

Université de Montréal

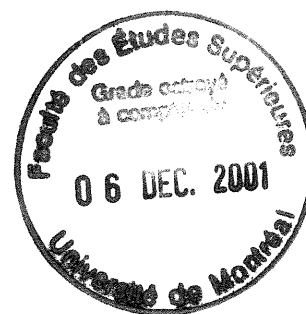
Régulation des oxydes nitriques synthases constitutives par les prostaglandines durant la
période périnatale: rôles dans le tonus vasomoteur et l'autorégulation

Par

Isabelle Dumont
Département de Physiologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Docteur (Ph.D.) en sciences neurologiques

Juin, 2001



© Isabelle Dumont, 2001

W

4

U58

2001

v. 118

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Régulation des oxydes nitriques synthèses constitutives
par les prostaglandines durant la période périnatale:
Rôles dans le tonus vasomoteur et l'autorégulation**

présentée par
Isabelle Dumont

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur:	Tomas A. Reader
Directeurs de recherche:	Sylvain Chemtob Stéphane Molotchnikoff
Membre de jury:	Martin G. Sirois
Examineur externe:	Edith Hamel

SOMMAIRE

L'augmentation de l'activité de l'oxyde nitrique (NO) synthase (NOS) durant la période périnatale aurait pour but de préserver des fonctions cellulaires et circulatoires importantes. Toutefois, les mécanismes qui sont responsables de cette augmentation sont méconnus. Puisque les prostaglandines (PGs) peuvent moduler l'expression de la NOS inductible dans les macrophages, et que la cyclooxygénase (COX) est la source principale des PGs en période périnatale, nous avons proposé l'hypothèse que la production accrue des PGs synthétisée par la COX en période périnatale, contrôle de façon positive l'expression des NOS constitutives (l'isoforme neuronale: nNOS et l'isoforme endothéliale: eNOS). Nos résultats démontrent que les PGs, les ARN messagers des NOS constitutives et de COX, les niveaux de protéines et l'activité des NOS constitutives dans des tissus neuronaux (cerveau et vaisseaux sanguins cérébraux) et dans un tissu vasculaire non-neuronal (choroïde) sont plus élevés chez le nouveau-né que chez l'adulte. L'administration de bloqueurs de la COX (ibuprofène, nimesulide) réduisent l'ARN messenger, le niveau de protéine et l'activité des NOS constitutives. Cet effet inhibiteur de la COX sur l'expression des NOS constitutives (n- et e-NOS) dans le cerveau et dans la vasculature cérébrale est prévenu par l'addition d'un analogue stable de la PGE₂ (16, 16-diméthyl PGE₂) et d'un agoniste pour le récepteur de la PGE₂, EP₃ (sulprostone, M&B 28,767). Tandis que dans la choroïde, l'effet inhibiteur de la COX sur l'expression de NOS constitutive (e- NOS) est prévenu par l'addition d'un analogue de la PGD₂. Ceci suggère donc, que les PGs jouent un rôle dans la régulation de l'expression des NOS constitutives, mais que différents types de PGs via des récepteurs spécifiques sont impliqués dans ce processus, selon le tissu. Cette régulation des NOS constitutives par les PGs se manifeste dans des événements physiologiques importants dont le

tonus vasomoteur et l'autorégulation du débit sanguin. L'effet de vasorelaxation en réponse aux agents vasoactifs qui dépendent du NO (acétylcholine, bradykinine et substance P) est plus élevé chez le nouveau-né que chez l'adulte, et il est abolie par un inhibiteur de NOS (L-NMMA). Un traitement à l'ibuprofène chez le nouveau-né réduit l'effet de vasodilatation en réponse aux agents vasoactifs dans la vasculature cérébrale et la choroïde; le traitement concomitant de l'ibuprofène avec le sulprostone ou la PGD₂ renverse cet effet inhibiteur. De plus, le nouveau-né traité avec l'ibuprofène ou avec un inhibiteur sélectif au récepteur DP (BW A868C) maintient constant le débit sanguin choroïdien sur un grand intervalle de pression de perfusion oculaire. En résumé, nos résultats montrent que, l'action des PGs en agissant via des récepteurs spécifiques contribue à la régulation de l'expression des NOS constitutives, et que cette régulation se manifeste dans des fonctions physiologiques. Cette interaction positive entre les PGs et les NOS constitutives est impliquée dans des tissus neuronaux et non neuronaux, et dans notre contexte, elle est nécessaire au développement normal du cerveau et de la vasculature.

TABLE DES MATIÈRES

Page d'identification du juy	page ii
Sommaire	page iii
Table des matières	page v
Liste des tableaux	page ix
Liste des figures	page x
Liste des sigles et abréviations	page xii
Dédicace	page xiv
Remerciements	page xv
I. INTRODUCTION	page 2
1.1 NO aux propriétés physico-chimiques	page 3
1.2 Biosynthèse de NO	page 4
1.3 Structure des NOS	page 5
1.4 Localisation des NOS	page 7
1.5 Régulation de l'expression des NOS constitutives	page 9
1.6 Gènes des NOS constitutives	page 10
1.6.1 <i>Gène de nNOS</i>	page 10
1.6.2 <i>Gène de eNOS</i>	page 11
1.7 Particularités dans la régulation des NOS constitutives	page 15
1.7.1 <i>nNOS</i>	page 15
1.7.2 <i>eNOS</i>	page 16
1.8 Déficience en NOS constitutives	page 17
1.9 Rôles physiologiques du NO dans le développement du cerveau et de la vasculature	page 18
1.9.1 <i>Cerveau</i>	page 19
1.9.2 <i>Vasculature</i>	page 20
1.9.2.1 <i>Tonus vasomoteur</i>	page 20

1.9.2.2 <i>Autorégulation du débit sanguin</i>	page 22
2.0 Similarités des NOS constitutives et des prostaglandines dans la régulation hémodynamique du cerveau et de l'oeil	page 24
2.1 Régulation des NOS par les prostaglandines	page 25
3.0 Biosynthèse des prostaglandines	page 26
3.1 Cyclooxygénases	page 27
3.2 Transport des prostaglandines	page 28
3.3 Rôles des prostaglandines dans divers systèmes physiologiques	page 29
3.3.1 <i>PGD₂</i>	page 29
3.3.2 <i>PGE₂</i>	page 30
3.3.3 <i>PGF_{2α}</i>	page 30
3.3.4 <i>PGI₂</i>	page 31
3.4 Rôles physiologiques des prostaglandines dans le tonus vasomoteur et l'autorégulation	page 31
3.5 Les récepteurs des prostaglandines	page 34
3.5.1 <i>La structure des récepteurs des prostaglandines</i>	page 34
3.5.2 <i>La transduction du signal</i>	page 36
3.5.2.1 <i>Le récepteur DP</i>	page 38
3.5.2.2 <i>Les récepteurs EP</i>	page 38
3.6 Évidences des récepteurs des prostaglandines au niveau de l'enveloppe nucléaire	page 42
II. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	page 43
Contribution de l'auteur aux articles scientifiques	page 45

III. ARTICLE INTITULÉ:

PGE₂, via EP₃ receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period	page 48
1.1 Abstract	page 49
1.2 Introduction	page 50
1.3 Materials and Methods	page 52
1.4 Results	page 59
1.5 Discussion	page 63
1.6 Acknowledgments	page 67
1.7 References	page 68

IV. ARTICLE INTITULÉ:

Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vessels of newborn pig by prostaglandin E₂	page 89
1.1 Abstract	page 90
1.2 Introduction	page 91
1.3 Materials and Methods	page 92
1.4 Results	page 98
1.5 Discussion	page 100
1.6 Acknowledgments	page 103
1.7 References	page 104

V. ARTICLE INTITULÉ:

Regulation of endothelial nitric oxide synthase by PGD₂ in the developing choroid	page 120
1.1 Abstract	page 121
1.2 Introduction	page 123
1.3 Materials and Methods	page 124
1.4 Results	page 130
1.5 Discussion	page 133

1.6 Acknowledgments	page 136
1.7 References	page 137
VI. DISCUSSION	page 151
VII. APPLICATIONS CLINIQUES	page 163
VIII. DIRECTIONS FUTURES	page 165
IX. BIBLIOGRAPHIE	page 167
X. CURRICULUM VITAE	page 203

LISTE DES TABLEAUX

I.

Tableau 1. Localisation des NOS constitutives	page 8
Tableau 2. Caractéristiques générales des trois types de la NOS	page 12
Tableau 3. La transduction du signal, les agonistes et les antagonistes des récepteurs des prostaglandines	page 37

LISTE DES FIGURES

I.

- Figure 1. L'oxydation de la L-arginine page 4
- Figure 2. Structure des isoformes de NOS et de la cytochrome P-450 page 6
- Figure 3. Le gène humain de nNOS page 13
- Figure 4. Le gène humain de eNOS page 15
- Figure 5. La voie métabolique de la cyclooxygénase page 27
- Figure 6 . (A) Structure du récepteur DP page 35
(B) Structure du récepteur EP₃ page 35

III.

- Figure 1. Expression of nNOS and COX-2 mRNA in rat brain cortex and periventricular region at different developmental ages page 78
- Figure 2. COX-2 and nNOS mRNA, nNOS immunoreactive protein, and NOS activity in newborn and adult pig brain cortex page 80
- Figure 3. Modulation of nNOS mRNA expression by prostaglandins in newborn rat brain cortex and periventricular area page 82
- Figure 4. Modulation of nNOS and protein expression by prostaglandins in newborn pig brain page 83
- Figure 5. Effects of COX inhibitors and prostaglandins on NOS activity in newborn rat and pig brain page 84
- Figure 6. *In vitro* modulation of nNOS activity in newborn pig brain by COX inhibitors in the absence or presence of PGE₂ receptor agonists page 85
- Figure 7. Modulation of NADPH diaphorase staining by prostaglandins page 86

IV.

- Figure 1. Rate of PGE₂ synthesis, eNOS mRNA, eNOS protein and nitrite production in cerebral microvessels from 1 day old and adult pigs page 110
- Figure 2. Modulation of eNOS mRNA expression and nitrite production by prostaglandins in isolated newborn cerebral microvessels page 112
- Figure 3. Modulation of eNOS mRNA expression in pig cerebral microvessels by PGE₂ analogs page 114
- Figure 4. In vivo modulation of NADPH diaphorase staining page 116
- Figure 5. Vasorelaxant effects of Substance P on cerebral microvessels page 118

V.

- Figure 1. Prostaglandin levels and endothelial nitric oxide synthase mRNA, eNOS protein, NOS activity, and nitrite production in newborn and juvenile pig choroid page 142
- Figure 2. Modulation of eNOS mRNA expression and nitrite production by prostaglandins in isolated choroids page 144
- Figure 3. In vivo modulation of NOS activity in newborn pig choroid by prostaglandins page 146
- Figure 4. Vasorelaxation of choroids to ACh, bradykinin, and substance P page 147
- Figure 5. Choroidal blood flow as a function of ocular perfusion pressure page 149

VI.

