, Andelfinger G, Varma DR, Skoll A, Vazquez A, Gobeil F Jr, Clyman RI, and Chemtob S. Characterization of PGE₂ receptors in fetal and newborn lamb ductus arteriosus. *Am J Physiol* 280: H2342-H2349, 2001.
8. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
9. Clyman, RI, Mauray F, Roman C, and Rudolph AM. PGE₂ is a more potent vasodilator of the lamb ductus arteriosus than is either PGI₂ or 6-keto-PGF_{1α}. *Prostaglandins* 16: 259-264, 1978.

10. Clyman, RI, Hardy P, Waleh N, Chen YQ, Mauray F, Fouron JC, and Chemtob S. Cyclooxygenase-2 plays a significant role in regulating the tone of the fetal lamb ductus arteriosus. *Am J Physiol* 276: R913-21, 1999.
11. Coceani, F, Bodach E, White E, Bishai I, and Olley PM. Prostaglandin I₂ is less relaxant than prostaglandin E₂ on the lamb ductus arteriosus. *Prostaglandins* 15: 551-556, 1978.
12. Coleman, RA, Smith WL, and Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46: 205-229, 1994.
13. Guerguerian, AM, Hardy P, Bhattacharya M, Olley P, Clyman RI, Fouron JC, and Chemtob S. Expression of cyclooxygenases in ductus arteriosus of fetal and newborn pigs. *Am J Obstet Gynecol* 179: 1618-1626, 1998.
14. Han, R, and Smith TJ. Cytoplasmic prostaglandin E₂ synthase is dominantly expressed in cultured KAT-50 thyrocytes, cells that express constitutive prostaglandin-endoperoxide H synthase-2. Basis for low prostaglandin E₂ production. *J Biol Chem* 277: 36897-36903, 2002.
15. Hardy, P, Abran D, Li DY, Fernandez H, Varma DR, and Chemtob S. Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet: interaction with prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 580-591, 1994.

16. Hart, HE, and Greenwald EB. Scintillation proximity assay (SPA): a new method of immunoassay - direct and inhibition mode detection with human albumin and rabbit antihuman albumin *Mol Immunol* 16: 265-267. 1979.
17. Ibe, BO, Hibler S, and Raj JU. Platelet-activating factor modulates pulmonary vasomotor tone in the perinatal lamb. *J Appl Physiol* 85: 1079-1085, 1998.
18. Ibe, BO, Pham HH, Kaapa P, and Raj JU. Maturation changes in ovine pulmonary metabolism of platelet- activating factor: implications for postnatal adaptation. *Mol Genet Metab* 74: 385-395, 2001.
19. Jakobsson, PJ, Thoren S, Morgenstern R, and Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7220-7225, 1999.
20. Jones, SA, Adamson SL, Bishai I, Lees J, Engelberts D, and Coceani F. Eicosanoids in third ventricular cerebrospinal fluid of fetal and newborn sheep. *Am J Physiol* 264: R135-R142, 1993.
21. Kajino, H , Roman C, Clyman RI. Renal effects of cyclooxygenase-2 inhibition in fetal lambs. *Biol Neonate* 82: 257-62. 2002.

22. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
23. Li, DY, Abran D, Peri KG, Varma DR, and Chemtob S. Inhibition of prostaglandin synthesis in newborn pigs increases cerebral microvessel prostaglandin F_{2α} and prostaglandin E₂ receptors. their second messengers and vasoconstrictor response to adult levels. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 370-377, 1996.
24. Li, DY, Varma DR, and Chemtob S. Up-regulation of brain PGE₂ and PGF_{2α} receptors and receptor- coupled second messengers by cyclooxygenase inhibition in newborn pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 15-19, 1995.
25. Lukiw, WJ, Pelaez RP, Martinez J, and Bazan NG. Budesonide epimer R or dexamethasone selectively inhibit platelet- activating factor-induced or interleukin 1beta-induced DNA binding activity of cis-acting transcription factors and cyclooxygenase-2 gene expression in human epidermal keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3914-3919, 1998.
26. Mancini, JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, and Riendeau D. Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem* 276: 4469-4475, 2001.

27. Marrache, AM, Gobeil F Jr, Bernier SG, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, Choufani S, Bkaily G, Bourdeau A, Sirois MG, Vazquez-Tello A, Fan L, Joyal JS, Filep JG, Varma DR, Ribeiro-Da-Silva A, Chemtob S. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol* 169: 6474-81, 2002.
28. Mitchell, MD, Lucas A, Etches PC, Brunt JD, and Turnbull AC. Plasma prostaglandin levels during early neonatal life following term and pre-term delivery. *Prostaglandins* 16: 319-326, 1978.
29. Montrucchio, G, Alloatti G, and Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 80:1669-99, 2000.
30. Murakami, M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, and Kudo I. Regulation of prostaglandin E₂ biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E₂ synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275: 32783-32792, 2000.
31. Mustafa, SB, Gandhi CR, Harvey SA, Olson MS. Endothelin stimulates platelet-activating factor synthesis by cultured rat Kupffer cells. *Hepatology* 21: 545-53, 1995.
32. Neuwirth, R, Satriano JA, DeCandido S, Clay K, Schlondorff D. Angiotensin II causes formation of platelet activating factor in cultured rat mesangial cells. *Circ Res* 6: 1224-9, 1989.

33. Nishida, K, and Markey SP. Platelet-activating factor in brain regions after transient ischemia in gerbils. *Stroke* 27: 514-8, 1996.
34. Ohshige. A, Yoshimura T. Maeda T, Ito M, and Okamura H. Increased platelet-activating factor-acetylhydrolase activity in the umbilical venous plasma of growth-restricted fetuses. *Obstet Gynecol* 93: 180-183, 1999.
35. Peri, KG, Hardy P, Li DY, Varma DR, and Chemtob S. Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem* 270: 24615-20, 1995.
36. Slater, D. Berger L, Newton R, Moore G, and Bennett P. The relative abundance of type 1 to type 2 cyclo-oxygenase mRNA in human amnion at term. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 304-308. 1994.
37. Slater, D. Dennes W. Sawdy R. Allport V, and Bennett P. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human fetal membranes throughout pregnancy. *J Mol Endocrinol* 22: 125-130, 1999.

38. Takahashi, Y, Roman C, Chemtob S, Tse MM, Lin E, Heymann MA, Clyman RI. Cyclooxygenase-2 inhibitors constrict the fetal lamb ductus arteriosus both *in vitro* and *in vivo*. *Am J Physiol* 278: R1496-505, 2000.

39. Tanioka, T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, and Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E₂ synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E₂ biosynthesis. *J Biol Chem* 275: 32775-32782, 2000.

40. Thivierge, M, and Rola-Pleszczynski M. Up-regulation of inducible cyclooxygenase gene expression by platelet-activating factor in activated rat alveolar macrophages. *J Immunol* 154: 6593-6599, 1995.

41. Towbin, H, Staehelin T, and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979.

42. Ueno, N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, Urade Y, and Kudo I. Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A₂. *J Biol Chem* 276: 34918-34927, 2001.
43. Valone, FH, and Epstein LB. Biphasic platelet-activating factor synthesis by human monocytes stimulated with IL-1 β , tumor necrosis factor, or IFN- γ . *J Immunol* 141: 3945-50, 1988.

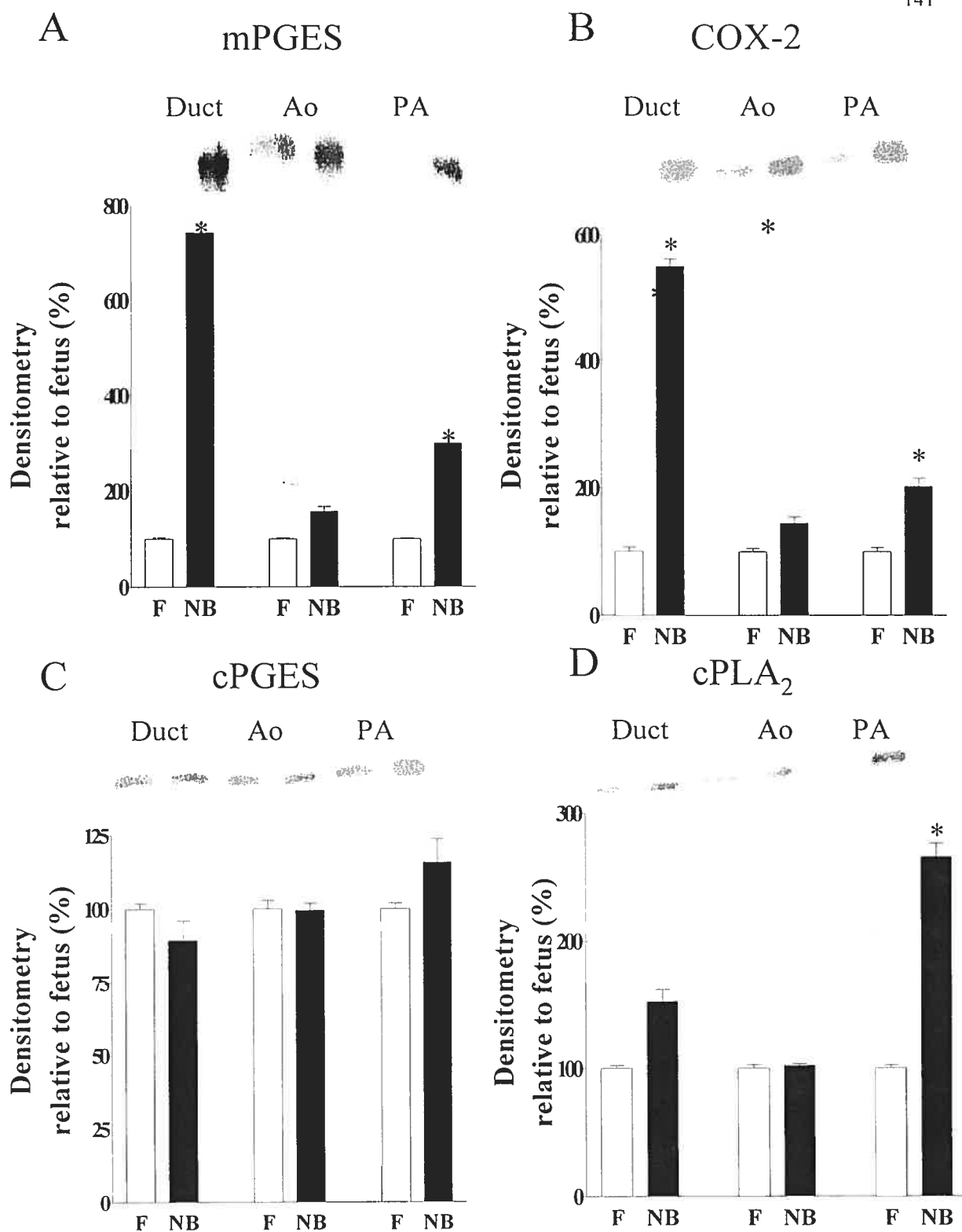


Figure 3.1. Relative expression of mPGES (A), COX-2 (B), cPGES (C) and cPLA₂ (D) in the ductus arteriosus (Duct), descending aorta (Ao) and pulmonary artery (PA) of the fetal (F) and newborn (NB) pigs. Representative Western blots are on the top and histograms represent semi-quantitative data from 3-4 separate experiments.

* $P < 0.05$ versus fetal values.

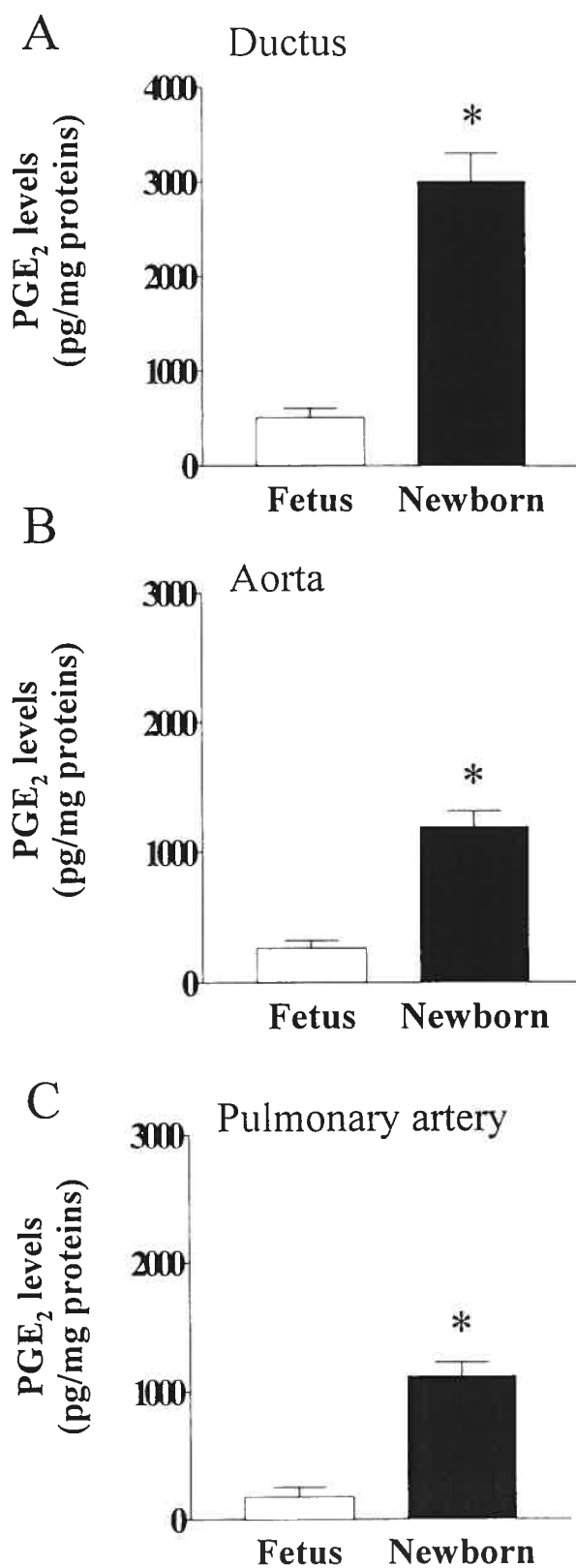


Figure 3.2. Developmental regulation of PGE₂ levels in the ductus arteriosus (A), descending aorta (B) and main pulmonary artery (C) of near-term fetus and immediate newborn piglet. Data are represented as means \pm SEM of 3-4 experiments. * $P < 0.05$ versus fetal values.

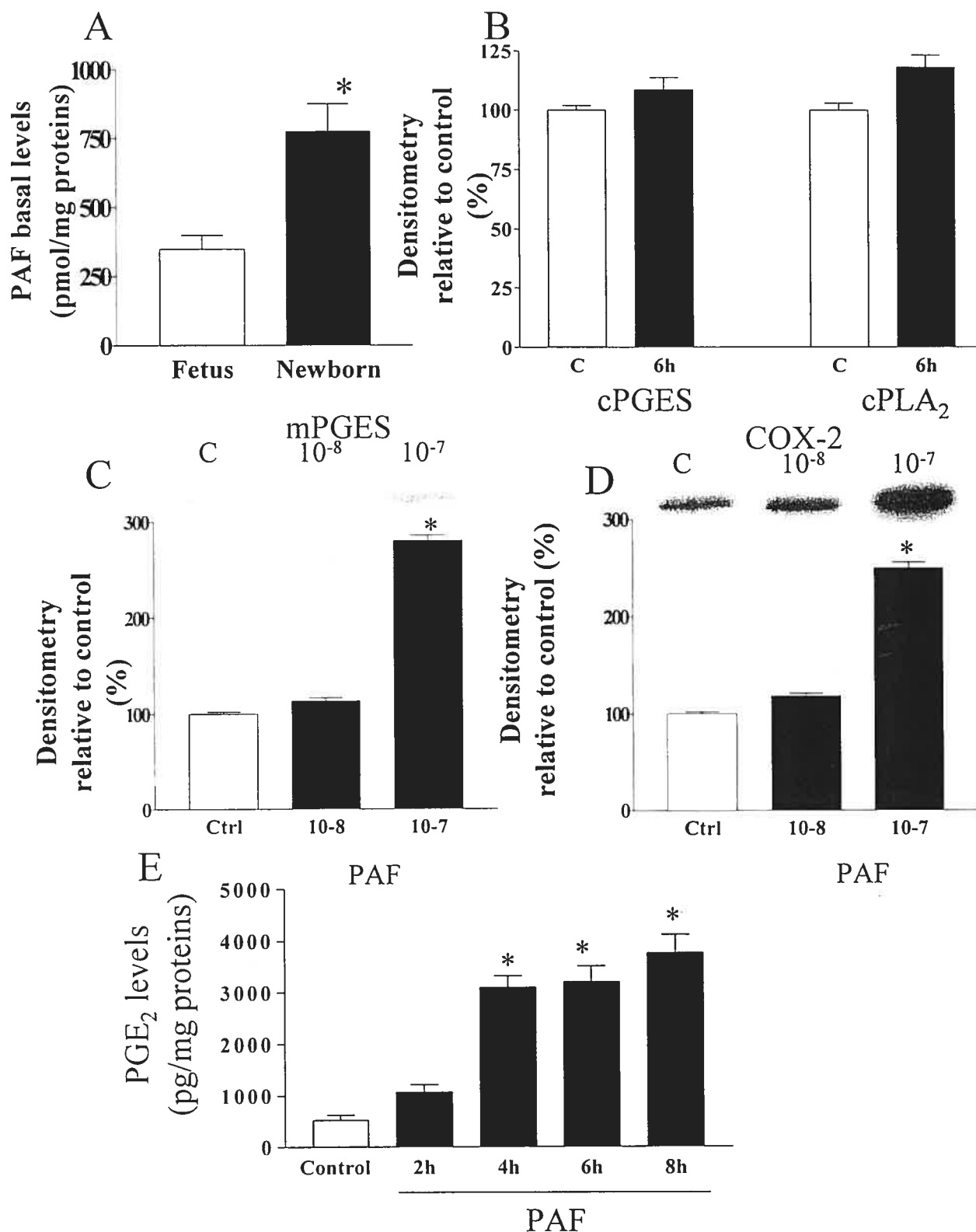


Figure 3.3. Developmental regulation of PAF levels in the ductus arteriosus (A). Dose-dependent effect of PAF on cPGES and cPLA₂ (B), mPGES (C) and COX-2 (D) expression in the fetus DA. Effect of PAF on PGE₂ levels in ductus arteriosus of fetal piglets (E). Representative Western blots are on the top and histograms represent semi-quantitative data from 3-4. **P* < 0.05 versus control values.

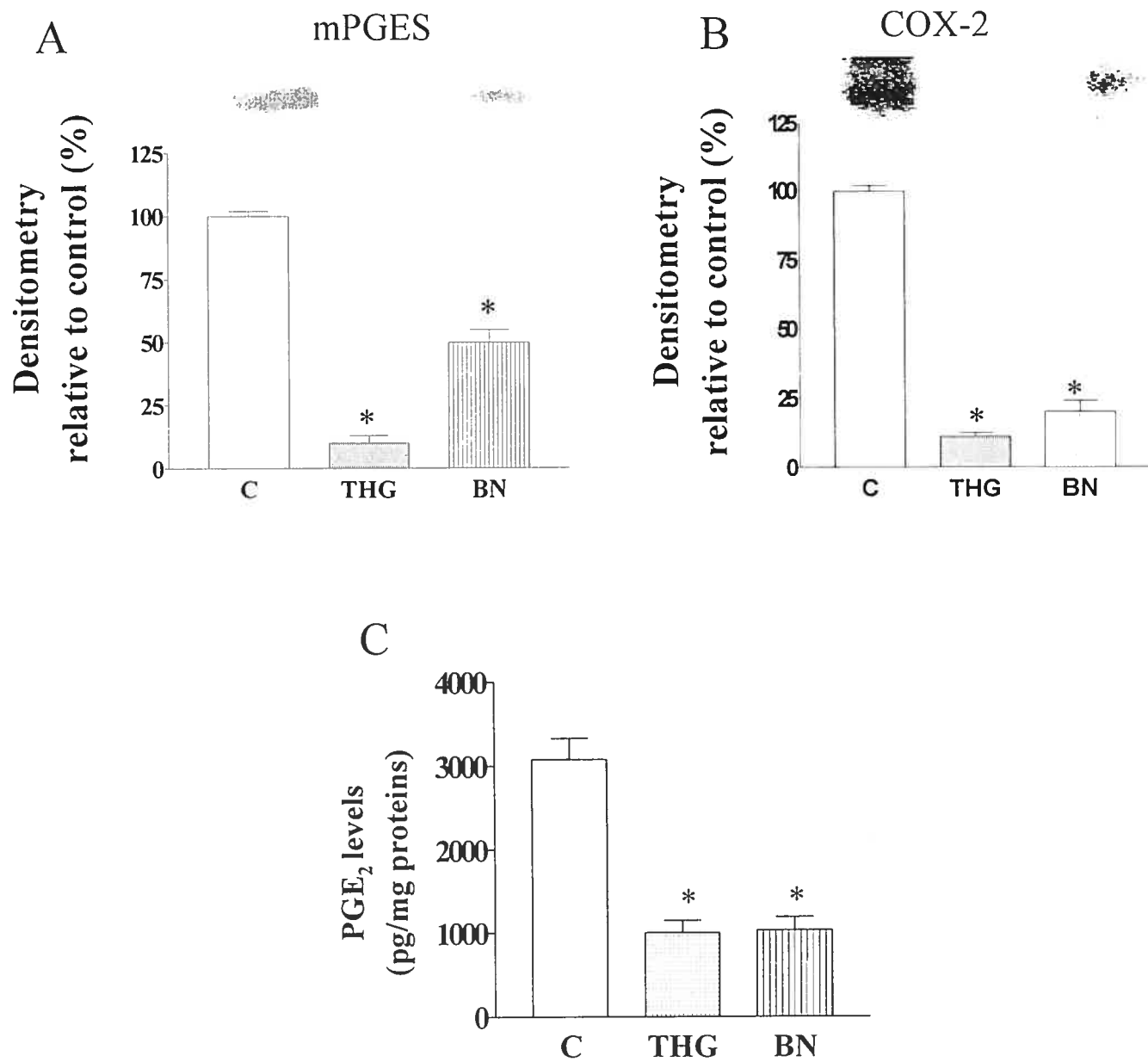


Figure 3.4. Effects of PAF receptor antagonists BN52021 (0.1 μ M) and THG315 (0.1 μ M) on mPGES (A) and COX-2 (B) expression and on PGE₂ levels (C) in newborn ductus arteriosus. Representative Western blots are on the top and histograms represent semi-quantitative data from 3-4. * $P < 0.05$ versus control values.

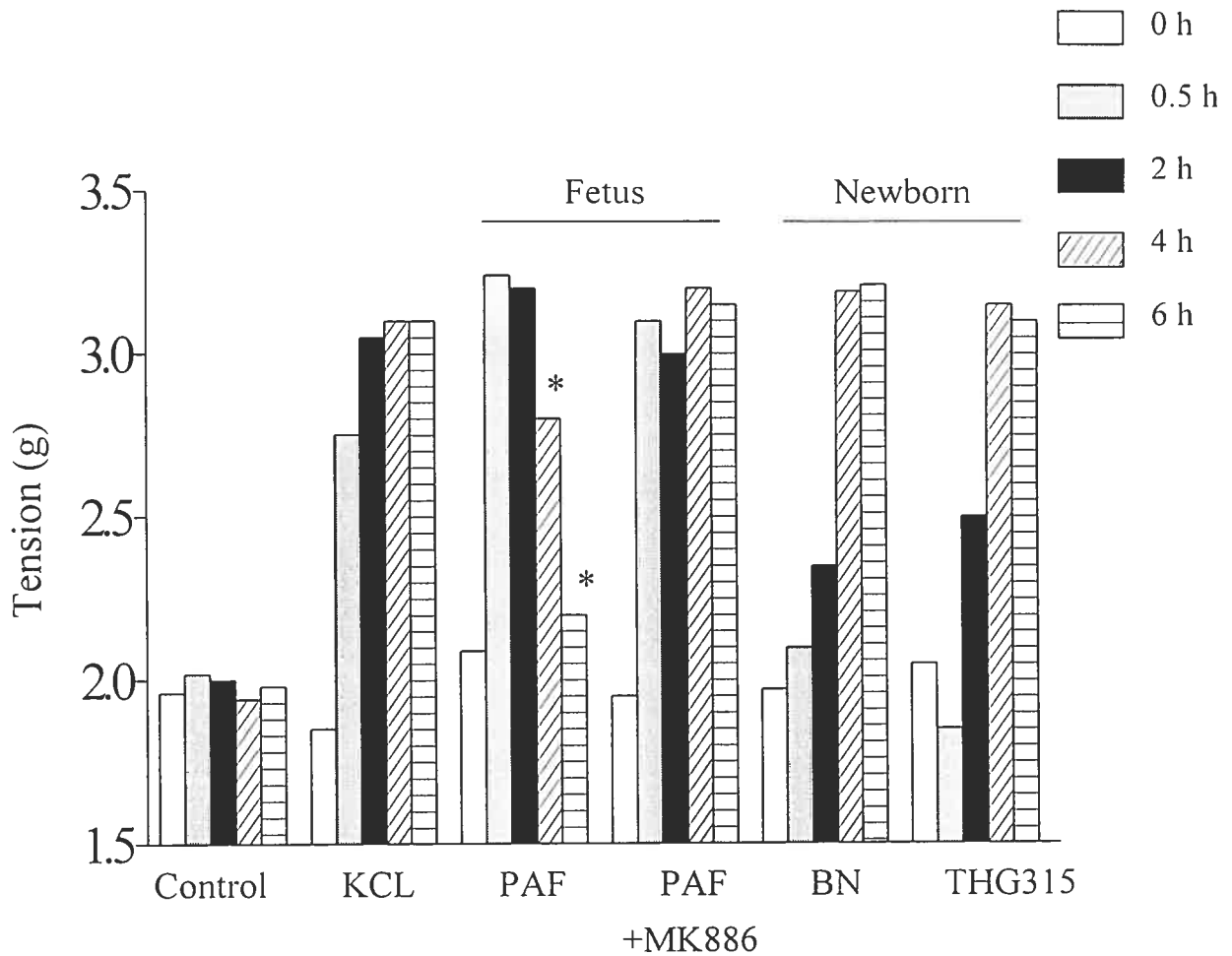


Figure 3.5. Effects of mPGES activity inhibitor MK-886 on PAF-induced tension according to time in fetal piglets. Action of PAF and its receptor antagonists (BN52021, THG315) on newborn ductus arteriosus tension;. Tension values are represented as mean \pm SEM of 3-4 representative experiments.

* $P < 0.05$ versus corresponding control values.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE

CONCLUSIONS

PERSPECTIVES FUTURES

Discussion générale

Les prostaglandines, surtout la prostaglandine E2 (PGE₂), joue un rôle primordial dans le maintien de l'ouverture du CA fœtal. Cependant, la réactivité de ce vaisseau à la PGE₂ est significativement diminuée après la naissance, ce qui facilite la fermeture du CA. Les mécanismes de cette diminution de réponse à la PGE₂ restent méconnus. La PGE₂ exerce ses effets via les récepteurs EP₁, EP₂, EP₃, et EP₄ mais les sous-types de récepteurs EP impliqués demeurent non identifiés. Nous avons confirmé par des études de liaison de radioligand et de RT-PCR que le CA du F proche-terme exprimait les récepteurs EP₂, 3D, 4 dont la densité totale était 3 fois supérieure à celle du NN qui ne semble exprimer que les récepteurs EP₂. L'activation des EP₂ et EP₄ stimulent la synthèse d'AMPC et elle est associée à la relaxation du CA. De plus, même si l'activation des EP₃ inhibe la production d'AMPC, elle reste associée à la relaxation du CA fœtal *in vitro* et *in vivo*. Il s'est avéré que cette surprenante relaxation via les EP₃ est spécifiquement bloquée par la glibenclamide, un bloqueur de canaux K⁺ sensibles à l'ATP.

Par ailleurs, une autre façon de contrôler le tonus du CA serait de déterminer les facteurs qui entraînent une importante augmentation des niveaux de PGE₂ observés durant la période périnatale. Une induction ontogénique de la cyclooxygénase inductible (COX-2) est connue mais ne constitue pas une explication suffisante. C'est pour cette raison que nous stipulons un rôle de la forme inductible de la synthase spécifique de PGE₂, la PGES membranaire (PGESm). Des études d'immunobuvardage de type Western couplés à des essais radioimmunologiques ont permis de démontrer que l'expression de PGESm et de COX-2 était augmentée dans le CA de NN de porcelet comparativement au F; ce qui est

associé à une production de PGE₂ plus élevée chez le NN. De plus, l'expression de PGES_m, comme celle de COX-2 ainsi que la production de PGE₂ locale, sont fortement induites par le facteur d'agrégation plaquettaire PAF. L'ensemble de ces résultats peut contribuer à développer des traitements plus spécifiques pour le contrôle du tonus vasculaire du canal artériel.

4.1 Récepteurs EP de la PGE₂ et contrôle du tonus du canal artériel

4.1.1 Distribution et régulation ontogénique des EP dans le CA

Les premières études pharmacologiques ont suggéré que EP₄ est le récepteur majeur dans le CA fœtal de lapin (Smith, 1994) mais l'interruption génique de ce récepteur n'a pas entraîné de fermeture du vaisseau chez les souris fœtale et néonatale (Nguyen, 1997), tandis que le type de récepteurs EP exprimés dans le CA de mammifères supérieurs (porcelet, agneau) à la naissance restait inconnu (Clyman, 1983; Abrams, 1995). Dans la première partie de cette thèse (chapitre 2), nous avons clairement identifié la nature et la quantité des récepteurs EP présents dans le CA durant la période périnatale, ce qui était jusqu'alors controversé dans la littérature. La relaxation du CA est médiée par les 3 récepteurs EP chez le fœtus tandis qu'une étude préalable a révélé par des études de type Northern l'expression de l'ARN messager des EP₃ et EP₄ dans le CA fœtal et néonatal; l'expression de EP₄ était diminuée de façon indépendante des corticostéroïdes chez le NN (Smith, 2001). Cette contradiction apparente entre les deux études du profil développemental des récepteurs EP₃ peut s'expliquer par: 1) une discordance entre les niveaux d'ARNm mesurés dans l'étude de Smith et al. et la quantification de la liaison du ligand que nous avons rapportée car elle reflète mieux la densité totale des récepteurs; 2) la limite de détection des expériences de radioligand ne permettrait pas de détecter la variation de la densité de récepteurs faiblement exprimés.

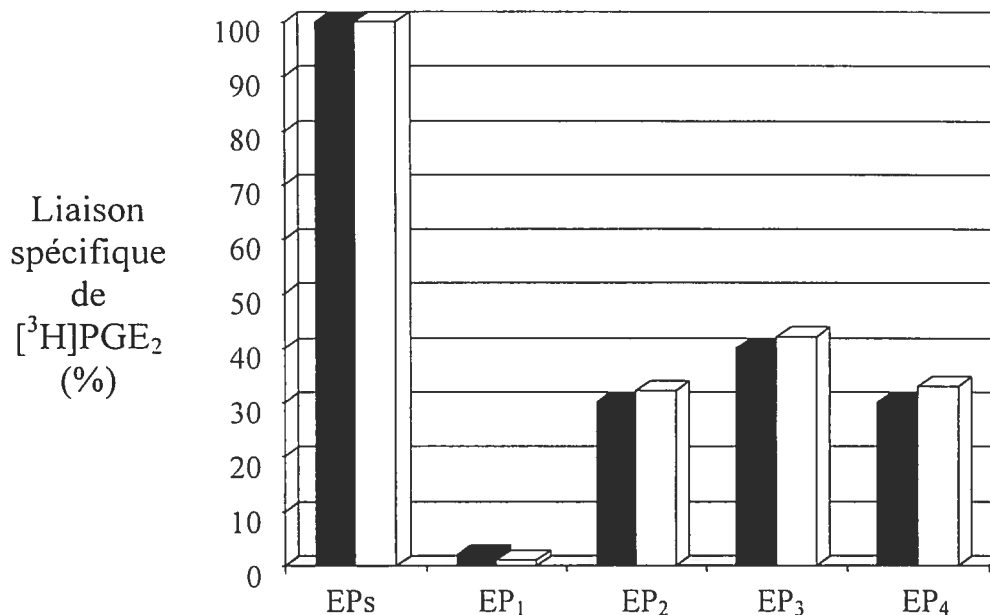


Figure 4.1. Proportion relative des récepteurs EP_{1,2,3,4}, dans le CA fœtal de porcelet (blanc) et d'agneau (noir), d'après Bhattacharya et al., 1999 et Bouayad et al., 2001.

Par ailleurs, la détection des seuls EP₂ pour médier la relaxation PGE₂-dépendante du CA chez le nouveau-né pourrait suggérer l'utilisation des agonistes spécifiques de ces récepteurs pour maintenir le CA ouvert (Bhattacharya, 1999). Cependant, nos données préliminaires (non incluses dans cette thèse) ont démontré que l'infusion de butaprost provoquait peu ou pas d'ouverture du CA chez le NN (1h postnatal) mais déclenchait une profonde vasodilatation pulmonaire.

En ce qui concerne les récepteurs EP₃, notre étude a révélé que leur stimulation a provoqué la relaxation du CA par une voie qui dépend des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}), ce qui met en évidence pour la première fois un rôle vasodilatateur des récepteurs EP₃ de façon AMPc-indépendante (Bouayad, 2001). Il aurait été intéressant de quantifier *in vivo* la contribution des K_{ATP} à cette relaxation en incubant le sulprostone

(agoniste des EP₃) en présence et en absence du glibenclamide qui est un bloqueur spécifique des K_{ATP} puis mesurer la variation du diamètre CA en fonction du temps et de la dose d'incubation. Étant donné que cet outil pharmacologique est déjà disponible, efficace et spécifique, il pourrait être d'une grande utilité éventuelle en clinique. D'autre part, on pourrait envisager l'administration des agonistes des récepteurs EP₃ simultanément avec l'indométhacine aux mères en cas de traitement antitocolytique afin d'éviter la fermeture du CA *in utero*. On pourrait développer des antagonistes spécifiques des récepteurs EP₃ qui pourraient servir à fermer le CA réfractaire à la fermeture pharmacologique avec l'indométhacine comme cela est le cas chez les NN grands prématurés. Cependant la distribution largement ubiquitaire des récepteurs EP₃ rend l'utilisation de leurs ligands spécifiques risquée. Des études préliminaires afin de déterminer le rapport des bénéfices/risques d'utilisation en clinique de ces agents seraient appropriées.

Les récepteurs EP₁ ne semblent pas présents dans le CA du F et du NN. Cela aurait été utile de confirmer l'absence de l'effet contractile des EP₁ à la naissance par d'autres méthodes fonctionnelles telles la mesure des concentrations de messagers secondaires comme le Ca²⁺ ou le IP₃. On pourrait également rechercher la présence ou la surexpression de l'isoforme tronqué r-EP1v (isolé à partir d'utérus de rat) qui atténuerait l'action de PGE₂ (Okuda-Ashitaka, 1996) dans le CA de NN par rapport à celui du F.

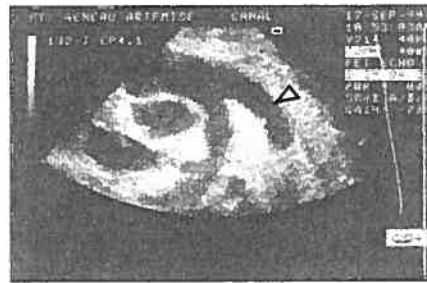
Dans une perspective plus générale de la variation de la densité totale (Bmax) des récepteurs EP, nous aurions pu entreprendre des études immunohistologiques similaires à ceux de Clyman et al. afin de déterminer si la diminution du Bmax des EP chez le NN est due à une disparition des EP endothéliaux ou de la média (Clyman, 1996).

4.1.2. Potentiel thérapeutique des ligands des récepteurs EP dans la régulation du CA

4.1.2.1 Persistance de l'ouverture du CA (PDA)

Étant donné que la vasodilatation du CA fœtal est médiée par les récepteurs EP_{2,3,4}, il serait intéressant d'établir l'effet d'agents spécifiques à chacun de ces sous-types de récepteurs sur le diamètre du CA. Plusieurs études préliminaires ont suggéré l'importance de la participation du EP₄ au tonus du CA (Wright. 2001; Smith. 1994), ce qui en fait une cible pour le traitement du PDA chez les NN nés prématurément. Nous avons récemment démontré que l'infusion du THG-213, un nouvel antagoniste spécifique de EP₄, provoque une contraction significative *in vivo* du CA fœtal chez l'agneau mais son efficacité demeure inférieure à celle de l'indométhacine, ce qui suggère un rôle important des autres récepteurs des prostaglandines (Figure 4.2) (Wright. 2001). Par ailleurs, nous avons également démontré que l'activation des EP₃ dilate *in vivo* le CA néonatal de l'agneau contrairement à ses actions vasoconstrictrices dans d'autres lits vasculaires. Cependant l'expression et la distribution du récepteur EP₃ sont très ubiquitaires dans l'organisme (Abramovitz. 1995; Breyer & Breyer. 2001), ce qui rend la présence d'effets secondaires très probable lors l'utilisation de ses ligands spécifiques.