- Figure 7. Résumé des travaux de la thèse page 162

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

μL	Microlitre
μm	Micromètre
6-keto-F _{1α}	6-keto-Prostaglandine F _{1α}
AC	Adénylate cyclase
ACh	acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine mono phosphate 3,5-cyclique
ANOVA	Analyse de variance
ARN	Acide ribonucléique
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
Bk	bradykinine
BP	Pression sanguine
ChBF	Débit sanguin choroidien
COX-1	Cyclooxygénase-1
COX-2	Cyclooxygénase-2
DP	Le récepteur DP de la prostaglandine D ₂
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
EP ₁	Le récepteur EP ₁ de la prostaglandine E ₂
EP ₂	Le récepteur EP ₂ de la prostaglandine E ₂
EP ₃	Le récepteur EP ₃ de la prostaglandine E ₂
EP ₄	Le récepteur EP ₄ de la prostaglandine E ₂
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
FP	Le récepteur FP de la prostaglandine PGF _{2α}
GCs	Guanylyl cyclase soluble
GMPc	3' 5' -guanosine monophosphate cyclique
Ibu	Ibuprofène

iNOS	Oxyde nitrique inductible
IP	Le récepteur IP de la prostaglandine I ₂
IP ₃	Inositol 1,4,5 triphosphate
L-NAME	N ^o -Nitro-L-Arginine Methyl Ester
L-NMMA	N ^o -Monomethyl-L-Arginine
M	Molaire
MBP	Pression sanguine moyenne
mm Hg	Millimètre de mercure
mM	Millimolaire
NADPH	Nicotinamine adénine dinucléotide
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
nNOS	Oxyde nitrique synthase neuronale
NO	Oxyde nitrique
NO ₂	Dioxyde d'azote
NO ₂ ⁻	Nitrite
NO ₃ ⁻	Nitrate
NOS	Oxyde nitrique synthase
O ₂	Oxygène
PGD ₂	Prostaglandine D ₂
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandine F _{2α}
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
PGs	Prostaglandines
PLA ₂	Phospholipase A ₂
ROP	Rétinopathie du prématuré
Sec	Seconde

DÉDICACE

**Cette thèse est dédiée à mes ancêtres et
aux générations futures**

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le **Ministère des Affaires Indiennes et du Nord du Canada** et le **Centre de Développement de la Formation et de la Main D'Oeuvre Huron-Wendat** pour le support monétaire qui me fut accordé pour mes études.

Merci au **Dr Sylvain Chemtob** pour m'avoir aimablement accueillie dans son laboratoire. Son énergie et sa motivation sont un exemple pour tous ceux qui le côtoient.

Merci au **Dr Stéphane Molotchnikoff** pour son soutien et sa disponibilité tout au long de ce parcours.

Merci au **Dr Varma** pour ses précieux conseils et d'avoir contribué à la correction des articles.

Merci à **Hensy Fernandez** pour sa joie de vivre et son inconditionnel support.

Merci à tous **mes collègues** de travail pour avoir contribué à la réalisation de cette recherche.

Merci à **mes parents** pour leur amour, et de m'avoir inculqué la persévérance et l'intégrité.

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

La période périnatale définie comme l'intervalle des premiers jours avant et après la naissance, constitue une étape cruciale pour le développement normal du nouveau-né. Lors du travail, de la naissance, ainsi que la survie croissante des nouveau-nés de très faibles poids, font que ces derniers doivent faire face à plusieurs contraintes, telles une réduction en apport d'oxygène et une augmentation des risques hypoxiques. Il a été suggéré que l'oxyde nitrique (NO) joue un rôle au cours de cette période, afin de protéger le nouveau-né contre ces risques. Reconnue comme un composé radicalaire gazeux, le NO s'est révélé comme un messager biologique important, ainsi qu'un agent vasodilatateur puissant. Il serait impliqué dans un grand nombre de fonctions physiologiques lors du développement du cerveau et de la vasculature.

Il a été démontré que l'activité des enzymes responsables de la synthèse de NO, les oxydes nitriques synthases (NOS) constitutives (neuronale: nNOS et endothéliale: eNOS), est augmentée durant la période périnatale. L'augmentation de l'activité de NOS aurait pour but de préserver certaines fonctions cellulaires et circulatoires importantes. Par exemple, l'induction de NOS durant la période périnatale pourrait être nécessaire afin d'optimiser le débit sanguin lorsque la pression artérielle d'oxygène diminue lors du travail alors que les demandes métaboliques et physiologiques sont croissantes. Toutefois, les mécanismes responsables de cette activité accrue ne sont pas encore élucidés. Par les travaux de cette thèse, nous proposons un mécanisme responsable de la régulation des NOS constitutives (n-NOS et e-NOS) dans le cerveau et la vasculature durant la période périnatale et particulièrement via les prostaglandines (PGs), cette régulation se manifeste dans des fonctions physiologiques.

1.1 NO aux propriétés physico-chimiques

Les multiples propriétés biologiques de NO sont déterminées par sa réactivité chimique. Le NO est un composé radicalaire réactif se présentant, dans des conditions normales de température et de pression, sous forme gazeuse (Kerwin, 1995). Dominé par sa nature radicalaire, le NO permet de réagir avec plusieurs molécules. Dans des conditions physiologiques, l'une des principales cibles moléculaires du NO est la guanylyl cyclase soluble (GCs). L'action du NO sur l'hème de la GCs induit la synthèse par la cellule cible d'un second messenger, le 3'5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc). De plus, le NO peut se lier avec la molécule d'oxygène pour former le dioxyde d'azote (NO_2). En solution aqueuse, le NO_2 se transforme en nitrite (NO_2^-) et en nitrate (NO_3^-) (Moncada, 1993).

Une autre propriété de NO est que sa charge nulle le rend soluble dans les solvants apolaires, ce qui facilite sa diffusion au travers des membranes cellulaires. En milieu biologique, il est difficile d'évaluer le temps de demi-vie de NO. Son grand potentiel de diffusion à travers les membranes, fait que le NO a de grandes chances de sortir de la cellule qui le produit. Des simulations cinétiques et de diffusion ont montré que si $t_{1/2} = 4$ sec (ordre de grandeur généralement admis), la concentration de NO est non négligeable à plus de huit diamètres cellulaires de sa source de production (Lancaster, 1994). Donc, les systèmes physiques de quantification directe de NO sont difficiles à mettre en œuvre ou nécessitent des appareillages complexes. La production de GMPc par la GCs est un système biochimique qui présente l'avantage de reproduire une partie des effets biologiques de NO. La forte réactivité de NO représente un obstacle à sa mise en évidence directe. Cependant, divers systèmes tirent donc parti de cette forte réactivité. Par exemple, la quantification des ions nitrite, produits stables de l'oxydation de NO en présence de O_2 a lieu par le test

colorimétrique de Griess. La citrulline, coproduit dans la biosynthèse de NO, peut également être quantifiée.

1.2 Biosynthèse de NO

Le NO est synthétisé par une famille d'enzymes, les NO synthases (NOS) (pour une revue voir, Stuehr, 1997), qui consomment du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et de l'oxygène (O_2) pour oxyder de la L-arginine en citrulline et NO (Myers, 1990; Moncada, 1993) (Figure 1). Cette activité n'est possible qu'en présence d'un ensemble de co-facteurs: la tétrahydrobioptérine (BH_4), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et un hème (protoporphyrine IX de fer) (Dawson, 1994; Knowles, 1994). La BH_4 joue un rôle dans la formation et la stabilisation du dimère actif du NOS. Les flavines transportent les électrons du NADPH au fer de l'hème lequel catalyse l'activation de l'oxygène moléculaire couplée à la formation de NO en présence de L-arginine et de la BH_4 . Le transfert d'électron nécessite la calmoduline. L'hème du NOS réagit avec le NO pour former un composé qui a une séquence similaire au cytochrome P-450 (Dawson, 1994).

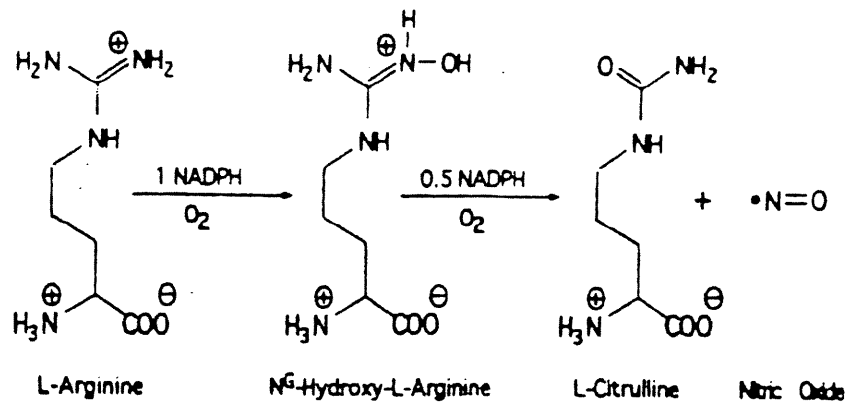


Figure 1. L'oxydation de la L-arginine

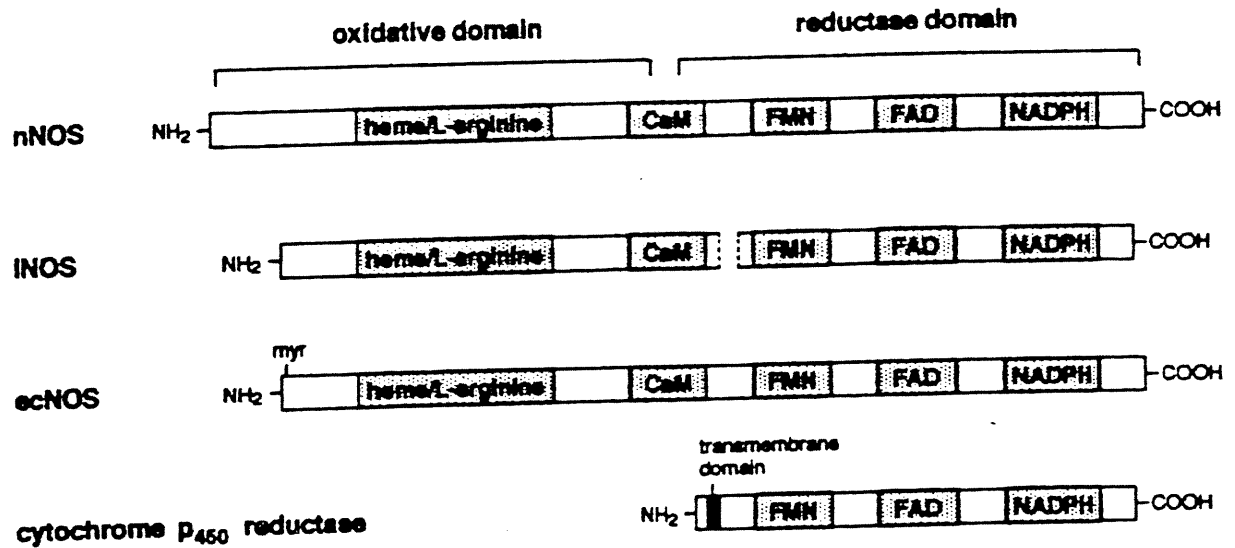
(Andrew et al., 1999)

1.3 Structure des NOS

Les NOS consistent en deux domaines catalytiques: un domaine réductase et un domaine hème oxygénase. Le domaine réductase se retrouve au niveau de la partie carboxy-terminale des NOS et présente une forte homologie avec la cytochrome P-450 réductase (enzyme qui catalyse le transfert d'électrons du NADPH à des protéine héminiques telles que les cytochromes P-450). Il est à l'origine de l'activité NADPH-diaphorase. Cette activité est utilisée pour localiser les NOS dans les tissus; elle consiste à suivre la réduction du bleu de nitrotétrazolium par le NADPH, catalysée par le domaine réductase de la NOS, réduction qui engendre un composé fortement coloré. Bien que le domaine hème oxygénase au niveau de la partie amino-terminale n'offre pas d'homologie de séquence avec la cytochrome P-450, un segment de neuf acides aminés, contenant la cystéine responsable de la coordination de l'hème présente une forte homologie chez les NOS et la cytochrome P-450 (Renaud, 1993). Ce domaine oxygénase des NOS est impliqué dans la formation des produits (citrulline, NO) (Figure 2).

Les NOS sont seulement actives sous forme homodimérique: le domaine oxygénase du monomère est inactif; tandis que le domaine réductase du monomère garde sa capacité de transférer des électrons. Le domaine oxygénase est responsable de la structure dimérique de la NOS inductible, le domaine réductase stabilisant le dimère (Ghosh, 1996). Dans les NOS constitutives se produisent des interaction réductase-réductase et réductase-oxygénase (Venema, 1997). La présence de calmoduline induit la dimérisation du domaine oxygénase de eNOS (Hellermann, 1997), qui conserve son pouvoir catalytique lorsqu'on le met en présence de son domaine réductase. Les conditions d'assemblage des co-facteurs diffèrent selon le type de NOS. Pour la NOS inductible, l'hème et la BH_4 sont

nécessaire à la formation du dimère, la présence de L-arginine facilite cette dimérisation (Presta, 1998; Sennequier, 1996). Tandis que pour les NOS constitutives, seul l'hème est indispensable à la dimérisation (Venema, 1996; Klatt, 1996), alors que la BH₄ sert à stabiliser la formation du dimère.



(Sessa et al., 1994)

Figure 2. Structure des NOS et de la cytochrome P-450 réductase

1.4 Localisation des NOS

Il existe trois isoformes des NOS: l'isoforme neuronale: nNOS (NOS-1); l'isoforme endothéliale: eNOS (NOS-3) qui sont constitutives; et la macrophage iNOS (NOS-2) qui est inductible. Les noms de ces isoformes correspondent au site où ils ont été initialement identifiés et de leur historique de purification. Aujourd'hui, cette association apparente des trois isoformes des NOS avec les neurones, les cellules endothéliales, et les macrophages est d'une grande simplicité. L'utilisation de différentes techniques dont l'immunohistochimie, le Western blot, le Northern blot, la NADPH diaphorase et la conversion de L-arginine en L-citrulline ont permis de localiser les isoformes des NOS dans de nombreux tissus et types cellulaires chez plusieurs espèces animales. Ainsi la nNOS est non seulement confinée aux cellules neuronales mais est aussi présente dans d'autres tissus et types cellulaires tels que dans les myocytes du muscle squelettique (Nakane, 1993; Silvagno, 1996) et dans les cellules épithéliales du poumon (North, 1994). (Tableau 1). Tandis que, la eNOS se retrouve dans les cellules neuronales (Dinerman, 1994; O'Dell, 1994), et dans les plaquettes (Radomski, 1990) en plus des cellules endothéliales.(Tableau 1). Alors que la iNOS semble être présente de façon constitutive dans certains tissus (Kobzick, 1993; Mohaupt, 1994).

Tableau 1. Localisation des NOS constitutives

1. NOS I expression in various tissues and cell types

Tissue	Cell type	Species	Method of detection
Brain (abundant in the accessory olfactory bulb, the molecular layer of the cerebellum, and the pedunculo-pontine tegmental nucleus of the brainstem)	Neurons	<i>Mouse, rat, primates, human</i>	Immunohistochemistry, in situ hybridization, Northern blot, Western blot
Hypothalamus		<i>Mouse, rat</i>	Immunohistochemistry, Western blot
Pineal gland		<i>Rat, sheep</i>	Immunohistochemistry, Western blot
Spinal cord		<i>Rat, cat, sheep</i>	Immunohistochemistry, activity
Innervation of various organs		<i>Mouse, rat, hamster, guinea pig, cat, human</i>	Immunohistochemistry
Skeletal muscle	Myocytes	<i>Rat, guinea pig, human</i>	Immunohistochemistry, Northern blot, RNase protection assay, RT-PCR, Western blot
Lung	Epithelial cells	<i>Rat, human</i>	Immunohistochemistry, RT-PCR
Kidney	Macula densa cells	<i>Rat</i>	Immunohistochemistry, RT-PCR, RNase protection assay
Testis		<i>Human</i>	Northern blot, RT-PCR
Penile corpora cavernosa, urethra, prostate		<i>Rat</i>	Northern blot, RT-PCR
Skin	Mast cells	<i>Human</i>	Immunohistochemistry
Pituitary gland	Gonadotrophs and folliculostellate cells	<i>Rat</i>	Northern blot, immunohistochemistry
Adrenal gland	Neutrophils	<i>Rat, Human</i>	Northern blot, Western blot, Immunohistochemistry, RT-PCR

NOS III expression in various cell types

Cell type	Species	Method of detection
Endothelial cells	<i>Human/bovine</i>	Western blot, immunohistochemistry, NOS activity
Neuronal cells	<i>Human/rat</i>	Immunohistochemistry
Bone marrow cells, trabecular lining cells, osteoblasts, stromal cells, osteoclasts	<i>Human</i>	Immunohistochemistry, RT-PCR
Dermal fibroblasts	<i>Human</i>	Immunohistochemistry, RT-PCR
Epidermal keratinocytes	<i>Human</i>	Immunohistochemistry
Epithelial cells of endometrial glands	<i>Human</i>	NADPH-diaphorase staining, Northern blot, RPA
Leydig cells and Sertoli cells, prematurely shed spermatocytes and spermatids	<i>Human</i>	Immunohistochemistry
Megakarocytes	<i>Human</i>	Western blot, RT-PCR
NCI-H441 bronchiolar epithelial cells	<i>Human</i>	Western blot, RT-PCR
Placental syncytiotrophoblasts	<i>Human</i>	NADPH-diaphorase staining, in situ hybridization
Platelets	<i>Human</i>	Western blot, RT-PCR
T-cells	<i>Human</i>	Immunocytochemistry, RT-PCR
Thyroid follicular cells	<i>Human</i>	Immunohistochemistry, RT-PCR
U937 monocytic cells	<i>Human</i>	Immunocytochemistry, RT-PCR
Cardiac myocytes	<i>Rat</i>	Immunohistochemistry, Northern blot
Diaphragm muscle cells	<i>Rat/murine</i>	Western blot
Gastrointestinal mucosa	<i>Rat</i>	Western blot, Northern blot
Hepatocytes	<i>Rat</i>	Immunohistochemistry
Smooth muscle cells	<i>Rat</i>	Western blot
Theca cell layer, ovarian stroma, mural granulosa cells on the surface of oocytes	<i>Rat</i>	Western blot, immunohistochemistry
C6 glioma cells	<i>Murine</i>	Immunocytochemistry
Resident astrocytes of the central nervous system	<i>Murine</i>	Immunohistochemistry
Colon interstitial cells	<i>Rabbit</i>	Immunohistochemistry
LLC-PK1 kidney tubular epithelial cells	<i>Porcine</i>	Western blot, RT-PCR

1.5 Régulation de l'expression des NOS constitutives

Même si toutes les NOS partagent les co-facteurs et les substrats mentionnés précédemment, elles sont différemment régulées les unes des autres. Les isoformes constitutives répondent à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. La NOS inductible est dépendante de son niveau d'expression et non du taux de calcium intracellulaire. L'expression de la NOS inductible est réglée sous l'action d'endotoxines (lipopolysaccharides), d'oxydants ou de cytokines (TNF- α , tumor necrosis factor- α , interferon γ) (Geller, 1993). Bien que la nNOS et la eNOS décrites comme constitutives (c'est à dire responsable des concentrations de NO nécessaire à l'homéostasie cellulaire) sont activées par le calcium, l'expression des NOS constitutives peut être régulée en réponse à plusieurs conditions physiologiques et pathologiques. Dans des conditions physiologiques comme le développement neuronal, les oestrogènes et les forces de cisaillement, l'expression des NOS constitutives est augmentée.

L'expression de la nNOS peut être régulée de façon temporelle et spatiale au cours du développement du système nerveux (Bredt, 1994b; Dawson, 1994; Forsterman, 1995; Keilhoff, 1996). Durant la synaptogénèse, l'expression de l'ARN messager et les niveaux de protéines de la nNOS sont augmentés (Ogilvie, 1995; Keilhoff, 1996; Northington, 1996; Northington, 1997). L'expression de la nNOS peut être aussi stimulée par les oestrogènes dans différents tissus (Weiner, 1994a; Cecatalli, 1996; Xu, 1996).

De même, les oestrogènes augmentent l'expression de la eNOS dans plusieurs tissus (Goetz, 1994; Weiner, 1994; Xu, 1996; Lantin-Hermoso, 1997; Neugarten, 1997). La réponse aux forces de cisaillement produite par le débit sanguin augmente aussi l'expression de la eNOS (Xiao, 1997). Un

élément de réponse aux forces de cisaillement comportant une séquence de 6 paires de bases (5'-GAGACC-3') a été décrit dans la région du promoteur du gène de la eNOS (Marsden, 1993; Venema, 1994); mais la fonctionnalité de cet élément n'est pas encore connu.

1.6 Gènes des NOS constitutives

Les nombreux rôles accordés aux NOS sont dus en partie à la régulation dynamique de l'expression des NOS, mais les mécanismes moléculaires expliquant cette modulation de l'expression des NOS demeurent inconnus. Une des caractéristiques importantes dans la régulation de l'expression des NOS constitutives est le promoteur du gène comportant le site de fixation de l'ARN polymérase ainsi que les sites de fixation de protéines régulatrices de la transcription. Cette stratégie permet à un simple gène de répondre à plusieurs voies de signalisations cellulaires qui sont à l'origine de différents stimuli physiologiques.

1.6.1 Gène de nNOS

Les ADNc de la nNOS isolés à partir de différents tissus chez plusieurs espèces animales incluant le rat (Bredt, 1991), la souris (Ogura, 1993) et l'humain (Marsden, 1993; Nakane, 1993;) ont un degré d'homologie d'environ 90% en acides aminés. Chez l'humain, le gène de la nNOS a été bien caractérisé (Tableau 2, Figure 3). La séquence des acides aminés correspondant au contrôle de la transcription du gène est encodée par 29 exons, et elle révèle la diversité des transcrits qui sont contrôlés par des promoteurs alternatifs (sites optionnels de fixation de l'ARN polymérase au niveau du même gène). De nombreuses séquences de régulation de l'extrémité 5' du gène seraient responsables du contrôle de l'expression de la nNOS, et elles seraient conservées parmi les espèces.

Plusieurs sites de fixation pour un grand nombre de facteurs de transcription responsables ont été identifiés dans cette région, dont la boîte TATA, CAAT, AP-2, TEF-1/MCBF, CREB/ATF/c-fos, NRF-1, Ets, NF-1 et NF- κ B (Hall,1994).

1.6.2 Gène de eNOS

Les ADNc de la eNOS isolés chez la souris (Gnanapandithen, 1996), le bovin (Lamas, 1992; Sessa, 1992), le porc (Zhang, 1997) et l'humain (Janssens, 1992; Marsden, 1993) présentent une forte homologie dans la séquence des acides aminés (~90%) entre ces espèces. La transcription du gène de la eNOS est encodée par 26 exons (Marsden, 1993; Miyahara, 1994). La région 5' du gène de la eNOS est caractérisée par l'absence de boîte TATA et possède des éléments essentiels pour le niveau basal de la transcription, incluant Sp1 et GATA (Zhang, 1995). Le gène de la eNOS est aussi composé de sites de fixation pour un grand nombre de facteurs de transcription tels NF-1, NF- κ B, AP-1, AP-2, les boîtes CACCC et CCAAT, "cAMP response element" et un demi-site de liaison pour "estrogen-responsive element".(Tableau 2, Figure 4).