Before THG213 injection



After THG213 injection

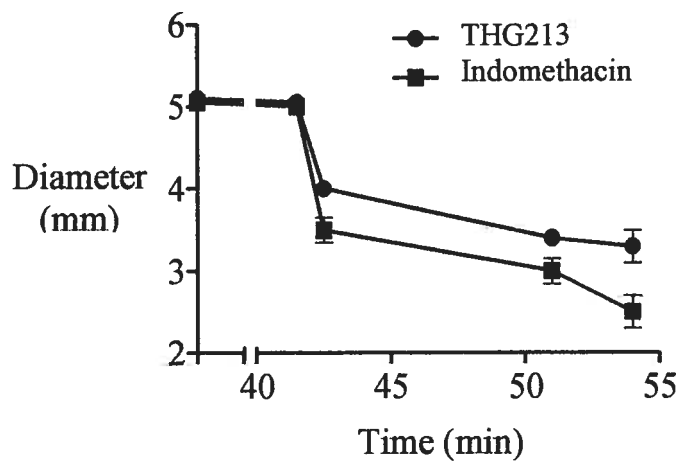


Figure 4.2. Effet de l'antagoniste spécifique du récepteur EP₄ (THG213) par rapport à celui de l'indométhacine sur le diamètre du CA chez le fœtus d'agneau, d'après Wright et al., 2001.

4.1.2.2. Circulation CA-dépendante

La présence de certaines formes de cardiopathies (transposition des gros vaisseaux, tétralogie de Fallot, coarctation de l'aorte) peut exiger le maintien de l'ouverture du CA afin d'assurer une circulation systémique adéquate. Cette situation requiert l'administration de PGE₁ en clinique. Cependant, en admettant que le profil des récepteurs EP est semblable dans le CA néonatal des mammifères supérieurs et de l'humain, nous pouvons stipuler qu'un agoniste sélectif de EP₂ serait efficace à maintenir le CA ouvert chez les nouveau-nés (Bhattacharya, 1999; Bouayad, 2001). De plus, la distribution du récepteur EP₂ est limitée chez les nouveaux-nés (Bhattacharya, 1999), ce qui rend l'usage de son agoniste sélectif (butaprost) plus attractive car moins susceptible de provoquer des effets secondaires que celle de PGE₁, qui active tous les récepteurs EP (Coleman, 1990; Abramovitz, 1995). En effet, il a été démontré que l'activation sélective du récepteur EP₂ dilate le CA de NN de porcelet sans les effets secondaires sur la circulation systémique (Bhattacharya, 1999). Des données préliminaires ont observé que la forme inductible de la PGE₂ synthase, la PGES_m, avait un profil régulateur semblable à celui de COX-2 (Murakami, 2000) tandis que la PGES_c constitutive semble suivre celui de COX-1 (Kudo, 2000). Si un tel couplage entre PGES_m et COX-2 existe dans le CA, alors PGES_m aurait un rôle important à jouer dans la régulation vasomotrice du CA et c'est ce qui nous a conduit à mener la deuxième partie des expériences qui figurent dans cette thèse.

4.2 Cyclooxygénases dans le CA

L'interruption des gènes qui codent pour COX-1 (*Ptgs1*) (Langenbach, 1997) et COX-2 (*Ptgs2*) (Morham, 1997) a été effectuée chez les souris, ce qui procure des modèles génétiques pour étudier les fonctions de chaque isoforme de COX. Malgré le fait qu'aucun phénotype prénatal ou postnatal impliquant le CA n'ait été rapporté dans aucun des 2

modèles d'interruption génétique de COX, une compensation fonctionnelle d'un isoforme par l'autre aurait pu confondre le phénotype néonatal dans le CA. L'expression des isoenzymes de COX et leur contribution relative au tonus du CA a été récemment rapportée (Guerguerian, 1998). Le CA du NN à terme de porcelet, mais pas celui du fœtus, exprime COX-2. Les PGs circulantes, qui sont principalement synthétisées par COX-1, semblent être les principales responsables du contrôle vasotonique du CA *in vivo* (Guerguerian, 1998). Le rôle de COX-2 dans la régulation du tonus du CA a été également étudiée chez le fœtus proche-terme d'agneau (Clyman, 1999). COX-1 et COX-2 sont exprimés et contribuent de façon équivalente à la production des PGs dans le CA intact *in vitro*. Un profil similaire d'expression de COX-1 et de COX-2 a été mis en évidence dans le CA du fœtus de babouin (Clyman & Seidner, résultats non publiés, 2000). La localisation précise de COX-2 dans le CA fœtal d'agneau demeure incertaine. Coceani et al. ont rapporté la présence de COX-2 dans les cellules musculaires lisses (Coceani, 2001) comme cela est le cas chez les porcelets immédiatement après la naissance (Guerguerian, 1998). De plus, l'expression de COX-2 augmente chez le fœtus en fin de gestation et le NN immédiatement après la naissance. Cette induction de l'expression de COX-2 pourrait être causée par les médiateurs inflammatoires produits lors de l'accouchement et par l'oxygène et complèterait COX-1 dans la production de PGE₂ ainsi que dans la relaxation du CA *in utero*. Cependant, COX-1 demeure l'isoforme dominant par rapport à COX-2 dans la régulation du tonus du CA *in vitro* et *in vivo* chez le fœtus d'agneau (Coceani, 2001; Loftin, 2001). En effet, l'inhibiteur sélectif de COX-2, célécoxib, produit une faible diminution du gradient de pression et de la résistance au niveau du CA fœtal chez l'agneau. Ces changements sont associés à une légère réduction des concentrations plasmatiques de PGE₂ (Clyman, 1999). En revanche, l'indométhacine provoque une diminution plus importante que le célécoxib du débit sanguin dans le CA et elle est plus

efficace à augmenter la résistance du CA *in vivo*. Par conséquent, les effets de COX-2 sur l'ouverture du CA *in utero* demeurent modestes.

Afin de mieux comprendre la contribution relative de chacun des isoformes de COX et des PGs qu'ils produisent à la fonction du CA, des souris "knockout" avec des gènes de *Ptgs1* et/ou *Ptgs2* inactifs ont été produites, ce qui empêche la production de COX-1 et/ou de COX-2, respectivement (Loftin, 2001). Contre toute attente, ces études ont révélé que l'absence de l'un ou des deux isoformes de COX ne provoque pas la fermeture prématurée du CA *in utero*, ce qui suggère la régulation positive de mécanismes alternatifs vasodilatateurs indépendants des PGs. Cependant, 35% (20/57) des souris dont le CA persiste ouvert (PDA) et qui ne possèdent pas le gène de COX-2 décèdent dans les 48 heures après la naissance. L'absence de COX-1 ne semble pas affecter la fermeture du CA. Par contre, le taux de mortalité de 35% et la fréquence de PDA dues à l'absence de COX-2 ont été significativement augmentés (79%, 26/33) quand une copie du gène de COX-1 était également inactivée. De plus, 100% des souris qui ne possèdent pas les 2 isoformes de COX ont un CA ouvert et décèdent 12 heures après la naissance, ce qui indique que le rôle de COX-1 devient évident uniquement en absence de COX-2. L'ensemble de ces observations établit l'implication de COX-1 et de COX-2 dans la transition de la circulation cardio-pulmonaire entre la vie fœtale et néonatale. De plus, l'absence de COX-2 en présence de COX-1 déclenche des mécanismes complémentaires indépendants des prostaglandines.

En résumé, l'expression de COX-2 joue un rôle majeur dans le maintien de l'ouverture du CA chez le fœtus en fin de gestation. Cependant, COX-1 exerce une fonction importante sur le tonus du CA via la production de PGs périphériques. En effet,

l'inhibition de COX-1 diminue significativement les niveaux de PGE₂ dans le plasma et provoque une vasoconstriction importante du CA. L'utilisation de l'inhibition de COX-2 pour le traitement du travail préterme pourrait être plus sécuritaire pour le fœtus que l'inhibition non sélective des COX avec l'indométhacine malgré le fait que les risques associés à l'inhibition périnatale de COX-2 restent à déterminer. Des études préliminaires *in vitro* ont observé que l'expression de la forme inductible (PGESm) d'une nouvelle famille d'enzymes impliquées dans la synthèse de PGE₂ nommées PGES était induite par les facteurs qui augmentent l'expression de COX-2 (Murakami, 2000; Han, 2002). La famille des PGES est donc d'un grand intérêt pour le contrôle du tonus du CA et c'est pour cette raison que nous l'avons caractérisée dans le CA.

4.3 PGE₂ synthases (PGES) dans le CA

L'enzyme spécifique de la synthèse du PGE₂, la PGE₂ synthase (PGES) à partir du précurseur PGH₂ fourni par les COXs, a été récemment clônée (Forsberg, 2000; Filion, 2001) et caractérisée (Jakobsson, 1999) chez plusieurs espèces dont l'humain. Deux isoformes de PGES ont été identifiées. La forme constitutive qui est une protéine cytosolique PGESc (Meyer, 1996) et la forme inductible qui est microsomiale PGESm (Urade, 1995). Les deux isoformes de PGES dépendent du glutathion pour leur activité enzymatique. Nous avons stipulé que des changements spécifiques des PGES dans le CA du NN pourraient expliquer, au moins en partie, l'importante augmentation des niveaux de PGE₂ durant la période périnatale. Notre étude a démontré par des études de type Western que l'expression de COX-2 et de PGESm est augmentée de 5-7 fois dans le CA du NN (< 3h de vie) par rapport au fœtus de porcelet (F: ~75-90% gestation) tandis que l'expression de PGESc et de PLA2c ne semble pas être régulée pendant le développement (Bouayad, 2003). Cette variation ontogénique de l'expression des enzymes de synthèse de PGE₂ est

associée à une plus grande production de PGE₂ chez le NN. Pendant la période périnatale, les concentrations de certaines cytokines (Il-4, Il-10) incluant PAF augmentent dramatiquement (Syed, 1988; Carding, 1989; Marzi, 1996; Lee, 2001 ; Ibe, 2001). PAF joue un rôle dans l'embryogenèse et la physio-pathologie cardiaques chez l'humain (Snyder, 1990; Montrucchio, 2000) mais sa (ses) fonction(s) dans le CA n'a pas encore été étudiée. Nous avons investigué le rôle de ce médiateur dans la régulation enzymatique précédente. PAF, dont les effets sont dépendants de la dose et du temps d'incubation, régule l'expression protéique de PGESm et de COX-2, augmente la synthèse de PGE₂ et induit une vasorelaxation tardive d'anneaux du CA de NN de porcelet *ex vivo* 4-6 hours après la contraction initiale (Bouayad, 2003). Le couplage fonctionnel entre PGESm et COX-2 que nous avons observé dans le CA a été fortement suggéré dans d'autres systèmes *in vitro* de HEK293 et de fibroblastes en culture (Murakami, 2000; Han, 2002). On pourrait mettre à profit cette relation enzymatique exceptionnelle en ciblant simultanément les deux enzymes afin de bloquer ou d'induire la synthèse de PGE₂ dans le CA et donc de contrôler le vaisseau selon la situation clinique. Jusqu'à ce jour, cette étude est la première à révéler le profil développemental de l'enzyme PGES et à l'associer à des concentrations élevées de PAF dans des conditions physiologiques.

Jusqu'à ce jour, il n'existe pas d'inhibiteurs sélectifs et puissants de PGESm disponibles. Nous avons donc du utiliser MK-886. Par conséquent, il devient très difficile d'évaluer l'importance de PGESm par rapport à PGESc et aux COXs ainsi que le couplage de PGESm/COX-2 dans le maintien de l'ouverture du CA *in utero* à différents stades gestationnels et immédiatement après la naissance.

Notre étude sur PGES et le CA se basait principalement sur une approche pharmacologique, ce qui nous amène à envisager une étude génétique de l'importance de PGESm/c par rapport aux COXs quand les souris KO pour le gène de PGES seront disponibles. On pourrait alors suivre un protocole similaire à celui de Loftin et al. dans leur étude *in vivo* sur l'impact relatif des COX-1/COX-2 dans l'ouverture du CA (Loftin, 2001) et comparer nos observations avec celles obtenues de façon pharmacologique. Il serait également intéressant d'examiner l'expression de PGESm chez les souris déficientes en COX-2 et voir si le couplage PGESm/COX-2 est remplacé par la coopération de PGESm avec une autre enzyme ou un autre système d'enzymes fonctionnellement liées. L'expression de COX-2 ainsi que les effets sur les circulations systémique et cérébrale seraient à déterminer chez les souris déficientes en PGESm. La même démarche serait utile chez les souris KO déficientes en récepteur de PAF qui sont disponibles (Ishii, 1998).

En résumé, il semblerait que l'équilibre entre les vasodilatateurs, principalement la PGE₂, et l'oxygène (vasoconstricteur) soit modulé par PAF en faveur de la vasodilatation afin d'assurer une perméabilité du CA durant la période cruciale de la parturition. Cette dernière est caractérisée par la diminution de densité des récepteurs de PGE₂ qui médient toute la vasodilatation. Par la suite, la chute rapide des prostaglandines en période postnatale favorise la fermeture du CA car elle mène à une hypoxie puis ultimement au remodelage et à la fermeture permanente du CA. Les facteurs qui causent l'augmentation périnatale du niveau de PAF dans le CA ne sont pas encore déterminés, ce qui nous ouvre un nouveau domaine de recherche. L'impact de ces facteurs sur PGESm/COX-2, les concentrations périnatales de PGE₂ et ultimement sur le diamètre du CA sera à étudier.

Conclusions

Dans le premier manuscrit, nous avons mis en évidence que PGE₂ dilate le CA du fœtus en fin de gestation par des voies de signalisation qui impliquent l'AMPc (EP₂ et EP₄) ou les canaux K_{ATP} (EP₃) tandis que les effets de la PGE₂ dans le CA du NN semblent médiés exclusivement par les récepteurs EP₂ *in vitro* et *in vivo*. Nous avons donc élucidé un nouveau mécanisme d'action vasorelaxante des récepteurs EP₃ via les canaux K_{ATP}. De plus, tous les récepteurs EP ont une action vasorelaxante sur le CA, il serait donc très difficile de les cibler tous afin de fermer le CA. Cette démarche, en plus d'être très compliquée, serait associée à de nombreux effets secondaires étant donné la distribution ubiquitaire de ces récepteurs dans l'organisme. Par conséquent, nous avons réorienté notre recherche sur une cible moléculaire qui se voulait plus spécifique au CA. Des données récentes avaient révélé l'existence d'une nouvelle famille d'enzymes impliquées dans la synthèse de PGE₂, les PGES. De plus, il semblerait que les formes constitutive et inductible de cette famille soient liées aux isoformes correspondantes de la famille des COXs. Étant donné que les COXs jouent un rôle dans la synthèse de PGE₂ dans le CA, nous avons entrepris d'étudier les PGES dans le CA. Comme les niveaux de PAF sont présumés augmentés durant cette période périnatale, nous nous sommes également intéressés à la régulation des PGES par ce médiateur.

Notre étude sur les PGES dans le CA est la première à révéler un rôle physiologique des concentrations élevées de PAF chez le nouveau-né et suggère que la régulation de la formation de PGE₂ via PGESm constitue une approche nouvelle et plus spécifique que l'inhibition des COXs ou le ciblage collectif des récepteurs EP pour le contrôle vasotonique du canal artériel.

Perspectives futures

Une étude préliminaire (Bhattacharya, 1999) ainsi que la première partie de cette thèse (chap 2) nous a permis de démontrer une variation développementale des récepteurs EP puisque la densité totale de ces récepteurs dans le CA diminue significativement après la naissance (détection des EP₂ seulement). Nos résultats suggèrent que la réduction de la densité totale des récepteurs EP est impliquée dans la diminution de la sensibilité du CA nouveau-né à la PGE₂, ce qui nous amène à vérifier si une désensibilisation (homologue et/ou hétérologue) des récepteurs EP est également impliquée. Nous stipulons également que des agonistes sélectifs des récepteurs EP₂ maintiendraient le CA ouvert chez des nouveaux-nés à terme et qui souffrent de certaines cardiopathies congénitales où la circulation est CA-dépendante. L'avantage de tels agonistes consisterait dans l'absence d'effets secondaires associés à l'administration des PGEs tels l'apnée, la fièvre, l'entérocolite nécrosante, les convulsions et l'hémorragie. Enfin, il serait important d'étudier l'impact d'hormones qui augmentent beaucoup pendant la période périnatale comme le NO, l'ANGII, le cortisol, l'adrénaline, la BK, l'ET-1, et certaines interleukines sur l'expression des récepteurs EP, les niveaux de PAF et/ou de PGE₂ et sur le diamètre du CA. Nos observations ont révélé l'implication des canaux K_{ATP} dans le maintien de l'ouverture du CA proche-terme après la stimulation des récepteurs EP₃, ce qui nous amène à étudier plus en détail comment le couplage entre le récepteur et le canal ionique est effectué ainsi que la voie de signalisation en aval des canaux K_{ATP}.

La seconde partie de cette thèse (chapitre 3) qui porte sur l'étude des PGES a également permis d'identifier cette famille d'enzymes comme des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour un meilleur contrôle du tonus du CA. Ainsi, le CA du NN

surexprime les formes inductibles des enzymes de la cascade de production de PGE_2 , soit PGESm et COX-2, suite à l'augmentation importante des concentrations périnatales de PAF. Par conséquent, tous les éléments qui affectent la synthèse et/ou le métabolisme de PAF auront une conséquence sur PGESm-COX-2, sur les concentrations périnatales de PGE_2 et ultimement sur le diamètre du CA. Il faudrait donc élucider l'ensemble de ces facteurs afin d'identifier d'autres molécules-clé de cette cascade. Il serait également intéressant de voir comment ces facteurs régulent l'expression et/ou l'activité de la PAF acétylhydrolase ou de la PAF acétyltransférase. De même, il serait intéressant de voir si PGE_2 , comme PAF, peut jouer le rôle d'un messenger rétrograde et influencer un ou plusieurs éléments qui participent à sa synthèse ou à celle de PAF.

CHAPITRE 5

RÉFÉRENCES

1. Abramovitz, M., M. Adam, Y. Boie, M. Carriere, D. Denis, C. Godbout, S. Lamontagne, C. Rochette, N. Sawyer, N. M. Tremblay, M. Belley, M. Gallant, C. Dufresne, Y. Gareau, R. Ruel, H. Juteau, M. Labelle, N. Ouimet, and K. M. Metters. The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta* 1483:285-293, 2000.
2. Abramovitz, M., M. Adam, Y. Boie, R. Grygorczyk, T. H. Rushmore, T. Nguyen, C. D. Funk, L. Bastien, N. Sawyer, C. Rochette, et al. Human prostanoid receptors: cloning and characterization. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 23:499-504, 1995.
3. Abrams, S. E., S. J. Coker, M. J. Clarkson, and K. P. Walsh. Responses of the post-term arterial duct to oxygen, prostaglandin E₂, and the nitric oxide donor, 3-morpholinonyldimethylamine, in lambs and their clinical implications. *Br Heart J* 73:177-181, 1995.
4. Abran, D, Varma DR, Li DY, and Chemtob S. Reduced responses of retinal vessels of the newborn pig to prostaglandins but not to thromboxane. *Can J Physiol Pharmacol* 72:168-173, 1994.
5. Abran, D, Li DY, Varma DR, and Chemtob S. Characterization and ontogeny of PGE₂ and PGF_{2α} receptors on the retinal vasculature of the pig. *Prostaglandins* 50: 253-67, 1995.
6. Adachi, T., J. Aoki, H. Manya, H. Asou, H. Arai, and K. Inoue. PAF analogues capable of inhibiting PAF acetylhydrolase activity suppress migration of isolated rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 235:133-136, 1997.

7. Adams, J., D. Migita, M. Yu, R. Young, S. Hellickson, F. Castro-Vargas, J. Domingo, and P. Lee. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ stimulates hypertrophic growth of cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 271:1179-1186, 1996.
8. Adderley, S. R. and D. J. Fitzgerald. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 274:5038-5046, 1999.
9. Albrecht, U., R. Abu-Issa, B. Ratz, M. Hattori, J. Aoki, H. Arai, K. Inoue, and G. Eichele. Platelet-activating factor acetylhydrolase expression and activity suggest a link between neuronal migration and platelet-activating factor. *Dev Biol* 180:579-593, 1996.
10. Alloatti, G., G. Montrucchio, F. Mariano, C. Tetta, G. Emanuelli, and G. Camussi. Protective effect of verapamil on the cardiac and circulatory alterations induced by platelet-activating factor. *J Cardiovasc Pharmacol* 9:181-186, 1987.
11. Alm, A. Prostaglandin derivatives as ocular hypotensive agents. *Prog Retin Eye Res* 17:291-312, 1998.
12. Alvi, S. A., N. L. Brown, P. R. Bennett, M. G. Elder, and M. H. Sullivan. Corticotrophin-releasing hormone and platelet-activating factor induce transcription of the type-2 cyclo-oxygenase gene in human fetal membranes. *Mol Hum Reprod* 5:476-480, 1999.

13. Anderson, D. F., J. M. Bissonnette, J. J. Faber, and K. L. Thornburg. Central shunt flows and pressures in the mature fetal lamb. *Am J Physiol* 241:H60-H66, 1981.
14. Armstrong, R. A. Platelet prostanoid receptors. *Pharmacol Ther* 72:171-191, 1996.
15. Arnould, T., C. Michiels, and J. Remacle. Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b, and ICAM-1. *Am J Physiol* 264:C1102-C1110, 1993.
16. Aronson, S., G. Gennser, C. Owman, and N. O. Sjoberg. Innervation and contractile response of the human ductus arteriosus. *Eur J Pharmacol* 11:178-186, 1970.
17. Asboth, G., S. Phaneuf, G. N. Europe-Finner, M. Toth, and A. L. Bernal. Prostaglandin E₂ activates phospholipase C and elevates intracellular calcium in cultured myometrial cells: involvement of EP₁ and EP₃ receptor subtypes. *Endocrinology* 137:2572-2579, 1996.
18. Audoly, L. P., L. Ma, I. Feoktistov, S. K. de Foe, M. D. Breyer, and R. M. Breyer. Prostaglandin E-prostanoid-3 receptor activation of cyclic AMP response element-mediated gene transcription. *J Pharmacol Exp Ther* 289:140-148, 1999.
19. Baker, R. R. Enzymes of platelet activating factor synthesis in brain. *Neurochem Res* 20:1345-1351, 1995.

20. Baker, R. R. and H. Y. Chang. Neuronal nuclear acetyltransferases involved in the synthesis of platelet-activating factor are located in the nuclear envelope and show differential losses in activity. *Biochim Biophys Acta* 1345:197-206, 1997.
21. Balboa, M. A., J. Balsinde, M. V. Winstead, J. A. Tischfield, and E. A. Dennis. Novel group V phospholipase A2 involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem* 271:32381-32384, 1996.
22. Balsinde, J. and E. A. Dennis. Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2. *J Biol Chem* 272:16069-16072, 1997.
23. Bastien, L., N. Sawyer, R. Grygorczyk, K. M. Metters, and M. Adam. Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E₂ receptor EP₂ subtype. *J Biol Chem* 269:11873-11877, 1994.
24. Baylink, T. M., S. Mohan, R. J. Fitzsimmons, and D. J. Baylink. Evaluation of signal transduction mechanisms for the mitogenic effects of prostaglandin E₂ in normal human bone cells in vitro. *J Bone Miner Res* 11:1413-1418, 1996.
25. Bazan, H. E., Y. Tao, M. A. DeCoster, and N. G. Bazan. Platelet-activating factor induces cyclooxygenase-2 gene expression in corneal epithelium. Requirement of calcium in the signal transduction pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2492-2501, 1997.

26. Bazan, N. G. and G. Allan. Platelet-activating factor in the modulation of excitatory amino acid neurotransmitter release and of gene expression. *J Lipid Mediat Cell Signal* 14:321-330, 1996.
27. Beauchamp, M. H., A. M. Marrache, X. Hou, F. Gobeil Jr, , S. G. Bernier, P. Lachapelle, D. Abran, C. Quiniou, S. Brault, K. G. Peri, J. Roberts, G. Almazan, D. R. Varma, and S. Chemtob. Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3327-3337, 2002.
28. Benveniste, J., C. Boulet, C. Brink, and C. Labat. The actions of Paf-acether (platelet-activating factor) on guinea-pig isolated heart preparations. *Br J Pharmacol* 80:81-83, 1983.
29. Bessin, P., J. Bonnet, D. Apffel, C. Soulard, L. Desgroux, I. Pelas, and J. Benveniste. Acute circulatory collapse caused by platelet-activating factor (PAF-acether) in dogs. *Eur J Pharmacol* 86:403-413, 1983.
30. Bhattacharya, M., P. Asselin, P. Hardy, A. M. Guerguerian, H. Shichi, X. Hou, D. R. Varma, A. Bouayad, J. C. Fouron, R. I. Clyman and S. Chemtob. Developmental changes in prostaglandin E₂ receptor subtypes in porcine ductus arteriosus. Possible contribution in altered responsiveness to prostaglandin E₂. *Circulation* 100:1751-1756, 1999.
31. Bkaily, G., S. Wang, M. Bui, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. Modulation of cardiac cell Ca²⁺ currents by PAF. *Blood Press Suppl* 3: 59-62, 1996.

32. Bley, K. R., J. C. Hunter, R. M. Eglen, and J. A. Smith. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci* 19:141-147, 1998.
33. Bodach, E., F. Coceani, A. Dumbrille, D. T. Okpako, and P. M. Olley. The response of the isolated ductus arteriosus to transmural stimulation and drugs. *Br J Pharmacol* 71:419-427, 1980.
34. Boie, Y., T. H. Rushmore, A. Darmon-Goodwin, R. Grygorczyk, D. M. Slipetz, K. M. Metters, and M. Abramovitz. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem* 269:12173-12178, 1994.
35. Bonventre, J. V., Z. Huang, M. R. Taheri, E. O'Leary, E. Li, M. A. Moskowitz, and A. Sapirstein. Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature* 390:622-625, 1997.
36. Born, G., G. Dawes, J. Mott, and B. Rennick. The relief of central cyanosis caused by pulmonary arterio-venous shunts by creation of an artificial ductus arteriosus. *J Physiol* 130:167-190, 1955.
37. Bouayad, A., H. Kajino, N. Waleh, J. C. Fouron, G. Andelfinger, D. R. Varma, A. Skoll, A. Vazquez, F. Jr Gobeil, R. I. Clyman, and S. Chemtob. Characterization of PGE₂ receptors in fetal and newborn lamb ductus arteriosus. *Am J Physiol* 280:H2342-H2349, 2001.

38. Bourgain, R. H., R. Andries, P. Braquet, and C. Deby. The effect of inhibition of endothelial cell cyclooxygenase on arterial thrombosis. *Prostaglandins* 30:915-923, 1985.
39. Boyd, J. The nerve supply of the mammalian ductus arteriosus. *J Anat* 75:457-468, 1941.
40. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
41. Braquet, P., L. Touqui, T. Y. Shen, and B. B. Vargaftig. Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol Rev* 39:97-145, 1987.
42. Braun, W. F. A review of prostaglandin therapeutics in reproduction. *Vet Med Small Anim Clin* 75:649-656. 1980.
43. Breder, C. D., D. Dewitt, and R. P. Kraig. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 355:296-315, 1995.
44. Breder, C. D. and C. B. Saper. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res* 713:64-69, 1996.

45. Breyer, M. D. and R. M. Breyer. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* 63:579-605, 2001.
46. Breyer, M. D., H. R. Jacobson, and R. M. Breyer. Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J Am Soc Nephrol* 7: 8-17, 1996.
47. Brizzi, M. F., E. Battaglia, G. Montrucchio, P. Dentelli, L. Del Sorbo, G. Garbarino, L. Pegoraro, and G. Camussi. Thrombopoietin stimulates endothelial cell motility and neoangiogenesis by a platelet-activating factor-dependent mechanism. *Circ Res* 84:785-796, 1999.
48. Bunting, S., L. Buchanan, H. Holzgreffe, and F. A. Fitzpatrick. Pharmacology of thromboxane A₂. In Samuelsson, B., P. Paoletti, and P. Ramwell, eds. Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research. New York. Raven press. 1987, 192.
49. Burke, J. R., L. B. Davern, K. R. Gregor, G. Todderud, J. G. Alford, and K. M. Trampusch. Phosphorylation and calcium influx are not sufficient for the activation of cytosolic phospholipase A₂ in U937 cells: requirement for a Gi alpha-type G-protein. *Biochim Biophys Acta* 1341:223-237, 1997.
50. Burkey, T. H. and J. W. Regan. Activation of mitogen-activated protein kinase by the human prostaglandin EP_{3A} receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 211:152-158, 1995.

51. Bussolino, F., M. Aglietta, F. Sanavio, A. Stacchini, D. Lauri, and G. Camussi. Alkyl-ether phosphoglycerides influence calcium fluxes into human endothelial cells. *J Immunol* 135:2748-2753, 1985.
52. Bussolino, F., M. Arese, G. Montrucchio, L. Barra, L. Primo, R. Benelli, F. Sanavio, M. Aglietta, D. Ghigo, M. R. Rola-Pleszczynski, et al. Platelet activating factor produced *in vitro* by Kaposi's sarcoma cells induces and sustains *in vivo* angiogenesis. *J Clin Invest* 96:940-952, 1995.
53. Bussolino, F., G. Camussi, M. Aglietta, P. Braquet, A. Bosia, G. Pescarmona, F. Sanavio, N. D'Urso, and P. C. Marchisio. Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures. *J Immunol* 139:2439-2446, 1987.
54. Bustamante, S. A., Y. Pang, S. Romero, M. R. Pierce, C. A. Voelker, J. H. Thompson, M. Sandoval, X. Liu, and M. J. Miller. Inducible nitric oxide synthase and the regulation of central vessel caliber in the fetal rat. *Circulation* 94:1948-1953, 1996.
55. Butcher, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036, 1991.
56. Campbell, W. B. Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet activating factor. In Gilman AG, Rall TW, Nies AS, and Taylor P, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York, Pergamon Press. 1990, 600.

57. Campbell, W. and P. V. Halushka. Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet activating factor. In Gilman AG, Rall TW, Nies AS, and Taylor P, eds. The pharmacological basis of therapeutics. New York, Pergamon Press. 1996, 601.
58. Camussi, G., G. Montrucchio, E. Lupia, A. De Martino, L. Perona, M. Arese, A. Vercellone, A. Toniolo, and F. Bussolino. Platelet-activating factor directly stimulates *in vitro* migration of endothelial cells and promotes *in vivo* angiogenesis by a heparin- dependent mechanism. *J Immunol* 154:6492-6501, 1995.
59. Cao, Y., D. M. Stafforini, G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, and S. M. Prescott. Expression of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation. *J Biol Chem* 273:4012-4020, 1998.
60. Caplan, M. S., M. Lickerman, L. Adler, G. N. Dietsch, and A. Yu. The role of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 42:779-783, 1997.
61. Castano, E., M. Dalmau, M. Marti, F. Berrocal, R. Bartrons, and J. Gil. Inhibition of DNA synthesis by aspirin in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 280:366-372, 1997.
62. Chatfield, B. A., I. F. McMurtry, S. L. Hall, and S. H. Abman. Hemodynamic effects of endothelin-1 on ovine fetal pulmonary circulation. *Am J Physiol* 261:R182-R187, 1991.

63. Chemtob, S., D. Y. Li, D. Abran, P. Hardy, K. G. Peri, and D.R. Varma. The role of prostaglandin receptors in regulating cerebral blood flow in the perinatal period. *Acta Paediatrica* 85:517-524, 1996.
64. Chilton, F. H. and T. R. Connell. 1-ether-linked phosphoglycerides. Major endogenous sources of arachidonate in the human neutrophil. *J Biol Chem* 263:5260-5265, 1988.
65. Clark, J. D., A. R. Schievella, E. A. Nalefski, and L. L. Lin. Cytosolic phospholipase A2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:83-117, 1995.
66. Cluzel, M., B. J. Udem, and F. H. Chilton. Release of platelet-activating factor and the metabolism of leukotriene B₄ by the human neutrophil when studied in a cell superfusion model. *J Immunol* 143:3659-3665, 1989.
67. Clyman, R. I., F. Mauray, C. Roman, and A. M. Rudolph. PGE₂ is a more potent vasodilator of the lamb ductus arteriosus than is either PGI₂ or 6-keto-PGF_{1α}. *Prostaglandins* 16:259-264, 1978.
68. Clyman, R. I., F. Mauray, L. M. Demers, A. M. Rudolph, and C. Roman. Does oxygen regulate prostaglandin-induced relaxation in the lamb ductus arteriosus? *Prostaglandins* 19:489-498, 1980a.

69. Clyman, R. I., F. Mauray, C. Roman, A. M. Rudolph, and M. A. Heymann. Circulating prostaglandin E₂ concentrations and patent ductus arteriosus in fetal and neonatal lambs. *J Pediatr* 97:455-461, 1980b.
70. Clyman, R. I., F. Mauray, C. Roman, A. M. Rudolph, and M. A. Heymann. Glucocorticoids alter the sensitivity of the lamb ductus arteriosus to prostaglandin E₂. *J Pediatr* 98:126-128, 1981.
71. Clyman, R. I., F. Mauray, C. Roman, M. A. Heymann, and B. Payne. Factors determining the loss of ductus arteriosus responsiveness to prostaglandin E. *Circulation* 68:433-436, 1983.
72. Clyman, R. I. Ductus arteriosus: current theories of prenatal and postnatal regulation. *Semin Perinatol* 11:64-71, 1987.
73. Clyman, R. I., N. Waleh, S. M. Black, R. K. Riemer, F. Mauray and Y. Q. Chen. Regulation of ductus arteriosus patency by nitric oxide in fetal lambs: the role of gestation, oxygen tension, and vasa vasorum. *Pediatr Res* 43:633-44, 1998.
74. Clyman, R. I., C. Y. Chan, F. Mauray, Y. Q. Chen, W. Cox, S. R. Seidner, E. M. Lord, H. Weiss, N. Waleh, S. M. Evans, and C. J. Koch. Permanent anatomic closure of the ductus arteriosus in newborn baboons: the roles of postnatal constriction, hypoxia, and gestation. *Pediatr Res* 45:19-29, 1999a.

75. Clyman, R. I., P. Hardy, N. Waleh, Y. Q. Chen, F. Mauray, J. C. Fouron, and S. Chemtob. Cyclooxygenase-2 plays a significant role in regulating the tone of the fetal lamb ductus arteriosus. *Am J Physiol* 276:R913-R921, 1999b.
76. Coceani, F., I. Bishai, E. White, E. Bodach, and P. M. Olley. Action of prostaglandins, endoperoxides, and thromboxanes on the lamb ductus arteriosus. *Am J Physiol* 234:H117-H122, 1978a.
77. Coceani, F., E. Bodach, E. White, I. Bishai, and P. M. Olley. Prostaglandin I₂ is less relaxant than prostaglandin E₂ on the lamb ductus arteriosus. *Prostaglandins* 15:551-556, 1978b.
78. Coceani, F., D. Huhtanen, N. C. Hamilton, I. Bishai, and P. M. Olley. Involvement of intramural prostaglandin E₂ in prenatal patency of the lamb ductus arteriosus. *Can J Physiol Pharmacol* 64:737-744, 1986.
79. Coceani, F., V. M. Jhamandas, E. Bodach, J. Labuc, P. M. Olley, and P. Borgeat. Evidence against a role for lipoxygenase-derived products of arachidonic acid in the lamb ductus arteriosus. *Can J Physiol Pharmacol* 60:345-349, 1982.
80. Coceani, F. and L. Kelsey. Endothelin-1 release from lamb ductus arteriosus: relevance to postnatal closure of the vessel. *Can J Physiol Pharmacol* 69:218-221, 1991.

81. Coceani, F., L. Kelsey, and E. Seidlitz. Evidence for an effector role of endothelin in closure of the ductus arteriosus at birth. *Can J Physiol Pharmacol* 70:1061-1064, 1992.
82. Coceani, F. and P. M. Olley. The response of the ductus arteriosus to prostaglandins. *Can J Physiol Pharmacol* 51:220-225, 1973.
83. Coceani, F. and P. M. Olley. The control of cardiovascular shunts in the fetal and perinatal period. *Can J Physiol Pharmacol* 66:1129-1134, 1988.
84. Coceani, F., P. M. Olley, and E. Bodach. Lamb ductus arteriosus: effect of prostaglandin synthesis inhibitors on the muscle tone and the response to prostaglandin E₂. *Prostaglandins* 9:299-308, 1975.
85. Coceani, F., P. M. Olley, and J. E. Lock. Prostaglandins, ductus arteriosus, pulmonary circulation: current concepts and clinical potential. *Eur J Clin Pharmacol* 18:75-81, 1980.
86. Coceani, F., E. White, E. Bodach, and P. M. Olley. Age-dependent changes in the response of the lamb ductus arteriosus to oxygen and ibuprofen. *Can J Physiol Pharmacol* 57:825-831, 1979.
87. Coceani, F., J. Wright, and C. Breen. Ductus arteriosus: involvement of a sarcolemmal cytochrome P-450 in O₂ constriction? *Can J Physiol Pharmacol* 67:1448-1450, 1989.