Les trois isoformes des gènes des NOS ont un degré d'homologie d'environ 50% en acides aminés. Des similarités dans l'initiation de la transcription, dans la taille des exons, l'usage des exons et l'emplacement des introns révèlent un ancêtre commun pour les trois isoformes des NOS au cours de l'évolution (Hall, 1994).

	nNOS (NOS-1)	iNOS (NOS-2)	eNOS (NOS-3)
Type	constitutive mais régulée	inductible	constitutive mais régulée
Calcium dépendant	+	-	+
Calmoduline dépendant	+	+	+
Localisation intracellulaire	cytosol/membranes	cytosol	cytosol/membranes
Prototype cellulaire	neurones	macrophages	cellules endothéliales
Nombre de paires de bases du gène	>15.10 ⁴	3,7.10 ⁴	2,1.10 ⁴
Nombre d'exons	29	26	26
Masse moléculaire (kDa)	160	130	135
Nombre d'acides aminés	1434	1153	1203
Localisation du gène humain	12q24.2	17q11.2-q12	7q35-q36
Modifications post-transcriptionnelles	phosphorylation	phosphorylation	myristoylation, palmytoylation, phosphorylation

Tableau 2. Caractéristiques générales des trois types de NOS

n:neuronal; i:inductible; e:endothéliale
(Wang *et al.*, 1995)

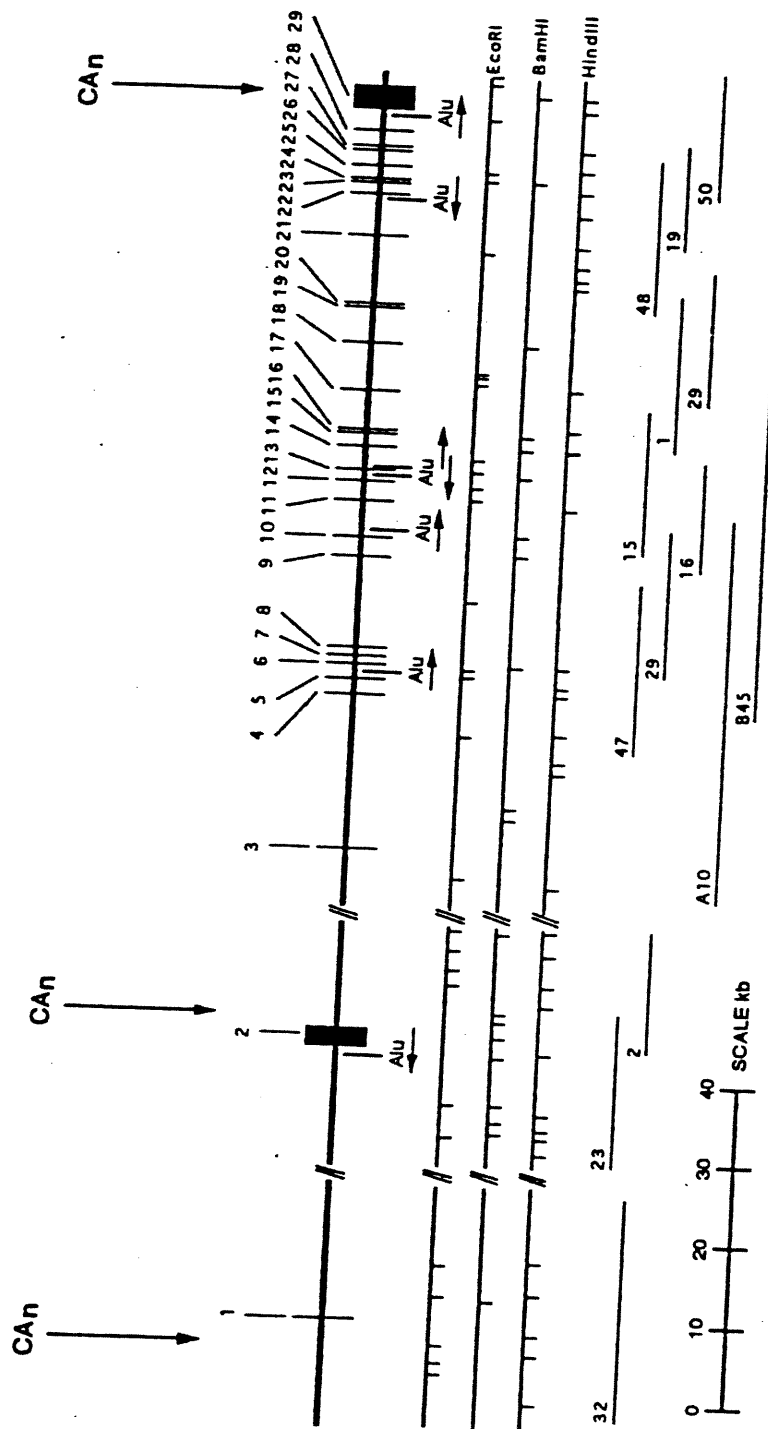


Figure 3. Structure du gène de la nNOS chez l'humain

Les exons sont numérotés et indiqués par des boîtes. Les introns sont indiqués par des lignes. Les sites de restriction pour EcoRI, BamHI et HindIII sont indiqués. Les éléments répétitifs sont illustrés. (Wang *et al.*, 1999)

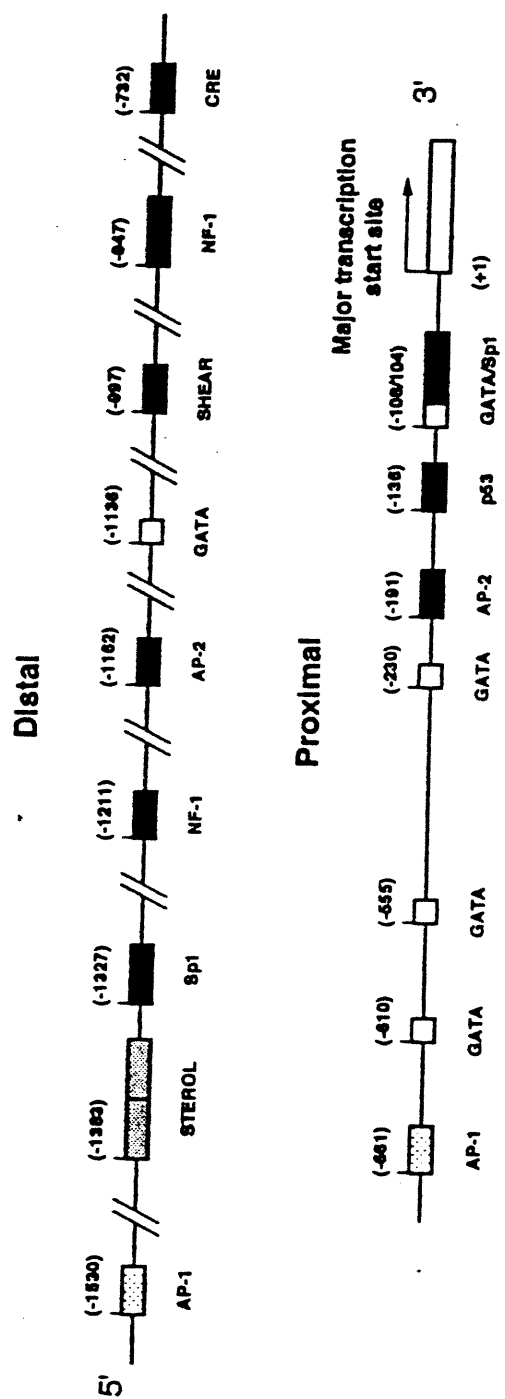


Figure 4. Structure du gène de la eNOS chez l'humain

Les sites de fixation pour les facteurs de transcription sont identifiés. Les nucléotides sont numérotés en rapport avec le site du début de la transcription (+ 1) (Wang, 1995)

1.7 Particularités dans la régulation des NOS constitutives

1.7.1 *nNOS*

En raison d'une séquence additionnelle d'acides aminés au niveau de la partie amino-terminale, le gène de la nNOS est reconnu comme le plus large des trois isoformes des NOS. Cette région contient un domaine PDZ (aussi appelé DHR ou GLGF) qui permet l'association de la protéine de la nNOS avec d'autres protéines membranaires contenant ce motif (Ponting, 1997; Schepens, 1997). Dans les tissus neuronaux, l'influx de calcium via les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) augmente l'activité enzymatique de la nNOS (Bhat, 1995; Aoki, 1997). Cette réponse rapide nécessite que la nNOS soit localisée près des récepteurs NMDA. Cette localisation est rendue possible via l'interaction du domaine PDZ de la protéine de la nNOS avec des protéines de densités postsynaptiques PSD-95 et PSD-93 (Brenman, 1996a; Brenman, 1996b); ces dernières se lient aux récepteurs NMDA (Kornau, 1997). Cette interaction protéine-protéine qui localise la nNOS avec les récepteurs NMDA et qui associe la nNOS avec les membranes cellulaires, joue un rôle important dans la plasticité synaptique (Brenman, 1997).

D'autres protéines membranaires telles "PIN" (Jaffrey, 1996), "CAPON" (Jaffrey, 1998) et cavéoline (Garcia-Cardena, 1997; Venema, 1997b) peuvent s'associer avec la protéine de la nNOS; mais cette interaction inhibe l'activité et l'expression de la nNOS.

1.7.2 *eNOS*

La *eNOS* est principalement présente dans les cellules sous forme cytosolique et surtout membranaire. On la trouve de façon prédominante dans l'appareil de Golgi et les vésicules cytoplasmiques. La *eNOS* est acylée irréversiblement par l'acide myristique (en Gly 2) et réversiblement par l'acide palmitique (en Cys 15 et Cys 26) (Forsterman, 1995). Ces modifications post-transcriptionnelles, c'est à dire la myristoylation et la palmitoylation, sont des mécanismes de régulation particuliers de la *eNOS*. Ceux-ci-ci facilitent l'interaction de la *eNOS* avec les membranes cellulaires et aident à la localisation de la *eNOS* au niveau de microdomaines. L'association de la *eNOS* avec les membranes de l'appareil de Golgi et des caveolae est régulée par ces modifications post-transcriptionnelles unique à la *eNOS* (Sessa, 1995; Garcia Cardena, 1996); ce qui pourrait avoir un impact au niveau de la transduction du signal. Des mutations de la myristoylation ou de la palmitoylation réduisent l'activité de la *eNOS*, suggérant que la localisation intracellulaire de la *eNOS* est critique pour la production de NO (Sessa, 1995).

La phosphorylation représente un autre moyen de régulation, mais cette modification post-transcriptionnelle n'est pas unique à la *eNOS*. Elle est un mécanisme de régulation pour l'ensemble des NOS. La phosphorylation joue un rôle prépondérant dans l'activation des protéines kinases pour les trois isoformes des NOS (Nakane, 1991; Bredt, 1992).

1.8 Déficience en NOS constitutives

Des souris transgéniques pour chacune des NOS dites constitutives ont été générées et ont permis d'apporter des informations importantes concernant le rôle de chacune des isoformes et de leurs importances lors de délétions chez l'animal (Huang, 1993; Huang, 1995a; Laubach, 1995; MacMicking, 1995; Wei, 1995).

Chez des souris déficientes en nNOS (par exemple, la délétion de l'exon qui contient le codon d'initiation de la translation, ATG), l'activité de la NOS est largement réduite dans le cerveau; elle est réduite d'environ 95% comparativement aux souris sauvages (Huang, 1994). L'activité de la NOS restant (5%) est due à l'isoforme de la eNOS présente au niveau des neurones et des vaisseaux sanguins (Dinerman, 1994; O'Dell, 1994), et aux sous-unités de nNOS- β et nNOS- γ (Brenman, 1996a). Différentes sous-unités ont été identifiées pour l'isoforme de la nNOS (α, β, γ). La sous-unité α représente 95% de l'activité totale de la NOS dans le cerveau. (Brenman, 1997; Eliasson, 1997; Huang, 1993). Bien que les sous-unités β et γ ont une activité catalytique, leur rôle n'est pas encore connu. Le domaine PDZ essentiel pour l'association de la nNOS avec les membranes cellulaires n'est pas présent au niveau de ces deux sous-unités β et γ (Brenman, 1996a). En revanche, il n'y a pas de différence neuroanatomique observée chez ces souris déficientes en nNOS (Huang, 1993; Huang, 1994). Par exemple, la nNOS est colocalisée avec la somatostatine au niveau du striatum et l'acétylcholine transférase au niveau du noyau pédonculopontine. L'immunoréactivité de ces marqueurs est conservée malgré la perte de l'immunoréactivité de la nNOS.