88. Coceani, F., C. Ackerley, E. Seidlitz, and L. Kelsey. Function of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the ductus arteriosus from foetal lamb: differential development and change by oxygen and endotoxin. *Br J Pharmacol* 132:241-251, 2001.
89. Coffey, R. J., C. J. Hawkey, L. Damstrup, R. Graves-Deal, V. C. Daniel, P. J. Dempsey, R. Chinery, S. C. Kirkland, R. N. DuBois, T. L. Jetton, and J. D. Morrow. Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:657-662, 1997.
90. Coleman, R. A., I. Kennedy, and P. P. A Humphrey. Prostanoids and their receptors. In Hansch C, Sammes PG, and Taylor JB, eds. *Comprehensive Medical Chemistry. The rationale design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds*. Oxford, UK, Pergamon Press. 1990. 643-714.
91. Coleman, R. A., S. P. Grix, S. A. Head, J. B. Louttit, A. Mallett, and R. L. Sheldrick. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 47:151-168, 1994a.
92. Coleman, R. A., W. L. Smith, and S. Narumiya. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46:205-229, 1994b.

93. Crofford, L. J. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol* 24 Suppl 49:15-19, 1997.
94. D'Humieres, S., F. Russo-Marie, and B. B. Vargaftig. PAF-acether-induced synthesis of prostacyclin by human endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 131:13-19, 1986.
95. Danesch, U., P. C. Weber, and A. Sellmayer. Arachidonic acid increases c-fos and Egr-1 mRNA in 3T3 fibroblasts by formation of prostaglandin E₂ and activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 269:27258-27263, 1994.
96. Davies, P., P. J. Bailey, M. M. Goldenberg, and A. W. Ford-Hutchinson. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu Rev Immunol* 2:335-357, 1984.
97. Dawes, G., J. Mott, and J. Widdicombe. The patency of the ductus arteriosus in newborn lambs and its physiological consequences. *J Physiol* 128:361-383, 1955.
98. de Gaetano, G., C. Cerletti, E. Dejana, and J. Vermynen. Current issues in thrombosis prevention with antiplatelet drugs. *Drugs* 31:517-549, 1986.
99. de Reeder, E. G., A. C. Gittenberger-de Groot, J. C. van Munsteren, R. E. Poelmann, D. F. Patterson, and M. J. Keirse. Distribution of prostacyclin synthase, 6-keto-prostaglandin F_{1α}, and 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase in the normal and persistent ductus arteriosus of the dog. *Am J Pathol* 135:881-887, 1989.

107. Dumont, I., K. G. Peri, P. Hardy, X. Hou, A. K. Martinez-Bermudez, S. Molotchnikoff, D. R. Varma, and S. Chemtob. PGE₂, via EP₃ receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period. *Am J Physiol* 275:R1812-R1821, 1998.
108. Dunn, M. J. and V. L. Hood. Prostaglandins and the kidney. *Am J Physiol* 233:169-184, 1977.
109. Dusting, G. J., S. Moncada, and J. R. Vane. Vascular actions of arachidonic acid and its metabolites in perfused mesenteric and femoral beds of the dog. *Eur J Pharmacol* 49:65-72, 1978.
110. Eguchi, N., T. Minami, N. Shirafuji, Y. Kanaoka, T. Tanaka, A. Nagata, N. Yoshida, Y. Urade, S. Ito, and O. Hayaishi. Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:726-730, 1999.
111. Elstad, M. R., S. M. Prescott, T. M. McIntyre, and G. A. Zimmerman. Synthesis and release of platelet-activating factor by stimulated human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 140:1618-1624, 1988.
112. Emeis, J. J. and C. Kluft. PAF-acether-induced release of tissue-type plasminogen activator from vessel walls. *Blood* 66:86-91, 1985.

113. Epstein, L. G. and H. E. Gendelman. Human immunodeficiency virus type 1 infection of the nervous system: pathogenetic mechanisms. *Ann Neurol* 33:429-436, 1993.
114. Etienne, A., F. Hecquet, C. Guilnard, C. Soulard, and P. Braquet. Inhibition of rat endotoxin-induced lethality by BN 52021 and BN 52063, compounds with PAF-acether antagonistic effect and protease-inhibitory activity. *Int J Tissue React* 9:19-26, 1987.
115. Farrugia, G., W. A. Irons, J. L. Rae, M. G. Sarr, and J. H. Szurszewski. Activation of whole cell currents in isolated human jejunal circular smooth muscle cells by carbon monoxide. *Am J Physiol* 264:G1184-G1189, 1993.
116. Fay, F. S. Guinea pig ductus arteriosus. I. Cellular and metabolic basis for oxygen sensitivity. *Am J Physiol* 221: 470-479, 1971.
117. Fay, F. S. and P. H. Cooke. Guinea pig ductus arteriosus. II. Irreversible closure after birth. *Am J Physiol* 222:841-849, 1972.
118. Fay, F. S. and F. F. Jobsis. Guinea pig ductus arteriosus. 3. Light absorption changes during response to O₂. *Am J Physiol* 223:588-595, 1972.
119. Fedyk, E. R. and R. P. Phipps. Prostaglandin E₂ receptors of the EP₂ and EP₄ subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10978-10983, 1996.

120. Felli, M. P., C. Moschella, A. R. Farina, E. Alesse, I. Screpanti, D. Teti, L. Frati, and A. Gulino. Prostaglandin E₂ inhibits the interleukin-2 promoter activity through down-regulation of the Oct-dependent transcription of the octamer motif. *Cell Immunol* 172:229-234, 1996.
121. Feuerstein, G. and R. Goldstein. Effect of PAF on the cardiovascular system. In Snyder, F., ed. Platelet Activating Factor and Related Lipid Mediators. New York, Plenum. 1987, 403.
122. Filion, F., N. Bouchard, A. K. Goff, J. G. Lussier, and J. Sirois. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation *in vivo*. *J Biol Chem* 276:34323-34330, 2001.
123. Fitzpatrick, F. A. and R. C. Murphy. Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: formation and biological actions of "epoxygenase"-derived eicosanoids. *Pharmacol Rev* 40:229-241, 1988.
124. Forsberg, L., L. Leeb, S. Thoren, R. Morgenstern, and P. Jakobsson. Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett* 471:78-82, 2000.
125. Fox, J. J., J. W. Ziegler, D. D. Ivy, A. C. Halbower, J. P. Kinsella, and S. H. Abman. Role of nitric oxide and cGMP system in regulation of ductus arteriosus tone in ovine fetus. *Am J Physiol* 271:H2638-H2645, 1996.

126. Freed, M. D., M. A. Heymann, A. B. Lewis, S. L. Roehl, and R. C. Kensey. Prostaglandin E₁ infants with ductus arteriosus-dependent congenital heart disease. *Circulation* 64:899-905, 1981.
127. Friedman, W. F., M. P. Printz, S. E. Kirkpatrick, and E. J. Hoskins. The vasoactivity of the fetal lamb ductus arteriosus studied in utero. *Pediatr Res* 17:331-337, 1983.
128. Frolich, J. C. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* 18:30-34, 1997.
129. Fulton, A. M., S. Z. Zhang, and Y. C. Chong. Role of the prostaglandin E₂ receptor in mammary tumor metastasis. *Cancer Res* 51:2047-2050, 1991.
130. Funk, C. D., L. Furci, G. A. FitzGerald, R. Grygorczyk, C. Rochette, M. A. Bayne, M. Abramovitz, M. Adam, and K. M. Metters. Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP₁ subtype. *J Biol Chem* 268:26767-26772, 1993.
131. Gashler, A. and V. P. Sukhatme. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50:191-224, 1995.
132. Geraci, M. W., B. Gao, D. C. Shepherd, M. D. Moore, J. Y. Westcott, K. A. Fagan, L. A. Alger, R. M. Tuder, and N. F. Voelkel. Pulmonary prostacyclin

synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 103:1509-1515, 1999.

133. Gersony, W. M. Patent ductus arteriosus in the neonate. *Pediatr Clin North Am* 33:545-560, 1986.
134. Giles, H. and P. Leff. The biology and pharmacology of PGD₂. *Prostaglandins* 35:277-300, 1988.
135. Giovannucci, E., K. M. Egan, D. J. Hunter, M. J. Stampfer, G. A. Colditz, W. C. Willett, and F. E. Speizer. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 333:609-614, 1995.
136. Glantschnig, H., F. Varga, and K. Klaushofer. The cellular protooncogenes c-fos and egr-1 are regulated by prostacyclin in rodent osteoblasts and fibroblasts. *Endocrinology* 137:4536-4541, 1996.
137. Gobbetti, A., M. Zerani, L. B. Cardellini, and V. Botte. Plasma prostaglandin F₂ alpha and reproduction in the female *Triturus carnifex* (Laur.). *Prostaglandins* 42:269-277, 1991.
138. Goodwin, J. S. and D. R. Webb. Regulation of the immune response by prostaglandins. *Clin Immunol Immunopathol.* 15:106-122, 1980.

139. Guan, Y., Y. Zhang, R. M. Breyer, B. Fowler, L. Davis, R. L. Hebert, and M. D. Breyer. Prostaglandin E₂ inhibits renal collecting duct Na⁺ absorption by activating the EP1 receptor. *J Clin Invest* 102:194-201, 1998b.
140. Guan, Z., S. Y. Buckman, A. P. Pentland, D. J. Templeton, and A. R. Morrison. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 273:12901-12908, 1998a.
141. Guerguerian, A. M., P. Hardy, M. Bhattacharya, P. Olley, R. I. Clyman, J. C. Fouron, and S. Chemtob. Expression of cyclooxygenases in ductus arteriosus of fetal and newborn pigs. *Am J Obstet Gynecol* 179:1618-1626, 1998.
142. Halushka, P. V. Thromboxane A₂ receptors: where have you gone? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 60:175-189, 2000.
143. Hammerman, C. Patent ductus arteriosus. Clinical relevance of prostaglandins and prostaglandin inhibitors in PDA pathophysiology and treatment. *Clin Perinatol* 22:457-479, 1995.
144. Han, R., S. Tsui, and T.J. Smith. Up-regulation of prostaglandin E₂ synthesis by interleukin-1beta in human orbital fibroblasts involves coordinate induction of prostaglandin-endoperoxide H synthase-2 and glutathione-dependent prostaglandin E₂ synthase expression. *J Biol Chem* 277:16355-64, 2002.

145. Hanssens, M., M. J. Keirse, F. Vankelecom, and F. A. Van Assche. Fetal and neonatal effects of treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors in pregnancy. *Obstet Gynecol* 78:128-135, 1991.
146. Hardy, P, Abran D, Li DY, Fernandez H, Varma DR, and Chemtob S. Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet: interaction with prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 580-591, 1994.
147. Harrison, K. A. and R. C. Murphy. Isoleukotrienes are biologically active free radical products of lipid peroxidation. *J Biol Chem* 270:17273-17278, 1995.
148. Hart, HE, and Greenwald EB. Scintillation proximity assay (SPA): a new method of immunoassay - direct and inhibition mode detection with human albumin and rabbit antihuman albumin *Mol Immunol* 16: 265-267, 1979.
149. Hattori, K., H. Adachi, A. Matsuzawa, K. Yamamoto, M. Tsujimoto, J. Aoki, M. Hattori, H. Arai, and K. Inoue. cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF acetylhydrolase. *J Biol Chem* 271:33032-33038, 1996.
150. Hattori, K., M. Hattori, H. Adachi, M. Tsujimoto, H. Arai, and K. Inoue. Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase II from bovine liver cytosol. *J Biol Chem* 270:22308-22313, 1995.

151. Hattori, M., H. Adachi, M. Tsujimoto, H. Arai, and K. Inoue. Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [corrected]. *Nature* 370:216-218, 1994.
152. Hattori, M., H. Arai, and K. Inoue. Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 268:18748-18753, 1993.
153. Hebert, R. L., H. R. Jacobson, and M. D. Breyer. Triple signal transduction model for the mechanism of PGE₂ actions in rabbit cortical collecting duct. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 42:143-148, 1991.
154. Heller, R., F. Bussolino, D. Ghigo, G. Garbarino, G. Pescarmona, U. Till, and A. Bosia. Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. II. Platelet-activating factor induces platelet-activating factor synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 149:3682-3688, 1992.
155. Hermoso, M., N. Barrera, B. Morales, S. Perez, and M. Villalon. Platelet activating factor increases ciliary activity in the hamster oviduct through epithelial production of prostaglandin E₂. *Pflugers Arch* 442:336-345, 2001.
156. Herschman, H. R. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1299:125-140, 1996.

157. Heymann, M. A. and A. M. Rudolph. Control of the ductus arteriosus. *Physiol Rev.* 55:62-78, 1975.
158. Hiramoto, M., H. Yoshida, T. Imaizumi, N. Yoshimizu, and K. Satoh. A mutation in plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (Val279- →Phe) is a genetic risk factor for stroke. *Stroke* 28:2417-2420, 1997.
159. Hirashima, Y., S. Endo, T. Ohmori, R. Kato, and A. Takaku. Platelet-activating factor (PAF) concentration and PAF acetylhydrolase activity in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 80:31-36, 1994.
160. Hirata, M., Y. Hayashi, F. Ushikubi, Y. Yokota, R. Kageyama, S. Nakanishi, and S. Narumiya. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A₂ receptor. *Nature* 349:617-620, 1991.
161. Hirata, M., A. Kakizuka, M. Aizawa, F. Ushikubi, and S. Narumiya. Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11192-11196, 1994.
162. Hirata, T., F. Ushikubi, A. Kakizuka, M. Okuma, and S. Narumiya. Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest* 97:949-956, 1996.

163. Ho, Y. S., L. Swenson, U. Derewenda, L. Serre, Y. Wei, Z. Dauter, M. Hattori, T. Adachi, J. Aoki, H. Arai, K. Inoue, and Z. S. Derewenda. Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer. *Nature* 385:89-93, 1997.
164. Hofbauer, B., A. K. Saluja, M. Bhatia, J. L. Frossard, H. S. Lee, L. Bhagat, and M. L. Steer. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* 115:1238-1247, 1998.
165. Honda, A., Y. Sugimoto, T. Namba, A. Watabe, A. Irie, M. Negishi, S. Narumiya, and A. Ichikawa. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₂ subtype. *J Biol Chem* 268:7759-7762, 1993.
166. Hornblad, P. Y. and K. S. Larsson. Studies on the closure of the ductus arteriosus. IX. Transitory effect of phenoxybenzamine on ductal closure in the guinea-pig. *Acta Pharmacol Toxicol(Copenh)* 31:149-152, 1972.
167. Hou, X., F. Gobeil, Jr., K. Peri, G. Speranza, A. M. Marrache, P. Lachapelle, J. Roberts, D. R. Varma, S. Chemtob, and E. F. Ellis. Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F(2t)- isoprostane (8-iso-prostaglandin F_{2α}) in immature pig periventricular brain microvessels. *Stroke* 31:516-524, 2000.
168. Hou, X., L. J. Roberts, D. F. Taber, J. D. Morrow, K. Kanai, F. Gobeil, Jr., M. H. Beauchamp, S. G. Bernier, G. Lepage, D. R. Varma, and S. Chemtob. 2,3-Dinor-5,6-

- dihydro-15-F(2t)-isoprostane: a bioactive prostanoid metabolite. *Am J Physiol* 281:R391-R400, 2001.
169. Huwiler, A., G. Staudt, R. M. Kramer, and J. Pfeilschifter. Cross-talk between secretory phospholipase A2 and cytosolic phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *Biochim Biophys Acta* 1348:257-272, 1997.
170. Hwang, S. B., M. H. Lam, and S. S. Pong. Ionic and GTP regulation of binding of platelet-activating factor to receptors and platelet-activating factor-induced activation of GTPase in rabbit platelet membranes. *J Biol Chem* 261:532-537, 1986.
171. Ibe, BO, Hibler S, and Raj JU. Platelet-activating factor modulates pulmonary vasomotor tone in the perinatal lamb. *J Appl Physiol* 85: 1079-1085, 1998.
172. Ibe, B. O., H. H. Pham, P. Kaapa, and J. U. Raj. Maturation changes in ovine pulmonary metabolism of platelet-activating factor: implications for postnatal adaptation. *Mol Genet Metab* 74: 385-95, 2001.
173. Ichihara, S., Y. Yamada, and M. Yokota. Association of a G994-->T missense mutation in the plasma platelet- activating factor acetylhydrolase gene with genetic susceptibility to nonfamilial dilated cardiomyopathy in Japanese. *Circulation* 98:1881-1885, 1998.
174. Ikeda, M., E. H. Rubinstein, and R. R. Sonnenschein. Interaction of three factors in the closure of the ductus arteriosus. *Proc Soc Exp Biol Med* 143:354-359, 1973.

175. Imaizumi, T. A., D. M. Stafforini, Y. Yamada, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, and G. A. Zimmerman. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* 238:5-20, 1995.
176. Insel, P. Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents: drugs employed in the treatment of arthritis and gout. In Gilman AG, Rall TW, Nies AS, and Taylor P, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York, Pergamon Press. 1996, 617-635.
177. Irie, A., Y. Sugimoto, T. Namba, A. Harazono, A. Honda, A. Watabe, M. Negishi, S. Narumiya, and A. Ichikawa. Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP₃ subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem* 217:313-318, 1993.
178. Ishii, S., T. Kuwaki, T. Nagase, K. Maki, F. Tashiro, S. Sunaga, W. H. Cao, K. Kume, Y. Fukuchi, K. Ikuta, J. Miyazaki, M. Kumada, and T. Shimizu. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med* 187:1779-88, 1998.
179. Ito, S., O. A. Carretero, K. Abe, W. H. Beierwaltes, and K. Yoshinaga. Effect of prostanoids on renin release from rabbit afferent arterioles with and without macula densa. *Kidney Int* 35:1138-1144, 1989.
180. Jakobsson, P. J., R. Morgenstern, J. Mancini, A. Ford-Hutchinson, and B. Persson. Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of

membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci* 8:689-692, 1999a.

181. Jakobsson, P. J., S. Thoren, R. Morgenstern, and B. Samuelsson. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7220-7225, 1999b.
182. Jancar, S., G. De Giaccobi, M. Mariano, J. M. Mencia-Huerta, P. Sirois, and P. Braquet. Immune complex induced pancreatitis: effect of BN 52021, a selective antagonist of platelet-activating factor. *Prostaglandins* 35:757-770, 1988.
183. Janero, D. R. and C. Burghardt. Production and release of platelet-activating factor by the injured heart-muscle cell (cardiomyocyte). *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 67:201-218, 1990.
184. Jarkovska, D., T. Janatova, J. Hruda, B. Ostadal, and M. Samanek. Effect of prostaglandin E₂ on the ductus arteriosus in the newborn rat. An ultrastructural study. *Physiol Res* 41:323-330, 1992.
185. Johansson, C. and S. Bergstrom. Prostaglandin and protection of the gastroduodenal mucosa. *Scand J Gastroenterol Suppl* 77:1-46, 1982.

186. Jones, SA, Adamson SL, Bishai I, Lees J, Engelberts D, and Coceani F. Eicosanoids in third ventricular cerebrospinal fluid of fetal and newborn sheep. *Am J Physiol* 264: R135-R142, 1993.
187. Kajino, H, Roman C, Clyman RI. Renal effects of cyclooxygenase-2 inhibition in fetal lambs. *Biol Neonate* 82: 257-62, 2002.
188. Kamitani, T., M. Katamoto, M. Tatsumi, K. Katsuta, T. Ono, H. Kikuchi, and S. Kumada. Mechanism(s) of the hypotensive effect of synthetic 1-O-octadecyl-2-O-acetyl-glycero-3-phosphorylcholine. *Eur J Pharmacol* 98:357-366, 1984.
189. Kanai, N., R. Lu, J. A. Satriano, Y. Bao, A. W. Wolkoff, and V. L. Schuster. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 268:866-869, 1995.
190. Kaplan, N. and A. M. Rudolph. Physiologic studies of pulmonary circulation and ductus arteriosus of sheep and goat fetuses. Application of cineangiographic techniques. *Invest Radiol* 4:68-82, 1969.
191. Kato, K., G. D. Clark, N. G. Bazan, and C. F. Zorumski. Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. *Nature* 367:175-179, 1994.
192. Katoh, H., A. Watabe, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, and M. Negishi. Characterization of the signal transduction of prostaglandin E receptor EP₁ subtype

- in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 1244:41-48, 1995.
193. Katoh, H., M. Negishi, and A. Ichikawa. Prostaglandin E receptor EP₃ subtype induces neurite retraction via small GTPase Rho. *J Biol Chem* 271:29780-29784, 1996.
194. Katsuyama, M., N. Nishigaki, Y. Sugimoto, K. Morimoto, M. Negishi, S. Narumiya, and A. Ichikawa. The mouse prostaglandin E receptor EP₂ subtype: cloning, expression, and northern blot analysis. *FEBS Lett* 372:151-156, 1995.
195. Kaufmann, W. E., P. F. Worley, J. Pegg, M. Bremer, and P. Isakson. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2317-2321, 1996.
196. Keen, M., E. Kelly, and J. MacDermot. Prostaglandin receptors in the cardiovascular system: potential selectivity from receptor subtypes or modified responsiveness. *Eicosanoids* 2:193-197, 1989.
197. Kelley, R. I. Review: the cerebrohepatorenal syndrome of Zellweger, morphologic and metabolic aspects. *Am J Med Genet* 16:503-517, 1983.
198. Kelner, M. J. and S. F. Ugluk. PDGF-induces the glutathione-dependent enzyme PGH₂/PGE₂ isomerase in NIH3T3 and pEJ transformed fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 198:298-303, 1994.

199. Kennedy, B. P., P. Payette, J. Mudgett, P. Vadas, W. Pruzanski, M. Kwan, C. Tang, D. E. Rancourt, and W. A. Cromlish. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem* 270:22378-22385, 1995.
200. Kennedy, C. R., Y. Zhang, S. Brandon, Y. Guan, K. Coffee, C. D. Funk, M. A. Magnuson, J. A. Oates, M. D. Breyer, and R. M. Breyer. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP₂ receptor. *Nat Med* 5:217-220, 1999.
201. Kim, J. S., H. D. Chae, S. Y. Choi, and K. T. Kim. Transcriptional enhancement of tyrosine hydroxylase by prostaglandin E₂ in SK-N-BE(2) C cells. *Brain Res Mol Brain Res* 39:177-184, 1996.
202. Kim, J. S., H. D. Chae, T. H. Joh, and K. T. Kim. Stimulation of human DBH gene expression by prostaglandin E₂ in human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *J Mol Neurosci* 9:143-150, 1997.
203. Kim, Y. D., R. M. Danchak, K. F. Heim, D. E. Lees, and A. K. Myers. Constriction of canine coronary arteries by platelet activating factor after brief ischemia. *Prostaglandins* 46:269-276, 1993.
204. Kinsella, B. T., D. J. O'Mahony, and G. A. FitzGerald. The human thromboxane A₂ receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins G_q and

- G_{11} *in vivo* and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin $F_{2\alpha}$. *J Pharmacol Exp Ther* 281:957-964, 1997.
205. Kishi, H., H. K. Mishima, and U. Yamashita. Effect of cytokines and prostaglandins on the growth of chick retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 13:833-837, 1994.
206. Konger, R. L., R. Malaviya, and A. P. Pentland. Growth regulation of primary human keratinocytes by prostaglandin E receptor EP_2 and EP_3 subtypes. *Biochim Biophys Acta* 1401:221-234, 1998.
207. Kornecki, E. and Y. H. Ehrlich. Calcium ion mobilization in neuronal cells induced by PAF. *Lipids* 26:1243-1246, 1991.
208. Koshihara, Y. and M. Kawamura. Inhibitory effect of prostaglandin D_2 on DNA synthesis in nuclei. *Prostaglandins Leukot Med* 23:253-265, 1986.
209. Kotani M, Tanaka I, Ogawa Y, Usui T, Tamura N, Mori K, Narumiya S, Yoshimi T, Nakao K. Structural organization of the human prostaglandin EP_3 receptor subtype gene (PTGER3). *Genomics* 40: 425-34, 1997.
210. Kovalcik, V. The response of the isolated ductus arteriosus to oxygen and anoxia. *J Physiol* 169:185-197, 1963.

211. Kramer, R. M. and J. D. Sharp. Structure, function and regulation of Ca^{2+} -sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Lett* 410:49-53, 1997.
212. Kriska, M., V. Smiesko, C. Cerletti, and A. del Maschio. Interaction of prostaglandins and the myogenic factor in the mechanism of closure of the ductus arteriosus. *Physiol Bohemoslov* 39:207-216, 1990.
213. Kudlacz, E. M., H. A. Navarro, J. P. Eylers, S. S. Dobbins, S. E. Lappi, and T. A. Slotkin. Selective linkage of beta-adrenergic receptors to functional responses in developing rat lung and liver: phosphatidic acid phosphatase, ornithine decarboxylase and lung liquid reabsorption. *J Dev Physiol* 12:129-34, 1989.
214. Kudo, I. and M. Murakami. Diverse functional coupling of prostanoid biosynthetic enzymes in various cell types. *Adv Exp Med Biol* 469:29-35, 1999.
215. Kulmacz, R. J. and L. H. Wang. Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270:24019-24023, 1995.
216. Kumar, R., S. A. Harvey, M. Kester, D. J. Hanahan, and M. S. Olson. Production and effects of platelet-activating factor in the rat brain. *Biochim Biophys Acta* 963:375-383, 1988.

217. Kuriyama, H., K. Kitamura, and H. Nabata. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol Rev* 47:387-573, 1995.
218. Kurzok, R. and C. Lieb. Biological studies of human semen. II. The actions of semen on human uterus. *Proc Soc Exp Biol Med* 28:268-272, 1930.
219. Kutchera, W., D. A. Jones, N. Matsunami, J. Groden, T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman, R. L. White, and S. M. Prescott. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4816-4820, 1996.
220. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
221. Lahaie, I., P. Hardy, X. Hou, H. Hassessian, P. Asselin, P. Lachapelle, G. Almazan, D. R. Varma, J. D. Morrow, L. J. Roberts, and S. Chemtob. A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F_{2α} on retinal vessels. *Am J Physiol* 274:R1406-R1416, 1998.
222. Lai, F. M., C. A. Shepherd, P. Cervoni, and A. Wissner. Hypotensive and vasodilatory activity of (+/-) 1-o-octadecyl-2-acetyl glyceryl-3-phosphorylcholine in the normotensive rat. *Life Sci* 32:1159-1166, 1983.

223. Langenbach, R., S. G. Morham, H. F. Tiano, C. D. Loftin, B. I. Ghanayem, P. C. Chulada, J. F. Mahler, B. J. Davis, and C. A. Lee. Disruption of the mouse cyclooxygenase 1 gene. Characteristics of the mutant and areas of future study. *Adv Exp Med Biol* 407:87-92, 1997.
224. Latifpour, J., and D. B. Bylund. Characterization of adrenergic receptor binding in rat lung: physiological regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 224:186-92, 1983.
225. Lave, D., C. James, H. Rajoharison, A. Floch, C. Robaut, and P. Sedivy. [PAF-acether antagonistic pyrrolo[1,2-c]thiazoles: from RP 48740 to RP 59227]. *J Pharm Belg* 45:219-223, 1990.
226. Lee, E. S., J. Jiang, G. C. Sund, W. T. Simonson, J. Graham, G. Dietsch, B. Schimpf, S. Bieg, G. Peterman, and A. Lernmark. Recombinant human platelet-activating factor acetylhydrolase reduces the frequency of diabetes in the diabetes-prone BB rat. *Diabetes* 48:43-49, 1999.
227. Lee, T. C. Biosynthesis of platelet activating factor. Substrate specificity of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine: acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen microsomes. *J Biol Chem* 260:10952-10955, 1985.
228. Lee, T. C., B. Malone, and F. Snyder. A new de novo pathway for the formation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerols, precursors of platelet activating factor. Biochemical characterization of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-P:acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen. *J Biol Chem* 261:5373-5377, 1986.

229. Leffler, C. W. and D. W. Busija. Arachidonate metabolism on the cerebral surface of newborn pigs. *Prostaglandins* 30:811-817, 1985.
230. Leffler, C. W. and D. W. Busija. Prostanoids and pial arteriolar diameter in hypotensive newborn piglets. *Am J Physiol* 252:H687-H691, 1987.
231. Lefort, J., P. Sedivy, S. Desquand, J. Randon, E. Coeffier, I. Maridonneau-Parini, A. Floch, J. Benveniste, and B. B. Vargaftig. Pharmacological profile of 48740 RP, a PAF-acether antagonist. *Eur J Pharmacol* 150:257-268, 1988.
232. Lehr, H. A., J. Seemuller, C. Hubner, M. D. Menger, and K. Messmer. Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium interaction *in vivo* involves the receptor for platelet-activating factor. *Arterioscler Thromb* 13:1013-1018, 1993.
233. Leslie, C. C. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 272:16709-16712, 1997.
234. Levi, R., J. A. Burke, Z. G. Guo, Y. Hattori, C. M. Hoppens, L. M. McManus, D. J. Hanahan, and R. N. Pinckard. Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC). A putative mediator of cardiac anaphylaxis in the guinea pig. *Circ Res* 54:117-124, 1984.
235. Levi, R. and K. M. Mullane. Isolated coronary-perfused mammalian heart: assessment of eicosanoid and platelet-activating factor release and effects. *Methods Enzymol.* 187:610-621, 1990.

236. Levin, R. M., S. B. Malkowicz, D. Jacobowitz, and A. J. Wein. The ontogeny of the autonomic innervation and contractile response of the rabbit urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 219:250-7, 1981.
237. Li, DY, Varma DR, and Chemtob S. Up-regulation of brain PGE₂ and PGF_{2α} receptors and receptor- coupled second messengers by cyclooxygenase inhibition in newborn pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 15-19, 1995.
238. Li, DY, Abran D, Peri KG, Varma DR, and Chemtob S. Inhibition of prostaglandin synthesis in newborn pigs increases cerebral microvessel prostaglandin F_{2α} and prostaglandin E₂ receptors, their second messengers and vasoconstrictor response to adult levels. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 370-377, 1996.
239. Lipton, S. A. HIV-related neuronal injury. Potential therapeutic intervention with calcium channel antagonists and NMDA antagonists. *Mol Neurobiol* 8:181-196, 1994.
240. Loftin, C. D., D. B. Trivedi, H. F. Tiano, J. A. Clark, C. A. Lee, J. A. Epstein, S. G. Morham, M. D. Breyer, M. Nguyen, B. M. Hawkins, J. L. Goulet, O. Smithies, B. H. Koller, and R. Langenbach. Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1059-1064, 2001.

241. Lu, R., N. Kanai, Y. Bao, and V. L. Schuster. Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT). *J Clin Invest* 98:1142-1149, 1996.
242. Lucas, A. and M. D. Mitchell. Plasma-prostaglandins in pre-term neonates before and after treatment for patent ductus arteriosus. *Lancet* 2:130-132, 1978.
243. Lukiw, W. J., R. P. Pelaez, J. Martinez, and N. G. Bazan. Budesonide epimer R or dexamethasone selectively inhibit platelet-activating factor-induced or interleukin 1beta-induced DNA binding activity of cis-acting transcription factors and cyclooxygenase-2 gene expression in human epidermal keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3914-3919, 1998.
244. Lupulescu, A. Enhancement of carcinogenesis by prostaglandins. *Nature* 272:634-636, 1978.
245. Lynch, J. M. and P. M. Henson. The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor. *J Immunol* 137:2653-2661, 1986.
246. Macdonald, A. A., P. Poot, and C. J. Wensing. Nerve endings in the pulmonary trunk, ductus arteriosus and aorta of intact and decapitated pig fetuses. *Anat Embryol(Berl)* 168:395-404, 1983.
247. MacIennan, K. M., P. F. Smith, and C. L. Darlington. Platelet-activating factor in the CNS. *Prog Neurobiol* 50:585-596, 1996.

248. Mancini, JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, and Riendeau D. Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem* 276: 4469-4475, 2001.
249. Many, H., J. Aoki, M. Watanabe, T. Adachi, H. Asou, Y. Inoue, H. Arai, and K. Inoue. Switching of platelet-activating factor acetylhydrolase catalytic subunits in developing rat brain. *J Biol Chem* 273:18567-18572, 1998.
250. Marrache, A. M., F. Gobeil, Jr., S. G. Bernier, J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, S. Choufani, G. Bkaily, A. Bourdeau, M. G. Sirois, A. Vazquez-Tello, L. Fan, J. S. Joyal, J. G. Filep, D. R. Varma, A. Ribeiro-Da-Silva, and S. Chemtob. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol* 169:6474-6481, 2002.
251. Masaki, T., J. R. Vane, and P. M. Vanhoutte. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol Rev* 46:137-142, 1994.
252. Massey, C. V., T. A. Kohout, S. T. Gaa, W. J. Lederer, and T. B. Rogers. Molecular and cellular actions of platelet-activating factor in rat heart cells. *J Clin Invest* 88:2106-2116, 1991.

253. Matsuzawa, A., K. Hattori, J. Aoki, H. Arai, and K. Inoue. Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet-activating factor-acetylhydrolase II. *J Biol Chem* 272:32315-32320, 1997.
254. Matter, N., M. F. Ritz, S. Freyermuth, P. Rogue, and A. N. Malviya. Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorylation of nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and accelerated calcium release by inositol 1,4,5-trisphosphate from isolated rat liver nuclei. *J Biol Chem* 268:732-736, 1993.
255. McCarthy, T. L., S. Casinghino, D. W. Mittanck, C. H. Ji, M. Centrella, and P. Rotwein. Promoter-dependent and -independent activation of insulin-like growth factor binding protein-5 gene expression by prostaglandin E₂ in primary rat osteoblasts. *J Biol Chem* 271:6666-6671, 1996.
256. McIntyre, T. M., G. A. Zimmerman, K. Satoh, and S. M. Prescott. Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate. *J Clin Invest* 76:271-280, 1985.
257. McMillian, M. K., S. M. Schanberg, and C. M. Kuhn. Ontogeny of rat hepatic adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 227:181-6, 1983.
258. McMurphy, D. M. and L. O. Boreus. Studies on the pharmacology of the perfused human fetal ductus arteriosus. *Am J Obstet Gynecol* 109:937-942, 1971.

259. McMurphy, D. M., M. A. Heymann, A. M. Rudolph, and K. L. Melmon. Developmental changes in constriction of the ductus arteriosus: responses to oxygen and vasoactive agents in the isolated ductus arteriosus of the fetal lamb. *Pediatr Res* 6:231-8, 1972.
260. Melmon, K. L., M. J. Cline, T. Hughes, and A. S. Nies. Kinins: possible mediators of neonatal circulatory changes in man. *J Clin Invest* 47:1295-1302, 1968.
261. Mentzer, R. M., Jr., S. W. Ely, R. D. Lasley, R. D. Mainwaring, E. M. Wright, Jr., and R. M. Berne. Hormonal role of adenosine in maintaining patency of the ductus arteriosus in fetal lambs. *Ann Surg* 202:223-230, 1985.
262. Meyer-Kirchrath, J., P. Kuger, T. Hohlfeld, and K. Schror. Analysis of a porcine EP₃-receptor: cloning, expression and signal transduction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:160-167, 1998.
263. Meyer, D. J., R. Muimo, M. Thomas, D. Coates, and R. E. Isaac. Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. *Biochem J* 313:223-227, 1996.
264. Michelakis, E., I. Rebeyka, J. Bateson, P. Olley, L. Puttagunta, and S. Archer. Voltage-gated potassium channels in human ductus arteriosus. *Lancet* 356:134-137, 2000.

265. Michelakis, E. D., I. Rebeyka, X. Wu, A. Nsair, B. Thebaud, K. Hashimoto, J. R. Dyck, A. Haromy, G. Harry, A. Barr, and S. L. Archer. O₂ sensing in the human ductus arteriosus: regulation of voltage-gated K⁺ channels in smooth muscle cells by a mitochondrial redox sensor. *Circ Res* 91:478-486, 2002.
266. Milano, S., F. Arcoleo, M. Dieli, R. D'Agostino, P. D'Agostino, G. De Nucci, and E. Cillari. Prostaglandin E₂ regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins* 49:105-115, 1995.
267. Mitchell, MD, Lucas A, Etches PC, Brunt JD, and Turnbull AC. Plasma prostaglandin levels during early neonatal life following term and pre-term delivery. *Prostaglandins* 16: 319-326, 1978.
268. Miyaura, S., N. Maki, W. Byrd, and J. M. Johnston. The hormonal regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase activity in plasma. *Lipids* 26:1015-1020, 1991.
269. Momma, K., S. Nishihara, and Y. Ota. Constriction of the fetal ductus arteriosus by glucocorticoid hormones. *Pediatr Res* 15:19-21, 1981.
270. Momma, K., S. Uemura, S. Nishihara, and Y. Ota. Dilatation of the ductus arteriosus by prostaglandins and prostaglandin's precursors. *Pediatr Res* 14:1074-1077, 1980.

271. Momma, K. and A. Takao. Increased constriction of the ductus arteriosus with combined administration of indomethacin and betamethasone in fetal rats. *Pediatr Res* 25:69-75, 1989.
272. Moncada, S. Eighth Gaddum Memorial Lecture. University of London Institute of Education, December 1980. Biological importance of prostacyclin. *Br J Pharmacol* 76:3-31, 1982.
273. Montrucchio, G., G. Alloatti, and G. Camussi. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 80:1669-1699, 2000a.
274. Montrucchio, G., G. Alloatti, C. Tetta, R. De Luca, R. N. Saunders, G. Emanuelli, and G. Camussi. Release of platelet-activating factor from ischemic-reperfused rabbit heart. *Am J Physiol* 256:H1236-H1246, 1989.
275. Montrucchio, G., G. Camussi, C. Tetta, G. Emanuelli, F. Orzan, L. Libero, and A. Brusca. Intravascular release of platelet-activating factor during atrial pacing. *Lancet* 2:293, 1986.
276. Montrucchio, G., E. Lupia, E. Battaglia, L. Del Sorbo, M. Boccellino, L. Biancone, G. Emanuelli, and G. Camussi. Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:80-88, 2000b.