Chez des souris déficientes en eNOS, la pression artérielle

moyenne est augmentée de plus de 30% comparativement aux souris sauvages (Huang, 1995a; Shesely, 1996). Ce qui est cohérent avec le rôle de l'activité de la eNOS dans la régulation de la pression sanguine et du tonus vasculaire. Une déficience de la vasodilatation induite par l'acétylcholine a été aussi observée chez ces souris déficientes en eNOS (Huang, 1995).

Il est possible que des mécanismes de compensations physiologiques surviennent à la suite de la délétion d'un de ces gènes. La délétion d'une isoforme de la NOS peut être compensée par une autre isoforme de la NOS. Par exemple, la délétion de la nNOS est compensée par l'isoforme de la eNOS dans les vaisseaux piaux en réponse à l'acétylcholine (Meng, 1996). Les réponses cérébrovasculaires à l'hypercapnie (5% CO₂) chez des souris déficientes en nNOS ne sont pas bloquées par des inhibiteurs de la NOS, qui généralement bloquent ces réponses chez des souris sauvages (Irikura, 1995). D'autres facteurs pourraient jouer un rôle en réponse à la délétion du gène de la NOS. Il faut donc en conclure, que même si des souris transgéniques apportent des informations importantes, il faut rester prudent quant à l'interprétation de ces résultats.

1.9 Rôles physiologiques du NO dans le développement du cerveau et de la vasculature

Reconnu comme un messager biologique important, ainsi qu'un agent vasodilatateur puissant; le NO est impliqué dans un grand nombre de fonctions physiologiques au cours du développement du cerveau et de la vasculature (pour une revue, voir Zhang, 1995; Moncada, 1997). Les effets principaux se retrouvent entre autres au niveau de la synaptogénèse, du raffinement des connexions neuronales, du tonus

vasomoteur et de l'autorégulation du débit sanguin.

1.9.1 *Cerveau*

Le NO s'est révélé un messager biologique important dans le développement du cerveau. Plusieurs ont montré que l'expression (Bredt, 1994a; Bredt, 1994b; Roskam, 1994) et l'activité de la NOS (Samama, 1995; Lizasoain, 1996; Van Eden, 1996) sont augmentées dans différentes régions du cerveau chez plusieurs espèces animales durant les premières semaines suivant la naissance pour ensuite diminuer rapidement. Cette augmentation de la NOS semble jouer un rôle dans plusieurs fonctions physiologiques au cours du développement du cerveau tels que la synaptogénèse et le raffinement des connexions.

Au cours du développement du cerveau, les neurones sont reliés entre eux par des synapses pour former des réseaux ou des circuits. La formation de ces circuits est soumise à un mécanisme de modelage, c'est à dire à un mécanisme d'erreurs et de corrections et certaines synapses sont stabilisées alors que d'autres sont éliminées. Il semble exister une relation entre la formation de ces circuits et l'activité de la NOS. Par exemple, grâce à la technique de NADPH-diaphorase, il a été possible de localiser l'activité de la NOS, dans les neurones de la couche 4 du cortex somatosensoriel (Mitrovic, 1996). Ces neurones sont les premiers à être formés dans le développement du cortex cérébral, et sont impliqués dans la synaptogénèse et la maturation du phénotype neuronale (Chun, 1989). Concomitant avec le raffinement des connexions synaptiques durant cette période, l'activité de la NOS est augmentée dans la couche 4 du cortex somatosensoriel (Mitrovic, 1996). Au cours du développement du bulbe olfactif, soit durant la migration et l'établissement des premières synapses, l'expression de la nNOS est aussi augmentée pour ensuite

diminuée rapidement (Roskams, 1994). L'élimination des projections rétino-tectales ipsilatérales, la ségrégation des afférences rétiniennes ipsi- et contralatérales et la ségrégation des couches de dominance oculaires du noyau géniculé dorsal lors du développement du système visuel implique l'activité de la NOS (Williams, 1994; Wu, 1996; Cramer, 1996). L'inhibition de l'activité de la NOS diminue la perte de ces connexions neuronales. En conclusion, ces résultats suggèrent un parallélisme temporel et fonctionnel entre la NOS et le développement normal du cerveau.

1.9.2 *Vasculature*

1.9.2.1 *Tonus Vasomoteur*

Les vaisseaux sanguins sont compartimentés structurellement et fonctionnellement. Ils sont composés de trois couches de tissus: l'endothélium qui se compose de cellules endothéliales tapisse la lumière du vaisseau sanguin, la couche moyenne est composée de cellules musculaires lisses et la couche externe se compose de tissus conjonctif, de petits vaisseaux sanguins et des faisceaux de nerfs périphériques. À cette compartimentation structurale correspond une compartimentation fonctionnelle régulant le tonus vasomoteur. Les cellules endothéliales produisent et sécrètent divers substances qui vont faciliter le mouvement du sang, influencer la résistance vasculaire et assurer l'homéostasie. Les cellules musculaires lisses ont pour rôle de régler le diamètre de la lumière par un ajustement de leur degré de contraction grâce aux substances libérées par eux et par l'endothélium. L'état de contraction et de relaxation des cellules musculaires lisses définit le tonus vasculaire.

C'est le tonus vasculaire qui, local, répartissent le flux en fonction des besoins métaboliques des différents tissus.

Le NO s'est révélé comme le principal agent de communication d'origine endothéliale, régularisant le tonus vasculaire (Furchgott, 1980; Palmer, 1987). Le NO produit par la NOS est constitutivement exprimé dans les cellules endothéliales. L'activité de la NOS sur son substrat, l'arginine, est régulée par le taux de calcium libre et par les phosphorylations intracellulaires. Différents agents vasoactifs dont l'acétylcholine, la bradykinine et la substance P induisent une augmentation de l'activité de la NOS (Kontos, 1990; Rosenblum, 1993). L'utilisation de ces agents a démontré l'importance du NO endogène dans les réponses vasomotrices. Ces agents augmentent le calcium intracellulaire dans l'endothélium et induisent une augmentation de l'activité de la NOS pour produire le NO, qui à son tour active la GC et initie une cascade d'événements dans les muscles lisses causant la relaxation. Si les facteurs de la régulation du débit sanguin sont bien connus, les mécanismes par lesquels ils modifient le tonus vasculaire le sont beaucoup moins.

Parmi les trois isoformes de la NOS, les isoformes des NOS constitutives (n-NOS e-NOS) participent au contrôle du tonus vasomoteur chez l'adulte et le nouveau-né; mais le degré d'implication est différent (Wagerle, 1995). Par exemple, l'inhibition de la NOS réduit l'effet vasorelaxation du NO; mais cette réduction est beaucoup plus marquée chez le nouveau-né que chez l'adulte. Donc, en réponse aux demandes métaboliques, la dynamique des vaisseaux sanguins subit des changements différents.

1.9.2.2 *Autorégulation du débit sanguin*

L'autorégulation du débit sanguin est un mécanisme de régulation intrinsèque qui permet au débit sanguin de demeurer constant durant des variations de pression artérielle systémique. Un des événements physiologiques important de l'autorégulation est de permettre au débit sanguin de s'ajuster aux besoins métaboliques en dépit des fluctuations de la pression artérielle, pour maintenir une pression de perfusion à un niveau adéquat afin de permettre les échanges cellulaires. Ce phénomène produit une constriction des artères lorsque la pression de perfusion augmente et engendre une dilatation lorsque la pression de perfusion diminue (Johnson, 1980). Les vaisseaux sanguins de 50 à 200 μm de diamètre, sont particulièrement impliqués dans l'autorégulation des débits sanguins (Baumbach, 1985). Ce processus d'autorégulation est un des événements les mieux adaptés de la physiologie vasculaire; et il se fait en deçà de 5 secondes (Symon, 1973; Aaslid, 1989).

Chez l'adulte, le débit sanguin est maintenu constant sur un grand intervalle de pression de perfusion, de 45 à plus de 145 mmHg (Robinson, 1986). Ces débits sanguins maintenus constants évitent ainsi des hémorragies qui pourraient se produire durant des variations extrêmes de la pression systémique. Par exemple, lorsque la pression de perfusion tombe sous 60 mm Hg durant l'évanouissement, les vaisseaux sanguins se dilatent, assurant ainsi une irrigation suffisante au cerveau. En revanche, lorsque la pression de perfusion augmente à plus de 145 mm Hg durant un oedème cérébral, les vaisseaux sanguins se contractent afin d'éviter la rupture de petits vaisseaux sanguins fragiles situés en aval.

Contrairement à l'adulte, le débit sanguin du nouveau-né est autorégulé sur un intervalle de pression de perfusion plus étroit, de 45 à 85 mmHg (Chemtob, 1991). Ce court intervalle chez le nouveau-né suggère une vasoconstriction insuffisante ou un excès de vasodilatation lorsque la pression de perfusion est augmentée, ce qui rend le nouveau-né vulnérable à plusieurs contraintes. Les altérations du débit sanguin sont souvent la conséquence de deux importantes pathologies vasculaires rencontrées chez le nouveau-né prématuré: l'hémorragie intraventriculaire et la rétinopathie (Perlman, 1985; Flynn, 1992).

Bien que des études démontrent que le système nerveux autonome soit responsable de la vasomotricité des vaisseaux piaux cérébraux ou des artères pénétrantes (Wagerle, 1986; Suzuki, 1991), ce système ne serait pas responsable du contrôle de l'autorégulation du débit sanguin. Des évidences montrent la participation de NO dans la régulation des débits sanguins cérébraux et oculaires (Iadocola; 1994; Becquet, 1997; Hardy, 1997). Ces conclusions sont basées sur le fait que l'inhibition de la NOS chez le nouveau-né augmente la limite supérieure de l'autorégulation du débit sanguin à des valeurs comparables à celles de l'adulte. Ceci suggère la présence d'un excès de vasodilatation ou d'une absence de vasoconstriction efficace en réponse à une augmentation de la pression de perfusion chez le nouveau-né, comparativement à l'adulte.

Un aspect important de la circulation sanguine est l'association des débits sanguins avec les demandes métaboliques. Des études démontrent que le NO joue un rôle dans cette association entre les débits sanguins et l'activité neuronale (Akgoren, 1994; Faraci, 1994; Iadecola, 1994). L'utilisation de bloqueurs de la NOS empêchent cette réponse de se produire. L'augmentation du débit sanguin en réponse à l'activation des fibres cholinergiques qui se projettent au cortex cérébral est atténuée

par des inhibiteurs de la NOS (Adachi, 1992; Raszkievicz, 1992). L'induction de la NOS pourrait être nécessaire dans le but essentiel de maintenir la régulation du débit et de la pression sanguine durant le développement de la vasculature.

2.0 Similarités des NOS constitutives et des PGs dans la régulation hémodynamique du cerveau et de l'œil durant la période périnatale

Il existe une relation temporelle et fonctionnelle entre l'activité de la NOS et les niveaux des prostaglandines (PGs). L'augmentation de l'activité de la NOS (Bredt, 1994b; Buttery, 1995; Lizasoain, 1996; Riche, 1995) et de la cyclooxygénase - 2 (COX-2) (enzyme responsable des niveaux élevés des PGs) (Kaufman, 1996; Li, 1997; Peri, 1995; Yagamata, 1993) joue un rôle dans la synaptogénèse et dans le développement neuronal. D'autres évidences indiquent l'implication de NOS et des PGs dans la régulation de l'hémodynamie cérébrale et oculaire (Prado, 1992; Northington, 1997; Leffler, 1993; Peri, 1995; Busija, 1997; Chemtob, 1991; Hardy, 1996a). Chez le nouveau-né, l'inhibition de la synthèse du NO et des PGs, augmente principalement la limite supérieure de l'autorégulation des débits sanguins cérébraux et oculaires à des valeurs similaires et comparables à celles observées chez l'adulte. En conclusion, cette interaction positive entre la NOS et les PGs pourrait être nécessaire au développement normal du cerveau et de la vasculature.

2.1 Régulation des NOS par les prostaglandines

Les mécanismes responsables de la régulation des NOS constitutives durant la période périnatale ne sont pas connus; mais plusieurs études suggèrent un rôle des PGs dans la régulation de la NOS inducible dans les macrophages (Gaillard, 1992; Marotta, 1992; Raddassi, 1993; Aeberhard, 1995; Minghetti, 1997). Cependant, les résultats sont contradictoires quant aux effets des PGs. Certaines études démontrent que les PGs peuvent induire la NOS inducible (Gaillard, 1992), alors que d'autres suggèrent l'inhibition de la NOS par les PGs (Marotta, 1992; Raddassi, 1993). L'inhibition de la cyclooxygénase (COX) (enzyme responsable de la synthèse des PGs) par des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens tels l'ibuprofène et l'indométhacine peuvent diminuer la production de NO dans les macrophages (Aeberhard, 1995); cette inhibition de la NOS par les agents anti-inflammatoires non stéroïdiens semble être attribuée au contrôle de l'expression du gène de la NOS. À part les macrophages, la NOS inducible est aussi régulée par les PGs dans les cellules endothéliales (Radomski, 1990). D'autres évidences démontrent que le rôle des oestrogènes dans la régulation de l'activité de la NOS semble en partie être dû aux PGs (Myers, 1996; MacRitchie, 1997).

Au point de vue moléculaire, des changements au niveau transcriptionnel ou de la stabilité de l'ARN messager pourrait expliquer les changements de l'expression de la NOS. Les PGs pourraient interagir avec des facteurs qui modèleraient la stabilité de l'ARN messager de la NOS. Un de ces facteurs est l'interleukine 1 qui induit une production accrue de l'ARNmessenger de la NOS et de la COX par une activation transcriptionnelle ou une augmentation de la stabilité de l'ARN messager (Tetsuka, 1994). D'autre part, plusieurs des éléments régulateurs qui

contrôlent la transcription des gènes peuvent être modulés par les PGs. L'expression et les sites de liaison pour les facteurs de transcription tels que c-fos, AP-1, AP-2, NF-1, NF- κ B et CREB sont régulés par les PGs (Simonson, 1994; Camandola, 1996; Micali, 1996; Paliogianni, 1994; Paliogianni, 1996; Weinreb, 1997). Ces résultats laissent envisager que les gènes des NOS constitutives peuvent être modulés par les PGs.

Des études suggèrent l'implication de la PGE₂ dans la régulation de l'expression génique de la NOS inductible (Milano, 1995; Bhattacharya, 1999). La transcription de la NOS inductible est activée par la PGE₂ dans les cellules endothéliales (Bhattacharya, 1999). D'autres gènes modulés par la PGE₂ incluent le c-fos (Simonson, 1994; Danesch, 1994; Bhattacharya, 1998). L'inhibition de la COX par l'indométhacine abolie l'expression de l'ARN messager de c-fos; suggérant l'implication de cette enzyme dans l'activation de ce gène (Simonson, 1994; Danesch, 1994).

3.0 Biosynthèse des prostaglandines

Les prostaglandines (PGs) font partie des eicosanoïdes dont le substrat principal pour sa formation est l'acide arachidonique qui se forme par l'action des phospholipases membranaires. Une fois libéré, l'acide arachidonique est converti en PGG₂ et ensuite, en PGH₂ par la cyclooxygénase (COX, aussi appelée PGH synthase). La COX possède deux activités catalytiques: L'activité oxygénase qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en PGG₂ et l'activité peroxydase qui catalyse la transformation de PGG₂ en PGH₂ (Myamoto, 1976; Van Der Ouderaa, 1977). Une fois métabolisée par la COX, la PGH₂ est convertie par une ou plusieurs enzymes dites synthases en une variété de

prostaglandines actives (Figure 5).

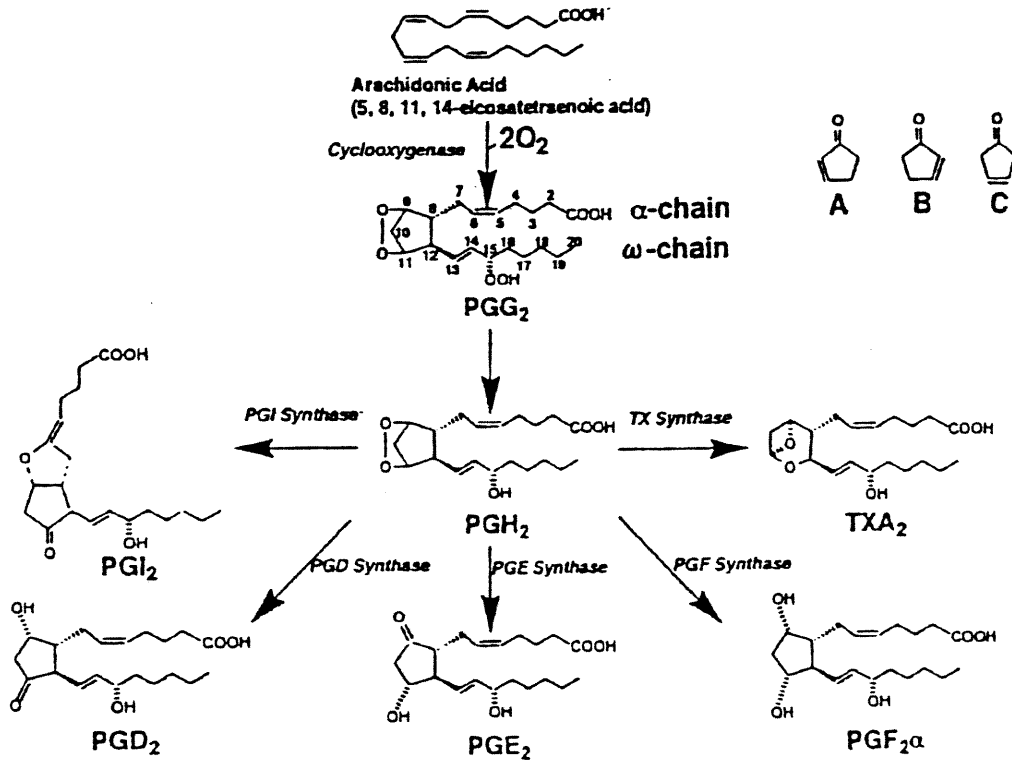


Figure 5. La voie métabolique de la cyclooxygénase

(Narumiya, 1999)

3.1 Cyclooxygénase

Il existe deux types d'isoformes de la COX, la COX-1 et la COX-2 (Smith, 1996; Vane, 1998), lesquelles ont un degré d'homologie d'environ 60% en acides aminés et ont une activité catalytique similaire (Kujubu, 1991). Cependant, ces isoformes possèdent un mode de régulation distinct. La COX-1 est exprimée de manière constitutive dans presque tous les tissus et types cellulaires et est responsable des faibles concentrations de PGs nécessaires à l'homéostasie cellulaire; tandis que la

la COX-2 est exprimée de façon inductible et répond à plusieurs stimuli intra- et extra- cellulaires tels les cytokines et les facteurs de croissance, ainsi que l'activité synaptique (Herschman, 1996). L'activité enzymatique de la COX est augmentée durant la période périnatale, laquelle est responsable des niveaux élevés des PGs. Dans le cerveau du nouveau-né, la COX-2 contribue pour 90% de l'activité totale de la COX (Yagamata, 1993; Peri, 1995). La COX-2 ne serait pas uniquement inductible, car elle est exprimée de manière constitutive dans le cerveau (Yagamata, 1993; Kaufmann, 1996). L'expression de la COX-2 dans les neurones excitateurs du cortex cérébral coïncide avec l'activité neuronale (Kaufmann, 1996). Cette activité est essentielle à la synaptogénèse durant le développement et le fonctionnement normal du cerveau. Alors que la COX-1 décrite comme constitutive peut être induite au cours du développement (Brannon, 1994). Donc, ces deux enzymes de la COX, la COX-1 et la COX-2 peuvent être à la fois constitutive et inductible.

Au niveau intracellulaire, la COX-1 et la COX-2 sont localisées sur la surface luminale du réticulum endoplasmique et de la membrane interne et externe du noyau (Spencer, 1998). La synthèse des PGs par ces deux enzymes localisées au niveau de la membrane nucléaire suggère un rôle des PGs dans la régulation de plusieurs fonctions nucléaires dont entre autres, la régulation de l'expression des gènes.

3.2 Transport des prostaglandines

À cause de leur nature hydrophobique et de leur charge négative, les PGs sont incapables de franchir la bicouche de la membrane plasmique. Un transporteur pour les PGs (PGT) a été identifié, et il jouerait un rôle important dans le transport des PGs (Kanai, 1995; Lu,

1996; Schuster, 1998). L'existence d'un PGT pourrait faciliter l'action intracellulaire des PGs tel au niveau du noyau et ainsi influencer la régulation de l'expression des gènes.

3.3 Rôles des prostaglandines dans divers systèmes physiologiques

Une fois métabolisée par la COX, la PGH_2 est convertie par une ou plusieurs enzymes dites synthases en une variété de PGs actives. Le contrôle de la formation d'un type de PG par rapport à un autre dépend non seulement de la cascade d'événements dérivés de l'acide arachidonique mais aussi du tissu et du type cellulaire. Quatre PGs sont importantes physiologiquement, soit la PGD_2 , PGE_2 , PGI_2 et la $PGF_{2\alpha}$.

3.3.1 PGD_2

La PGD_2 est la PG la plus répandue dans l'organisme, laquelle joue des rôles importants dans plusieurs systèmes physiologiques. Dans le système nerveux, la PGD_2 joue un rôle dans le sommeil, l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs et dans la régulation des réponses à la douleur (Giles 1988; Ito, 1989). Dans le système vasculaire, la PGD_2 est reconnue comme un agent vasodilatateur et vasoconstricteur. Elle s'est révélée comme un puissant vasodilatateur dans les muscles lisses gastro-intestinaux, respiratoires et reproductifs (Coleman, 1987; Coleman, 1990); tandis que dans les muscles lisses pulmonaires, elle agit comme un vasoconstricteur (Campbell, 1990). La PGD_2 joue aussi un rôle dans le système de l'hématologie en inhibant l'agrégation et l'adhésion plaquettaire (Campbell, 1990; Coleman, 1990).

3.3.2 PGE_2

La PGE_2 identifiée dans de nombreux tissus joue des rôles fréquemment opposés. Par exemple, elle cause une vasoconstriction ou une vasodilatation dans les muscles lisses vasculaires et non vasculaires (Coleman, 1990; Negishi, 1995) et diminue ou augmente la libération des neurotransmetteurs dans le cerveau (Coleman, 1990). Dans le cerveau et la vasculature cérébrale, la production de la PGE_2 est élevée (White, 1982; Leffler, 1985a; Chemtob, 1990). Elle est un vasoconstricteur et un vasodilatateur, et elle a été clairement démontré comme participant aux réponses hémodynamiques cérébrales (Leffler, 1985b; Chemtob, 1996). Cependant, ces effets vasomoteurs varient avec l'âge. Chez l'adulte, la PGE_2 cause une vasoconstriction (White, 1982; Hayashi, 1985; Leffler, 1987); tandis que chez le nouveau-né, elle a un effet de vasoconstriction très négligeable sur la vasculature cérébrale (Hayashi, 1985; Leffler, 1987; Chemtob, 1989). Cette différence ontogénique au niveau de la vasculature cérébrale semble impliquer l'action de la PGE_2 sur différents types de récepteurs.