277. Montrucchio, G., E. Lupia, E. Battaglia, G. Passerini, F. Bussolino, G. Emanuelli, and G. Camussi. Tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis depends on *in situ* platelet-activating factor biosynthesis. *J Exp Med* 180:377-382, 1994.
278. Montrucchio, G., E. Lupia, A. De Martino, E. Battaglia, M. Arese, A. Tizzani, F. Bussolino, and G. Camussi. Nitric oxide mediates angiogenesis induced *in vivo* by platelet-activating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* 151:557-563, 1997.
279. Morham, S. G., R. Langenbach, C. D. Loftin, H. F. Tiano, N. Vouloumanos, J. C. Jennette, J. F. Mahler, K. D. Kluckman, A. Ledford, C. A. Lee, and O. Smithies. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83:473-482, 1995.
280. Morham, S. G., R. Langenbach, J. Mahler, and O. Smithies. Characterization of prostaglandin H synthase 2 deficient mice and implications for mechanisms of NSAID action. *Adv Exp Med Biol* 407:131-138, 1997.
281. Morita, T., M. A. Perrella, M. E. Lee, and S. Kourembanas. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl. Acad Sci USA* 92:1475-1479, 1995.

282. Moritoki, H., T. Hisayama, S. Takeuchi, H. Miyano, and W. Kondoh. Involvement of nitric oxide pathway in the PAF-induced relaxation of rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 107:196-201, 1992.
283. Morrow, J. D., K. E. Hill, R. F. Burk, T. M. Nammour, K. F. Badr, and L. J. Roberts. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9383-9387, 1990.
284. Morrow, J. D., T. A. Minton, C. R. Mukundan, M. D. Campbell, W. E. Zackert, V. C. Daniel, K. F. Badr, I. A. Blair, and L. J. Roberts. Free radical-induced generation of isoprostanes *in vivo*. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J Biol Chem* 269:4317-4326, 1994.
285. Mueller, H. W., C. A. Haught, J. M. McNatt, K. Cui, S. J. Gaskell, D. A. Johnston, and J. T. Willerson. Measurement of platelet-activating factor in a canine model of coronary thrombosis and in endarterectomy samples from patients with advanced coronary artery disease. *Circ Res* 77:54-63, 1995.
286. Munir, I., K. Fukunaga, K. Miyazaki, H. Okamura, and E. Miyamoto. Mitogen-activated protein kinase activation and regulation of cyclooxygenase 2 expression by platelet-activating factor and hCG in human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1B. *J Reprod Fertil* 117:49-59, 1999.

287. Murakami, M., N. Hara, I. Kudo, and K. Inoue. Triggering of degranulation in mast cells by exogenous type II phospholipase A₂. *J Immunol* 151:5675-5684, 1993.
288. Murakami, M., Y. Nakatani, G. Atsumi, K. Inoue, and I. Kudo. Regulatory functions of phospholipase A₂. *Crit Rev Immunol* 17:225-283, 1997.
289. Murakami, M., T. Kambe, S. Shimbara, and I. Kudo. Functional coupling between various phospholipase A₂s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem* 274:3103-3115, 1999.
290. Murakami, M., H. Naraba, T. Tanioka, N. Semmyo, Y. Nakatani, F. Kojima, T. Ikeda, M. Fueki, A. Ueno, S. Oh, and I. Kudo. Regulation of prostaglandin E₂ biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E₂ synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275:32783-92, 2000.
291. Mustafa, SB, Gandhi CR, Harvey SA, Olson MS. Endothelin stimulates platelet-activating factor synthesis by cultured rat Kupffer cells. *Hepatology* 21: 545-53, 1995.
292. Nakajima, T., T. Sugimoto, and Y. Kurachi. Platelet-activating factor activates cardiac GK via arachidonic acid metabolites. *FEBS Lett* 289:239-243, 1991.
293. Nakanishi, T., H. Gu, N. Hagiwara, and K. Momma. Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit. *Circ Res* 72:1218-1228, 1993.

294. Namba, T., Y. Sugimoto, M. Negishi, A. Irie, F. Ushikubi, A. Kakizuka, S. Ito, A. Ichikawa, and S. Narumiya. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP₃ determines G-protein specificity. *Nature* 365:166-170, 1993.
295. Namba, T., H. Oida, Y. Sugimoto, A. Kakizuka, M. Negishi, A. Ichikawa, and S. Narumiya. cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem* 269:9986-9992, 1994.
296. Naraba, H., M. Murakami, H. Matsumoto, S. Shimbara, A. Ueno, I. Kudo, and S. Oh-ishi. Segregated coupling of phospholipases A₂, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. *J Immunol* 160:2974-2982, 1998.
297. Narumiya, S. Prostanoid receptors and signal transduction. *Prog Brain Res* 113:231-241, 1996.
298. Narumiya, S., T. Ogorochi, K. Nakao, and O. Hayaishi. Prostaglandin D₂ in rat brain, spinal cord and pituitary: basal level and regional distribution. *Life Sci* 31:2093-2103, 1982.
299. Needleman, P., S. Holmberg, and B. Mandelbaum. Ductus arteriosus closure may result from suppression of prostacyclin synthetase by an intrinsic hydroperoxy fatty acid. *Prostaglandins* 22:675-682, 1981.

300. Negishi, M., Y. Sugimoto, A. Irie, S. Narumiya, and A. Ichikawa. Two isoforms of prostaglandin E receptor EP₃ subtype. Different COOH-terminal domains determine sensitivity to agonist-induced desensitization. *J Biol Chem* 268:9517-9521, 1993b.
301. Negishi, M., Y. Sugimoto, and A. Ichikawa. Prostanoid receptors and their biological actions. *Prog Lipid Res* 32:417-434, 1993a.
302. Neuwirth, R, Satriano JA, DeCandido S, Clay K, Schlondorff D. Angiotensin II causes formation of platelet activating factor in cultured rat mesangial cells. *Circ Res* 6: 1224-9, 1989.
303. Nguyen, M., T. Camenisch, J. N. Snouwaert, E. Hicks, T. M. Coffman, PA Anderson, Malouf NN, and Koller BH. The prostaglandin receptor EP₄ triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature* 390:78-81, 1997.
304. Nieto, M. L., S. Velasco, and C. M. Sanchez. Modulation of acetyl-CoA:1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-PAF) acetyltransferase in human polymorphonuclears. The role of cyclic AMP-dependent and phospholipid sensitive, calcium-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 263:4607-4611, 1988.
305. Nishida, K, and Markey SP. Platelet-activating factor in brain regions after transient ischemia in gerbils. *Stroke* 27: 514-8, 1996.

306. Nishigaki, N., M. Negishi, A. Honda, Y. Sugimoto, T. Namba, S. Narumiya, and A. Ichikawa. Identification of prostaglandin E receptor 'EP₂' cloned from mastocytoma cells EP₄ subtype. *FEBS Lett* 364:339-341, 1995.
307. Nishigaki, N., M. Negishi, Y. Sugimoto, T. Namba, S. Narumiya, and A. Ichikawa. Characterization of the prostaglandin E receptor expressed on a cultured mast cell line, BNu-2cl3. *Biochem Pharmacol* 46:863-869, 1993.
308. Nixon, A. B., J. T. O'Flaherty, J. K. Salyer, and R. L. Wykle. Acetyl-CoA:1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase is directly activated by p38 kinase. *J Biol Chem* 274:5469-5473, 1999.
309. O'Brian, W. The role of prostaglandins in labor and delivery. *Clin Perinatol* 22:973-984, 1995.
310. Offermanns, S., K. L. Laugwitz, K. Spicher, and G. Schultz. G proteins of the G₁₂ family are activated via thromboxane A₂ and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:504-508, 1994.
311. Ogden, F., M. A. DeCoster, and N. G. Bazan. Recombinant plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase attenuates NMDA-induced hippocampal neuronal apoptosis. *J Neurosci Res* 53:677-684, 1998.

312. Ogorochi, T., M. Ujihara, and S. Narumiya. Purification and properties of prostaglandin H-E isomerase from the cytosol of human brain: identification as anionic forms of glutathione S-transferase. *J Neurochem* 48:900-909, 1987.
313. Oka, S. and H. Arita. Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. *J Biol Chem* 266:9956-9960, 1991.
314. Okuda-Ashitaka, E., K. Sakamoto, T. Ezashi, K. Miwa, S. Ito, and O. Hayaishi. Suppression of prostaglandin E receptor signaling by the variant form of EP₁ subtype. *J Biol Chem* 271:31255-31261, 1996.
315. Olofsson, J. I. and P. C. Leung. Prostaglandins and their receptors: implications for ovarian physiology. *Biol Signals* 5:90-100, 1996.
316. Ohshige, A, Yoshimura T, Maeda T, Ito M, and Okamura H. Increased platelet-activating factor-acetylhydrolase activity in the umbilical venous plasma of growth-restricted fetuses. *Obstet Gynecol* 93: 180-183, 1999.
317. Ottino, P. and H. E. Bazan. Corneal stimulation of MMP-1, -9 and uPA by platelet-activating factor is mediated by cyclooxygenase-2 metabolites. *Curr Eye Res* 23:77-85, 2001.
318. Pace-Asciak, C. R. and G. Rangaraj. The 6-ketoprostaglandin F_{1α} pathway in the lamb ductus arteriosus. *Biochim Biophys Acta* 486:583-585, 1977.

319. Pace-Asciak, C. R. and G. Rangaraj. Prostaglandin biosynthesis and catabolism in the lamb ductus arteriosus, aorta and pulmonary artery. *Biochim Biophys Acta* 529:13-20, 1978.
320. Pace-Asciak, C. R. and G. Rangaraj. Release of prostaglandins from intact fetal lamb ductus arteriosus. *Can J Biochem Cell Biol* 61:240-247, 1983.
321. Paliogianni, F. and D. T. Boumpas. Prostaglandin E₂ inhibits the nuclear transcription of the human interleukin 2, but not the Il-4, gene in human T cells by targeting transcription factors AP-1 and NF-AT. *Cell Immunol* 171:95-101, 1996.
322. Paoletti, P., C. Chiabrando, P. Gaetani, M. G. Castelli, G. Butti, L. Martelli, and M. Rolli. Prostaglandins in human brain tumors. *J Neurosurg Sci* 33:65-69, 1989.
323. Pei, Y., L. A. Barber, R. C. Murphy, C. A. Johnson, S. W. Kelley, L. C. Dy, R. H. Fertel, T. M. Nguyen, D. A. Williams, and J. B. Travers. Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis. *J Immunol* 161:1954-1961, 1998.
324. Peri, K. G., P. Hardy, D. Y. Li, D. R. Varma, and S. Chemtob. Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem* 270:24615-24620, 1995.

325. Peri, K. G., C. Quiniou, X. Hou, D. Abran, D. R. Varma, W. D. Lubell, and S. Chemtob. THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol* 26: 389-97, 2002.
326. Peters-Golden, M., K. Song, T. Marshall, and T. Brock. Translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. *Biochem J* 318:797-803, 1996.
327. Pfeilschifter, J., C. Schalkwijk, V. A. Briner, and B. H. van den. Cytokine-stimulated secretion of group II phospholipase A2 by rat mesangial cells. Its contribution to arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by cultured rat glomerular cells. *J Clin Invest* 92:2516-2523, 1993.
328. Pickard, J. D. Role of prostaglandins and arachidonic acid derivatives in the coupling of cerebral blood flow to cerebral metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:361-384, 1981.
329. Pierce, K. L., T. J. Bailey, P. B. Hoyer, D. W. Gil, D. F. Woodward, and J. W. Regan. Cloning of a carboxyl-terminal isoform of the prostanoid FP receptor. *J Biol Chem* 272:883-887, 1997.
330. Pietsch, P., T. Hunger, M. Braun, A. Roediger, G. Baumann, and S. B. Felix. Effects of platelet-activating factor on intracellular Ca^{2+} concentration and contractility in isolated cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 31:758-763, 1998.

331. Pilbeam, C. C., J. R. Harrison, and L. G. Raisz. Prostaglandins and bone metabolism. *Principles of Bone Biology*. New York, Academic Press. 1996, 715.
332. Pinckard, R. N., R. S. Farr, and D. J. Hanahan. Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J Immunol* 123:1847-1857, 1979.
333. Piper, P. J. and A. G. Stewart. Coronary vasoconstriction in the rat, isolated perfused heart induced by platelet-activating factor is mediated by leukotriene C4. *Br J Pharmacol* 88:595-605, 1986.
334. Prescott, S. M. In Gallin, J. and R. Snyderman, eds. *Basic Principles and Clinical Correlates*. Philadelphia, Lippincott/Williams & Wilkins. 1999, 387-396.
335. Prescott, S. M., G. A. Zimmerman, and T. M. McIntyre. Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3534-3538, 1984.
336. Prescott, S. M., G. A. Zimmerman, D. M. Stafforini, and T. M. McIntyre. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69:419-445, 2000.

337. Pritchard, P. H. The degradation of platelet-activating factor by high-density lipoprotein in rat plasma. Effect of ethynylloestradiol administration. *Biochem J* 246:791-794, 1987.
338. Pulkkinen, M. O., K. Momma, and J. Pulkkinen. Constriction of the fetal ductus arteriosus by progesterone. *Biol Neonate* 50:270-273, 1986.
339. Raychowdhury, M. K., M. Yukawa, L. J. Collins, S. H. McGrail, K. C. Kent, and J. A. Ware. Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* 269:19256-19261, 1994.
340. Reddy, S. T. and H. R. Herschman. Transcellular prostaglandin production following mast cell activation is mediated by proximal secretory phospholipase A2 and distal prostaglandin synthase 1. *J Biol Chem* 271:186-191, 1996.
341. Reddy, S. T. and H. R. Herschman. Prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2 are coupled to distinct phospholipases for the generation of prostaglandin D₂ in activated mast cells. *J Biol Chem* 272:3231-3237, 1997a.
342. Reddy, S. T., M. V. Winstead, J. A. Tischfield, and H. R. Herschman. Analysis of the secretory phospholipase A2 that mediates prostaglandin production in mast cells. *J Biol Chem* 272:13591-13596, 1997b.
343. Rerreira, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and hyperalgesia. *Nature* 240:200-203, 1972.

344. Roberts, M. F. Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface. *FASEB J* 10:1159-1172, 1996.
345. Robertson, R. P. Characterization and regulation of prostaglandin and leukotriene receptors: an overview. *Prostaglandins* 31:395-411, 1986.
346. Roulet, M. J. and R. F. Coburn. Oxygen-induced contraction in the guinea pig neonatal ductus arteriosus. *Circ Res* 49:997-1002, 1981.
347. Rudolph, A. M., and M. A. Heymann. The fetal circulation. *Annu Rev Med* 19:195-206, 1968.
348. Saeki, S., F. Masugi, T. Ogihara, A. Otsuka, Y. Kumahara, K. Watanabe, K. Tamura, A. Akashi, and A. Kumagai. Effects of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor) on cardiac function in perfused guinea-pig heart. *Life Sci* 37:325-329, 1985.
349. Sakai, H., E. Kumano, S. Ikari, and N. Takeguchi. A gastric housekeeping Cl⁻ channel activated via prostaglandin EP₃ receptor-mediated Ca²⁺/nitric oxide/cGMP pathway. *J Biol Chem* 270:18781-18785, 1995.
350. Schaffer, W. and R. S. Williams. Age-dependent changes in expression of α_1 -adrenergic receptors in rat myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 138:387-91, 1986.

351. Scheiman, J. M. NSAIDs, gastrointestinal injury, and cytoprotection. *Gastroenterol Clin North Am* 25:279-298, 1996.
352. Schievella, A. R., M. K. Regier, W. L. Smith, and L. L. Lin. Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270:30749-30754, 1995.
353. Schuster, V. L. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* 60:221-242, 1998.
354. Segi, E., Y. Sugimoto, A. Yamasaki, Y. Aze, H. Oida, T. Nishimura, T. Murata, T. Matsuoka, F. Ushikubi, M. Hirose, T. Tanaka, N. Yoshida, S. Narumiya, and A. Ichikawa. Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP₄-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 246:7-12, 1998.
355. Serou, M. J., M. A. DeCoster, and N. G. Bazan. Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression. *J Neurosci Res* 58:593-598, 1999.
356. Sharpe, G. L., B. Thalme, and K. S. Larsson. Studies on closure of the ductus arteriosus. XI. Ductal closure in utero by a prostaglandin synthetase inhibitor. *Prostaglandins* 8:363-368, 1974.

357. Shitashige, M., I. Morita, and S. Murota. Different substrate utilization between prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 in NIH3T3 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1389:57-66, 1998.
358. Shmueli, O., A. Cahana, and O. Reiner. Platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase activity, LIS1 expression, and seizures. *J Neurosci Res* 57:176-184, 1999.
359. Silva, D. G. and M. Ikeda. Ultrastructural and acetylcholinesterase studies on the innervation of the ductus arteriosus, pulmonary trunk and aorta of the fetal lamb. *J Ultrastruct Res* 34:358-374, 1971.
360. Silvestro, L., C. Ruikun, F. Sommer, T. M. Duc, L. Biancone, G. Montrucchio, and G. Camussi. Platelet-activating factor-induced endothelial cell expression of adhesion molecules and modulation of surface glycocalyx, evaluated by electron spectroscopy chemical analysis. *Semin Thromb Hemost* 20:214-222, 1994.
361. Slater, D, Berger L, Newton R, Moore G, and Bennett P. The relative abundance of type 1 to type 2 cyclo-oxygenase mRNA in human amnion at term. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 304-308, 1994.
362. Slater, D., V. Allport, and P. Bennett. Changes in the expression of the type-2 but not the type-1 cyclo- oxygenase enzyme in chorion-decidua with the onset of labour. *Br J Obstet Gynaecol* 105:745-748, 1998.

363. Slater, D., W. Dennes, R. Sawdy, V. Allport, and P. Bennett. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human fetal membranes throughout pregnancy. *J Mol Endocrinol* 22:125-130, 1999.
364. Slomp, J., J. C. van Munsteren, R. E. Poelmann, E. G. de Reeder, A. J. Bogers, and A. C. Gittenberger-de Groot. Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for vascular intimal thickening. An immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components. *Atherosclerosis* 93:25-39, 1992.
365. Smith, G. C. and J. C. McGrath. Indomethacin, but not oxygen tension, affects the sensitivity of isolated neonatal rabbit ductus arteriosus, but not aorta, to noradrenaline. *Cardiovasc Res* 22:910-915, 1988.
366. Smith, G. C. and J. C. McGrath. Characterisation of the effect of oxygen tension on response of fetal rabbit ductus arteriosus to vasodilators. *Cardiovasc Res* 27:2205-2211, 1993.
367. Smith, G. C. and J. C. McGrath. Interactions between indomethacin, noradrenaline and vasodilators in the fetal rabbit ductus arteriosus. *Br J Pharmacol* 111:1245-1251, 1994a.
368. Smith, G. C., R. A. Coleman, and J. C. McGrath. Characterization of dilator prostanoid receptors in the fetal rabbit ductus arteriosus. *J Pharmacol Exp Ther* 271:390-396, 1994b.

369. Smith, G. C. The effect of passive stretch on the response of the fetal rabbit ductus arteriosus to indomethacin, noradrenaline and prostaglandin E₂. *Exp Physiol* 82:537-546, 1997.
370. Smith, G. C., W. X. Wu, M. J. Nijland, S. V. Koenen, and P. W. Nathanielsz. Effect of gestational age, corticostéroïdes, and birth on expression of prostanoid EP receptor genes in lamb and baboon ductus arteriosus. *J Cardiovasc Pharmacol* 37:697-704, 2001.
371. Smith, F. G., B. A. Smith, J. L. Segar, and J. E. Robillard. Endocrine effects of ventilation, oxygenation and cord occlusion in near-term fetal sheep. *J Dev Physiol* 15:133-8, 1991.
372. Smith, W. L. Molecular biology of prostanoid biosynthetic enzymes and receptors. In Honn KV, ed. Eicosanoids and other bioactive lipids in cancer, inflammation and radiation injury. New York, Plenum Press. 1997, 989.
373. Smith, W. L., D. L. DeWitt, T. Arakawa, A. G. Spencer, E. D. Thuresson, and I. Song. Independent prostanoid biosynthetic systems associated with prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *Thromb Haemost* 78:627-630, 1997.
374. Spencer, A. G., J. W. Woods, T. Arakawa, I. I. Singer, and W. L. Smith. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 273:9886-9893, 1998.

375. Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314, 1994.
376. Stafforini, D. M., T. M. McIntyre, M. E. Carter, and S. M. Prescott. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 262:4215-4222, 1987.
377. Stafforini, D. M., T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman, and S. M. Prescott. Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem* 272:17895-17898, 1997.
378. Stafforini, D. M., T. Numao, A. Tsodikov, D. Vaitkus, T. Fukuda, N. Watanabe, N. Fueki, T. M. McIntyre, G. A. Zimmerman, S. Makino, and S. M. Prescott. Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma. *J Clin Invest* 103:989-997, 1999.
379. Stahl, R. A., F. Thaiss, U. Haberstroh, S. Kahf, A. Shaw, and W. Schoeppe. Cyclooxygenase inhibition enhances rat interleukin 1 beta-induced growth of rat mesangial cells in culture. *Am J Physiol* 259:F419-F424, 1990.
380. Starling, M. B. and R. B. Elliott. The effects of prostaglandins, prostaglandin inhibitors, and oxygen on the closure of the ductus arteriosus, pulmonary arteries and umbilical vessels in vitro. *Prostaglandins* 8:187-203, 1974.

381. Stephens, C. J., R. M. Graham, M. J. Sturm, M. Richardson, and R. R. Taylor. Variation in plasma platelet-activating factor degradation and serum lipids after acute myocardial infarction. *Coron.Artery Dis* 4:187-193, 1993.
382. Stremier, K. E., D. M. Stafforini, S. M. Prescott, and T. M. McIntyre. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem* 266:11095-11103, 1991.
383. Suba, E. A., and B. L. Roth. Prostaglandins activate phosphoinositide metabolism in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 136:325-332, 1987.
384. Sugimoto, Y., K. Hasumoto, T. Namba, A. Irie, M. Katsuyama, M. Negishi, A. Kakizuka, S. Narumiya, and A. Ichikawa. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *J Biol Chem* 269:1356-1360, 1994.
385. Sugimoto, Y., E. Segi, K. Tsuboi, A. Ichikawa, and S. Narumiya. Female reproduction in mice lacking the prostaglandin F receptor. Roles of prostaglandin and oxytocin receptors in parturition. *Adv Exp Med Biol* 449:317-321, 1998.
386. Suzuki, T., Y. Fujii, M. Miyano, L. Y. Chen, T. Takahashi, and K. Watanabe. cDNA cloning, expression, and mutagenesis study of liver-type prostaglandin F synthase. *J Biol Chem* 274:241-248, 1999.
387. Tada, T. and H. Kishimoto. Ultrastructural and histological studies on closure of the mouse ductus arteriosus. *Acta Anat(Basel)* 139:326-334, 1990.

388. Takahashi, Y, Roman C, Chemtob S, Tse MM, Lin E, Heymann MA, Clyman RI. Cyclooxygenase-2 inhibitors constrict the fetal lamb ductus arteriosus both *in vitro* and *in vivo*. *Am J Physiol* 278: R1496-505, 2000.
389. Takizawa, T., T. Oda, K. Arishima, M. Yamamoto, T. Masaoka, H. Somiya, F. Akahori, and K. Shiota. A calcium channel blocker verapamil inhibits the spontaneous closure of the ductus arteriosus in newborn rats. *J Toxicol Sci* 19:171-174, 1994a.
390. Takizawa, T., T. Oda, K. Arishima, M. Yamamoto, H. Somiya, Y. Eguchi, and K. Shiota. Inhibitory effect of enalapril on the constriction of the ductus arteriosus in newborn rats. *J Vet Med Sci* 56:605-606, 1994b.
391. Tanaka, K., I. Shibuya, N. Kabashima, Y. Ueta, and H Yamashita. Inhibition of voltage-dependent calcium channels by prostaglandin E₂ in rat melanotrophs. *Endocrinology* 139:4801-4810, 1998.
392. Tanioka, T., Y. Nakatani, N. Semmyo, M. Murakami, and I. Kudo. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E₂ synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E₂ biosynthesis. *J Biol Chem* 275: 32775-82, 2000.
393. Teitel, D. F., H. S. Iwamoto, and A. M. Rudolph. Effects of birth-related events on central blood flow patterns. *Pediatr Res* 22:557-566, 1987.

394. Thivierge, M. and M. Rola-Pleszczynski. Up-regulation of inducible cyclooxygenase gene expression by platelet-activating factor in activated rat alveolar macrophages. *J Immunol* 154:6593-6599, 1995.
395. Thomas, D. W., R. B. Mannon, P. J. Mannon, A. Latour, J. A. Oliver, M. Hoffman, O. Smithies, B. H. Koller, and T. M. Coffman. Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂. *J Clin Invest* 102:1994-2001, 1998.
396. Thorburn, G. The placenta PGE₂ and parturition. In Sakamoto, S. and Y. Takeda, eds. *Advances in Perinatal Medicine*. Amsterdam, Elsevier. 1992, 63-73.
397. Tilley, S. L., L. P. Audoly, E. H. Hicks, H. S. Kim, P. J. Flannery, T. M. Coffman, and B. H. Koller. Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP₂ prostaglandin E₂ receptor. *J Clin Invest* 103:1539-1545, 1999.
398. Tischfield, J. A. A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. *J Biol Chem* 272:17247-17250, 1997.
399. Tjoelker, L. W., C. Wilder, C. Eberhardt, D. M. Stafforini, G. Dietsch, B. Schimpf, S. Hooper, H. Le Trong, L. S. Cousens, G. A. Zimmerman, and . Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 374:549-553, 1995.

400. Towbin, H, Staehelin T, and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979.
401. Trevethick, M. A., I. Oakley, N. M. Clayton, and P. Strong. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage in experimental animals: underlying pathological mechanisms. *Gen Pharmacol* 26:1455-1459, 1995.
402. Tristani-Firouzi, M., H. L. Reeve, S. Tolarova, E. K. Weir, and S. L. Archer. Oxygen-induced constriction of rabbit ductus arteriosus occurs via inhibition of a 4-aminopyridine-, voltage-sensitive potassium channel. *J Clin Invest* 98:1959-1965, 1996.
403. Tsai, M. Y. and D. M. Brown. Effect of dexamethasone on fetal lung 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase: possible mechanism for the prevention of patent ductus arteriosus by maternal dexamethasone therapy. *Prostaglandins Leukot Med* 27:237-245, 1987.
404. Tselepis, A. D., J. A. Goudevenos, A. P. Tambaki, L. Michalis, C. S. Stroumbis, D. C. Tsoukatos, M. Elisaf, and D. A. Sideris. Platelet aggregatory response to platelet activating factor (PAF), *ex vivo*, and PAF-acetylhydrolase activity in patients with unstable angina: effect of c7E3 Fab (abciximab) therapy. *Cardiovasc Res* 43:183-191, 1999.

405. Tselepis, A. D., D. Tsoukatos, C. Droudes, A. Donas, and A. Evangelou. Platelet response to the aggregatory effect of platelet activating factor (PAF) *ex vivo* in patients with acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 21:490-496, 1991.
406. Tucker, O. N., A. J. Dannenberg, E. K. Yang, F. Zhang, L. Teng, J. M. Daly, R. A. Soslow, J. L. Masferrer, B. M. Woerner, A. T. Koki, and T. J. Fahey, III. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 59:987-990, 1999.
407. Ueno, N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, Urade Y, and Kudo I. Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A₂. *J Biol Chem* 276: 34918-34927, 2001.
408. Umayahara, Y., C. Ji, M. Centrella, P. Rotwein, and T. L. McCarthy. CCAAT/enhancer-binding protein delta activates insulin-like growth factor-I gene transcription in osteoblasts. Identification of a novel cyclic AMP signaling pathway in bone. *J Biol Chem* 272:31793-31800, 1997.
409. Uozumi, N., K. Kume, T. Nagase, N. Nakatani, S. Ishii, F. Tashiro, Y. Komagata, K. Maki, K. Ikuta, Y. Ouchi, J. Miyazaki, and T. Shimizu. Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition. *Nature* 390:618-622, 1997.
410. Urade, Y., K. Kitahama, H. Ohishi, T. Kaneko, N. Mizuno, and O. Hayaishi. Dominant expression of mRNA for prostaglandin D synthase in leptomeninges,

choroid plexus, and oligodendrocytes of the adult rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9070-9074, 1993.

411. Urade, Y., K. Watanabe, and O. Hayaishi. Prostaglandin D, E, and F synthases. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:257-273, 1995.

412. Urade, Y. and O. Hayaishi. Prostaglandin D₂ and sleep regulation. *Biochim Biophys Acta* 1436:606-615, 1999.

413. Ushikubi, F., Y. Aiba, K. Nakamura, T. Namba, M. Hirata, O. Mazda, Y. Katsura, and S. Narumiya. Thromboxane A₂ receptor is highly expressed in mouse immature thymocytes and mediates DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* 178:1825-1830, 1993.

414. Ushikubi, F., M. Hirata, and S. Narumiya. Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:343-359, 1995.

415. Ushikubi, F., E. Segi, Y. Sugimoto, T. Murata, T. Matsuoka, T. Kobayashi, H. Hizaki, K. Tuboi, M. Katsuyama, A. Ichikawa, T. Tanaka, N. Yoshida, and S. Narumiya. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₃. *Nature* 395: 281-284, 1998.

416. Valone, FH, and Epstein LB. Biphasic platelet-activating factor synthesis by human monocytes stimulated with IL-1 β , tumor necrosis factor, or IFN- γ . *J Immunol* 141: 3945-50, 1988.

417. Valone, F. H. Isolation of a platelet membrane protein which binds the platelet-activating factor 1-0-hexadecyl-2-acetyl-SN-glycero-3-phosphorylcholine. *Immunology* 52:169-174, 1984.
418. Van den Veyver, I. B., and K. J. Moise, Jr. Prostaglandin synthetase inhibitors in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 48:493-502, 1993.
419. Vane, J. R., Y. S. Bakhle, and R. M. Botting. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120, 1998.
420. Ved, H. S., E. Gustow, and R. A. Pieringer. Regulation of neuronal differentiation in neuron-enriched primary cultures from embryonic rat cerebra by platelet activating factor and the structurally related glycerol ether lipid, dodecylglycerol. *J Neurosci Res* 30:353-358, 1991.
421. Viridi, A. S., L. J. Cook, R. O. Oreffo, and J. T. Triffitt. Modulation of bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene expression in osteoblastic cell lines. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44:1237-1246, 1998.
422. von Knethen, A. and B. Brune. Cyclooxygenase-2: an essential regulator of NO-mediated apoptosis. *FASEB J* 11:887-895, 1997.
423. Wahler, G. M., D. E. Coyle, and N. Sperelakis. Effects of platelet-activating factor on single potassium channel currents in guinea pig ventricular myocytes. *Mol Cell Biochem* 93:69-76, 1990.

424. Walsh, R. S., and R. M. Mentzer Jr. Role of cyclic nucleotides in relaxation of fetal lamb ductus arteriosus. *Surgery* 102:313-318, 1987.
425. Walsh, R. S., S. W. Ely, and R. M. Mentzer, Jr. Response of lamb ductus arteriosus to nitroglycerin and nitroprusside. *J Surg Res* 44:8-13, 1988.
426. Wang, L. S., K. C. Chow, and Y. C. Wu. Effects of platelet activating factor, butyrate and interleukin-6 on cyclooxygenase-2 expression in human esophageal cancer cells. *Scand J Gastroenterol* 37:467-475, 2002.
427. Wang, R. and L. Wu. The chemical modification of K_{Ca} channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272:8222-8226, 1997.
428. Watabe, A., Y. Sugimoto, A. Honda, A. Irie, T. Namba, M. Negishi, S. Ito, S. Narumiya, and A. Ichikawa. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP_1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* 268:20175-20178, 1993.
429. Watanabe, K., Y. Iguchi, S. Iguchi, Y. Arai, O. Hayaishi, and L. J. Roberts. Stereospecific conversion of prostaglandin D_2 to (5Z,13E)-(15S)-9 alpha-11 beta,15-trihydroxyprosta-5,13-dien-1-oic acid (9α , 11β -prostaglandin F_2) and of prostaglandin H_2 to prostaglandin $F_{2\alpha}$ by bovine lung prostaglandin F synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1583-1587, 1986.
430. Watanabe, T., Y. Yatomi, S. Sunaga, I. Miki, A. Ishii, A. Nakao, M. Higashihara, Y. Seyama, M. Ogura, H. Saito, and . Characterization of prostaglandin

and thromboxane receptors expressed on a megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01s. *Blood* 78:2328-2336, 1991.

431. Weinreb, M., S. J. Rutledge, and G. A. Rodan. Systemic administration of an anabolic dose of prostaglandin E₂ induces early-response genes in rat bones. *Bone* 20:347-353, 1997.
432. White, R. P. and A. A. Hagen. Cerebrovascular actions of prostaglandins. *Pharmacol Ther* 18:313-331, 1982.
433. Williams, C. S., W. Smalley, and R. N. DuBois. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. *J Clin Invest* 100:1325-1329, 1997.
434. Wilson, D. E. and H. Kaymakcalan. Prostaglandins: gastrointestinal effects and peptic ulcer disease. *Med Clin North Am* 65:773-787, 1981.
435. Wimsatt, J., P. W. Nathanielsz, and J. Sirois. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase isoform-2 in ovine cotyledonary tissues during late gestation. *Endocrinology* 133:1068-1073, 1993.
436. Wolf, M. J. and R. W. Gross. The calcium-dependent association and functional coupling of calmodulin with myocardial phospholipase A₂. Implications for cardiac cycle-dependent alterations in phospholipolysis. *J Biol Chem* 271:20989-20992, 1996.

437. Wolf, M. J., J. Wang, J. Turk, and R. W. Gross. Depletion of intracellular calcium stores activates smooth muscle cell calcium-independent phospholipase A₂. A novel mechanism underlying arachidonic acid mobilization. *J Biol Chem* 272:1522-1526, 1997.
438. Wright, D. H., D. Abran, M. Bhattacharya, X. Hou, S. G. Bernier, A. Bouayad, J. C. Fouron, A. Vazquez-Tello, M. H. Beauchamp, R. I. Clyman, K. Peri, D. R. Varma, and S. Chemtob. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol* 281:R1343-R1360, 2001.
439. Yamada, S., H. I. Yamamura, and W. R. Roeske. Ontogeny of mammalian cardiac α_1 -adrenergic receptors. *Eur J Pharmacol* 68:217-21, 1980.
440. Yamada, Y., S. Ichihara, T. Fujimura, and M. Yokota. Identification of the G994--> T missense in exon 9 of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene as an independent risk factor for coronary artery disease in Japanese men. *Metabolism* 47:177-181, 1998.
441. Yamagata, K., K. I. Andreasson, W. E. Kaufmann, C. A. Barnes, and P. F. Worley. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11:371-386, 1993.
442. Yasuda, K. and J. M. Johnston. The hormonal regulation of platelet-activating factor-acetylhydrolase in the rat. *Endocrinology* 130: 08-716, 1992.

443. Zahradnik, H. P., W. Schafer, J. Neulen, B. Wetzka, T. Gaillard, J. Tielsch, and F. Casper. The role of eicosanoids in reproduction. *Eicosanoids* 5 Suppl:S56-S59, 1992.
444. Zhang, S. Z. and A. M. Fulton. Prostaglandin E₂ receptor modulation affects tumor cell adhesion to laminin. *J Cell Physiol* 149:208-213, 1991.
445. Zimmerman, G. A. Platelet activating factor: a fluid-phase and cell mediator of inflammation. In Gallin, J. and IM. Goldstein, eds. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. New York, Raven. 1992, 1-28.

ANNEXE

Autres publications

1. Bouayad, A, Hou X, Varma DR, Clyman RI, Fouron JC, and Chemtob S. Cyclooxygenase isoforms and prostaglandin E₂ receptors in the ductus arteriosus. *Curr Ther Res*, 63: 669-81, 2002.
2. Gobeil, F Jr, Dumont I, Marrache AM, Vazquez-Tello A, Bernier SG, Abran D, Hou X, Beauchamp MH, Quiniou C, Bouayad A, Choufani S, Bhattacharya M, Molotchnikoff S, Ribeiro-Da-Silva A, Varma DR, Bkaily G, and Chemtob S. Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP₃ receptors. *Circ Res* 90: 682-9, 2002.
3. Wright, DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, and Chemtob S. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol* 281: R1343-60, 2001.
4. Bouayad, A, Bernier SG, Asselin P, Hardy P, Bhattacharya M, Quiniou C, Fouron JC, Guerguerian AM, Varma DR, Clyman RI, and Chemtob S. Characterization of PGE₂ receptors in fetal and newborn ductus arteriosus in the pig. *Semin Perinatol* 25: 70-5, 2001.
5. Bhattacharya, M, Asselin P, Hardy P, Guerguerian AM, Shichi H, Hou X, Varma DR, Bouayad A, Fouron JC, Clyman RI, and Chemtob S. Developmental changes in prostaglandin E₂ receptor subtypes in porcine ductus arteriosus. Possible contribution in altered responsiveness to prostaglandin E₂. *Circulation* 100: 1751-6, 1999.