3.3.3 $PGF_{2\alpha}$

Comme la PGE_2 , la $PGF_{2\alpha}$ est aussi l'une des principales PGs produites dans le cerveau et la vasculature cérébrale. Elle est reconnue comme un puissant vasoconstricteur dans ces systèmes et dans d'autres. La $PGF_{2\alpha}$ cause une contraction dans les muscles lisses de l'utérus, des bronches, de la trachée, de la voie gastro-intestinale et des vaisseaux sanguins (Coleman, 1985; Campbell, 1990). Dans le système nerveux central, elle joue aussi un rôle en réponse à la douleur (Campbell, 1990).

3.3.4 PGI₂

La PGI₂ est principalement produite par les cellules endothéliales, inhibe l'agrégation plaquettaire et cause une vasodilatation dans tous les lits vasculaires (Chemtob, 1991; Wise, 1996). Ces actions contrecarrent l'action vasoconstricteur du thromboxane et contribue au maintien de l'homéostasie circulatoire (Negishi, 1993). En plus de son rôle de vasodilatateur, la PGI₂ peut inhiber la libération des neurotransmetteurs du système sympathique (Coleman, 1990), favoriser la libération des transmetteurs adrénergiques non cholinergiques dans les neurones entériques (Wise, 1996).

3.4 Rôles physiologiques des prostaglandines dans le tonus vasomoteur et l'autorégulation

Les PGs jouent des rôles importants dans le tonus vasculaire et dans l'autorégulation des débits sanguins cérébraux et oculaires (Pickard, 1980; White, 1982; Leffler, 1985b; Chemtob, 1991) Selon les PGs, les effets vasomoteurs produits par ces agents varient; la PGD₂, la PGI₂ et jusqu'à un certain point la PGE₂ cause une vasodilatation, tandis que la PGF_{2α} cause une vasoconstriction. De plus, il existe une différence ontogénique dans les effets vasomoteurs produits par la PGE₂ et la PGF_{2α}. Chez l'adulte, ces dernières sont de puissants vasoconstricteurs (Chemtob, 1989; Hayashi, 1985); alors que chez le nouveau-né, elles sont des vasodilatateurs ou des vasoconstricteurs très négligeables (Chemtob, 1989; Li, 1996).

La PGE₂ a été identifiée comme la plus importante des PGs causant une vasodilatation durant la période périnatale (Hayashi, 1985),

et elle contribuerait au contrôle de la résistance cérébrovasculaire durant la vie foetale (Hayashi, 1985). La PGI₂ est aussi un agent vasodilatateur durant la période périnatale. La PGI₂ réduit le tonus des artères cérébrales chez le porcelet et le babouin durant cette période (Hayashi, 1985; Leffler, 1985b; Park, 1987). Dans des conditions, où il y a une réduction en apport d'oxygène et en nutriments comme dans l'hypoxie, l'asphyxie, et l'hypotension; les niveaux des PGs, notamment la PGE₂ et la PGI₂, sont augmentés afin de contrecarrer la pression de perfusion qui est insuffisante dans ces conditions (Leffler, 1986). Cependant, une étude a montré que les niveaux de PGI₂ dans le plasma des nouveau-nés qui développent une hémorragie intraventriculaire sont aussi élevés (Hutchinson, 1985) Donc, un excès de PGs dilatatrices est bénéfique lorsque la pression de perfusion est insuffisante, mais cet excès peut compromettre une constriction adéquate à la limite supérieure de l'autorégulation des débits sanguins cérébraux. Cette affirmation est confirmée par la modulation pharmacologique par des inhibiteurs de la COX. L'inhibition de la synthèse des PGs par l'indométhacine, prévient la vasodilatation induite par l'hypoxie et l'hypotension (McGowan, 1994). Au contraire, l'inhibition des PGs dilatatrices libérées en réponse à l'hypertension augmente la limite supérieure de l'autorégulation chez le nouveau-né (Chemtob, 1990), et ainsi le débit sanguin cérébral est maintenu constant sur une grande intervalle de pression de perfusion. Ceci pourrait expliquer l'efficacité de l'indométhacine de prévenir des hémorragies intraventriculaires (Bandstra, 1988; Ment, 1988; Ment, 1994).

Les PGs jouent aussi un rôle important dans le contrôle de la circulation sanguine oculaire, elles contribuent à déterminer les limites de l'autorégulation des débits sanguins. L'inhibition des isoformes de la COX et par le fait même des PGs augmente principalement la limite

supérieure de l'autorégulation des débits sanguins oculaires (Chemtob, 1991; Hardy, 1998a). Chez l'humain, les PGs libérées en réponse à une augmentation de pression de perfusion, particulièrement la PGE₂ et PGF_{2α} causent une vasoconstriction (Nielsen 1990; Abran, 1994), mais chez le nouveau-né ces mêmes PGs ont un effet de vasoconstriction très négligeable sur la vasculature oculaire malgré qu'elles soient produites en plus grande quantité.

La raison qui explique la différence ontogénique des effets vasomoteurs de la PGE₂ et la PGF_{2α} dans le contrôle de la circulation sanguine cérébrale et oculaire semble être liée à la densité des récepteurs des PGs qui diffère entre le nouveau-né et l'adulte. Par exemple, la densité des récepteurs de la PGE₂ et la PGF_{2α} est plus basse chez le nouveau-né que chez l'adulte (Abran, 1995). Chez le nouveau-né, non seulement les PGs qui assurent une vasoconstriction sont relativement inefficaces, mais les PGs produisant une relaxation des vaisseaux soit la PGI₂ et la PGD₂ causent une plus grande relaxation lorsqu'on les compare à l'adulte. Ainsi une vasoconstriction minimale produite par la PGE₂ et la PGF_{2α} et une vasodilatation significative engendrée par la PGI₂ et la PGD₂ semble jouer un rôle important dans l'autorégulation des débits sanguins. La très grande concentration des PGs, particulièrement la PGE₂ et la PGF_{2α} dans la période périnatale (Mitchel, 1978) causerait une régulation à la baisse de leurs récepteurs respectifs.

3.5 Les récepteurs des prostaglandines

3.5.1 *La structure des récepteurs des prostaglandines*

Les PGs exercent leurs actions en agissant sur des récepteurs spécifiques. Celles-ci sont membres de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), c'est à dire des récepteurs à sept passages transmembranaires (TM) (Kennedy, 1982; Coleman, 1987). (Figure 6 A, B). Il s'agit du récepteur DP pour la PGD_2 , des sous-types des récepteurs EP_1 , EP_2 , EP_3 et EP_4 pour la PGE_2 , du récepteur FP pour la $PGF_{2\alpha}$ et du récepteur IP pour la PGI_2 . Le clonage de ces récepteurs PGs a été effectué chez plusieurs espèces animales; lesquels ont un degré d'homologie d'environ 20% à 30% en acides aminés. Un résidu de 28 acides aminés, dont 8 sont conservés avec les autres RCPG, s'avère important pour la structure et la fonctionnalité des récepteurs (Dohlman, 1991; Savarese, 1992). Par exemple, l'asparagine dans le deuxième domaine transmembranaire est impliqué dans la liaison du ligand et dans la transduction du signal (Savarese, 1992). Des résidus cystéine dans la première et deuxième boucle extracellulaire contribuent à la stabilisation des récepteurs en formant des ponts disulfides (Dohlman, 1991).

D'autre part, les récepteurs PGs contiennent des séquences qui se différencient des autres RCPG incluant, des séquences dans la deuxième boucle extracellulaire (G-R-Y-X-X-Q-X-P-G-T/S-W-C-F) et dans le troisième et le septième domaine transmembranaire (M-X-F-F-G-L-X-X-L-L-X-X-X-A-M-A-X-E-R et L-X-A-X-R-X-A-S/T-X-N-Q-I-L-D-P-W-V-Y-I-L) (Ushikubi, 1995; Narumiya, 1999). Ces régions conservées entre les récepteurs des PGs chez plusieurs espèces animales jouent un rôle dans la structure du domaine de liaison du ligand. Par exemple, il a été proposé qu'un résidu arginine dans le septième domaine

transmembranaire conservé parmi les récepteurs des PGs est le site de liaison pour un groupe acide carboxylique (Huang C, 1995; Audoly, 1997). Des résidus sont aussi conservés parmi les récepteurs des PGs pour la transduction du signal.

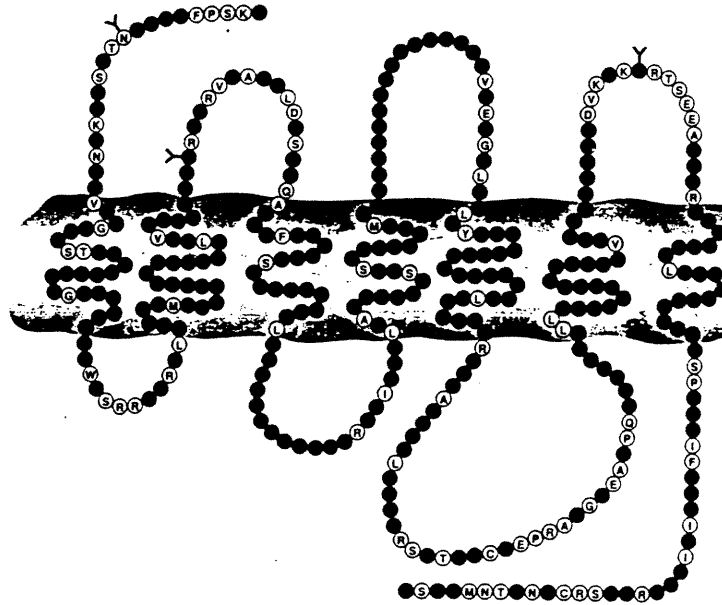


Figure 6 (A). Structure du récepteur DP

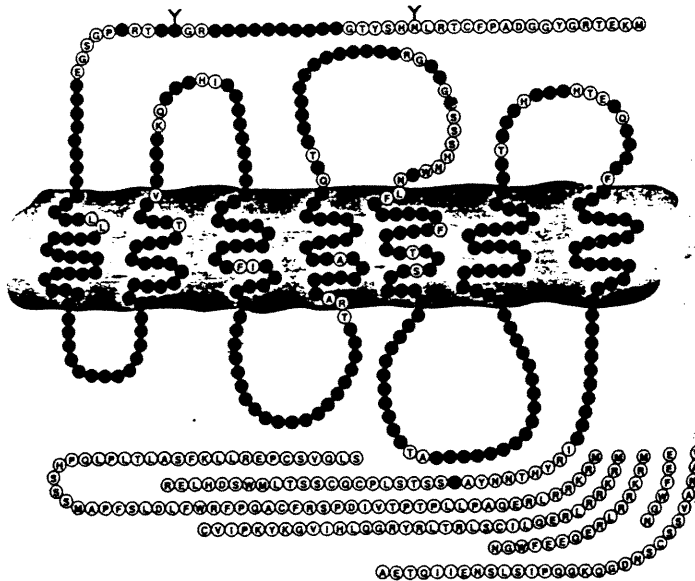


Figure 6 (B). Structure du récepteur EP₃

3.5.2 La transduction du signal des récepteurs des prostaglandines

Les récepteurs partageant des voies de signalisation en commun ont un degré d'homologie en acides aminés plus élevé comparés aux récepteurs qui partagent le même ligand. (Regan, 1994; Boie, 1995; Toh, 1995). Les effets des récepteurs PGs sur le muscle lisse révèlent cette relation. Par exemple, les récepteurs DP, IP, EP₂, et EP₄ induisant une relaxation sur le muscle lisse partagent un haut degré d'homologie comparés aux autres récepteurs. De façon similaire, les récepteurs EP₁ et FP causant une contraction du muscle lisse sont semblables au niveau des acides aminés comparés aux autres récepteurs. Les récepteurs des PGs sont souvent ainsi regroupés en trois groupes: (1) DP, EP₂, EP₄, et IP; (2) EP₁, FP; (3) EP₃.

Le premier groupe (DP, EP₂, EP₄, et IP) est couplé à une protéine Gs, laquelle active l'adénylate cyclase (AC) pour augmenter la formation d'adénosine mono phosphate 3,5-cyclique (AMPC) (Honda, 1993; Regan, 1994). Cependant, le récepteur IP peut être aussi couplé à une protéine Gq qui augmente la production d'inositol phosphate et conduire à l'élévation de la concentration du calcium (Namba, 1994). Le deuxième groupe des récepteurs des PGs (EP₁, FP) active la phospholipase C pour augmenter la libération de l'inositol phosphate et la concentration du calcium intracellulaire par le couplage à une protéine Gq (Suba, 1987; Watabe, 1993; Abramovitz, 1994). Finalement, le troisième groupe, c'est à dire le récepteur EP₃, couplé à une protéine Gs, Gi ou Gq augmente ou diminue la formation de l'AMPC, ou active la production de l'inositol phosphate (Namba, 1993). Une augmentation de l'inositol phosphate et une diminution de l'AMPC sont associées à une contraction des vaisseaux sanguins, tandis qu'une augmentation de l'AMPC est souvent liée à une vasodilatation (Suba, 1987). Puisque cette thèse aborde les récepteurs DP et EP, ceux-ci sont discutés (Tableau 3).

Tableau 3. La transduction du signal, les agonistes et les antagonistes des récepteurs des prostaglandines

Type	Isoforme	Protéine G associée	Transduction du signal	Agonistes	Antagonistes	Sélectivité et/ou affinité des agonistes et des antagonistes
DP		Gs	↑AMPc	BW 245C, ZK110841, RS93520, 15(S)-methyl PGD ₂	BW A868C K _i = 1.7nM	BW245C>RS93520>PGI ₂ , BWA868 C> ZK110841>>PGE ₂ K _d (PGD ₂)=1.5nM, 40nM
EP ₁	EP ₁ EP _{1-vanil}	Gq	↑IP, ↑Ca ²⁺ ↓Ca ²⁺	17-phenyl trinor sulprostone	AH16809, SC-19220	PGE ₂ ≡7-phenyltrinor PGE ₂ , ≡ iloprost>sulprostone>M&B28,767 K _d (PGE ₂)= 1nM, 21nM
EP ₂		Gs	↑AMPc	Butaprost, AH13205, 11-deoxy PGE ₂ , misoprostol, 19 (R) hydroxy PGE ₂	Aucun	PGE ₂ >PGE ₁ >16,16dimethyl PGE ₂ > 11-deoxy PGE ₁ > butaprost > AH13205, 19 (R) hydroxy PGE ₂ K _d (PGE ₂) = 1-6.5nM
EP ₃	EP _{3A} EP _{3B} EP _{3C} EP _{3D}	Gi Gs Gs Gi/s/q	↓AMPc ↑AMPc ↑AMPc ↓AMPc, ↑AMPc, ↑IP	M&B28,767, enprostil, GR63799, AY23626, sulprostone, TE13356	Aucun	M&B28,767 ≡ sulprostone ≡ TE13356 ≡PGE ₂ ≡ PGE ₁ >PGF _{2α} , misoprostol >iloprost >PGD ₂ K _d (PGE ₂) = 1-3nM
EP ₄		Gs	↑IP/↑Ca ²⁺	Aucun	AH23848B	PGE ₂ = PGE ₁ > 11-deoxy PGE ₁ = 16,16 dimethyl PGE ₂ > 1-hydroxy PGE ₂ >> butaprost K _d (PGE ₂) 1-3 nM
FP		Gq	↑IP/↑Ca ²⁺	17-phenyl trinor PGF _{2α} , latanoprost, fluprostenol, prostalene, cloprostenol	PGF _{2α} , dimethyl amide, PGF _{2α} , dimethyl amine	cloprostenol ≡ PGF _{2α} ≡ fluprostenol > PGE ₁ , α>PGD ₂ >PGE ₂ >iloprost K _d (PGF _{2α}) 1-3nM
IP		Gs/Gq	↑AMPc, ↑IP	Carbaprostacyclin, cicaprost, octimibate, 13,14-dehydro-15-cyclohexyl	Aucun	cicaprost ≡ iloprost ≡ PGI ₂ > octimibate>carbaprostacyclin>PGE ₂ , PGD ₂ K _d (PGI ₂)

3.5.2.1 *Le récepteur DP*

Le récepteur DP isolé chez la souris (Hirata, 1994) et l'humain (Boie, 1995) est composé respectivement de 357 et 359 acides aminés avec un poids moléculaire de 40 012 et 40 276. La séquence des acides aminés montre un haut degré de similarité avec les récepteurs EP₂, EP₄, et IP. Le récepteur DP est couplé à l'activation de l'AC via une protéine régulatrice de type Gs causant une augmentation des niveaux d'AMPc. La régulation pharmacologique du récepteur DP peut être obtenue en utilisant des agonistes (BW 245C, ZK110841) ou des antagonistes (BW A868C) (Coleman, 1994).

3.5.2.2 *Les récepteurs EP (EP₁, EP₂, EP₃ et EP₄)*

Les nombreux rôles physiologiques attribués à la PGE₂ sont dus aux différents sous-types des récepteurs EP (EP₁, EP₂, EP₃ ou EP₄), lesquels sont couplés à une variété de voies de signalisation de la transduction.

Le récepteur EP₁

Le récepteur EP₁ cloné chez la souris (Watabe, 1993), le rat (Boie, 1997) et l'humain (Funk, 1993), partage un degré d'homologie d'environ 85% en acides aminés. Des sites de phosphorylation pour les protéines kinases dépendant de l'AMPc et des protéines kinases C ont été identifiés (Watabe, 1993; Funk, 1993; Okudu-Ashitaka, 1996). L'activation du récepteur EP₁ est souvent couplée à une protéine Gq, qui stimule la phospholipase C, conduisant à une augmentation de l'inositol

phosphate et à l'induction de la mobilisation de l'influx de calcium intra- et extra-cellulaire (Coleman, 1994; Funk, 1993). Deux variants ont été identifiés pour le récepteur EP₁ (EP₁ et EP_{1-variant}) (Okuda-Ashitaka, 1996). Le récepteur EP_{1-variant} ne contient pas la région des acides aminés conservée dans le septième domaine transmembranaire avec les autres récepteurs des PGs (Okuda-Ashitaka, 1996). Des agonistes (17 phényl trinor PGE₂) et des antagonistes (AH6809) sont souvent utilisés pour la régulation pharmacologique du récepteur EP₁ (Coleman, 1994).

Le récepteur EP₂

Le récepteur EP₂ a été cloné chez la souris (Katsuyama, 1995; Regan, 1995) et l'humain. (Smock, 1999). Le récepteur EP₂ contient des sites de phosphorylation pour la protéine kinase A et plusieurs résidus serine et thréonine pour la phosphorylation des kinases. Ces derniers semblent jouer un rôle dans la désensibilisation du récepteur (Negishi, 1993).

La stimulation du récepteur EP₂ couplée à une protéine Gs active l'AC qui augmente la production de l'AMPc (Coleman, 1994). Cette activation de l'AC est liée à la dilatation de plusieurs vaisseaux sanguins (Coleman, 1994; Negishi, 1993).

Contrairement au récepteur EP₁, l'expression du récepteur EP₂ est élevée (Katsuyama, 1995). Les résultats obtenus sur des souris transgéniques au niveau de l'homéostasie de la pression sanguine sont contradictoires. L'hypertension (Kennedy, 1999) et l'hypotension (Tilley, 1999) ont été observées chez ces souris déficientes en EP₂. Le récepteur EP₂ joue aussi un rôle important dans le système reproducteur féminin.

Chez des souris femelles déficientes en EP₂, on observe une réduction des portées, une diminution dans l'ovulation et dans le taux de fertilisation (Kennedy, 1999; Tilley, 1999; Hizaki, 1999). Ces études moléculaires suggèrent des effets régulateurs sur l'homéostasie de la pression sanguine et la fertilité par l'action du récepteur EP₂.

Butaprost, 11-deoxy PGE₂, AH13205, misoprostol sont des agonistes souvent utilisés pour la régulation pharmacologique du récepteur EP₂ (Coleman, 1994).

Le récepteur EP₃

Le récepteur EP₃ a été cloné et de nombreuses isoformes ont été identifiées chez plusieurs espèces animales, incluant la souris (Negishi, 1993; Sugimoto, 1993), le rat (Takeuchi, 1993), le porc (Namba, 1993), le lapin (Breyer, 1994) et l'humain (Adam, 1994; Kotani, 1997; Regan, 1994). Chez l'humain, neuf isoformes du récepteur EP₃ ont été identifiées jusqu'à maintenant. Ces isoformes varient à l'extrémité C-terminale ont des fonctions différentes. Malgré leurs propriétés de liaison du ligand quasiment identiques, ces isoformes sont couplées à des protéines G différentes, conduisant ainsi à des voies de signalisation différentes. Les sous-unités α et β sont couplées à la protéine régulatrice de type Gi conduisant à l'inhibition de la voie de signalisation de l'AC. La sous-unité γ est au contraire couplée aux protéines régulatrices de type Gi et Gs, conduisant à l'inhibition de l'AC à faible concentration de la PGE₂ et à une stimulation à forte concentration. Chez le bovin, quatre isoformes du récepteur EP₃ ont été identifiées (3A, 3B, 3C, 3D); lesquelles sont aussi couplées à des protéines G différentes (Namba, 1993). L'isoforme 3A couplée à la protéine Gi inhibe l'activité de l'AC, les isoformes 3B et

3C couplées à la protéine Gs augmentent l'activité de l'AC, tandis que l'isoforme 3D couplée à Gi, Gs et Gq inhibe et augmente l'activité de l'AC ainsi que d'augmenter l'activité de la phospholipase C. Bien que l'extrémité C-terminale du récepteur EP₃ influence la spécificité du couplage et l'activité des protéines G (Namba, 1993; Pierce, 1995; Narumiya, 1996), des études chimériques ont démontré que d'autres régions de la structure du récepteur EP₃ peuvent être importantes telle la troisième boucle intracellulaire (Neuschafer-Rube, 1997). (Figure 6).

La régulation pharmacologique du récepteur EP₃ peut être obtenue en utilisant des agonistes tels M&B 28,767 et GR 63799. Bien que le sulprostone agit comme un agoniste du récepteur EP₁, il est reconnu comme un agoniste potentiellement spécifique au récepteur EP₃.

Le récepteur EP₄

Le récepteur EP₄ a été cloné chez la souris, le rat et l'humain (An, 1993; Bastien, 1994; Sando, 1994). Comme pour le récepteur EP₂, le récepteur EP₄ contient des sites de phosphorylation pour la protéine kinase A et plusieurs résidus serine et thréonine pour la phosphorylation des kinases dans la partie C terminale (Negishi, 1993a).

L'activation du récepteur EP₄ couplée à une protéine Gs augmente la formation de l'AMPc. Cette augmentation est liée à une vasodilatation (Coleman, 1994). Le récepteur EP₄ semble être essentiel à la survie puisque les souris déficientes en récepteur EP₄ ne survivent pas (Nguyen, 1997). La régulation pharmacologique peut être obtenue par l'utilisation de l'antagoniste AH23848 (Coleman, 1994).

3.6 Évidences des récepteurs des prostaglandines au niveau de l'enveloppe nucléaire

Plusieurs études suggèrent la possibilité d'interaction des PGs avec des récepteurs présents au niveau de la membrane nucléaire. Tout d'abord, les enzymes impliquées dans la synthèse des PGs, c'est à dire la COX-1, la COX-2 et la PLA₂ ont été identifiées au niveau de la membrane nucléaire (Morita, 1995; Spencer, 1995; Schievella, 1995); ensuite des sites de liaison intracellulaires aux PGs ont été observés (Rao, 1995); la présence d'un transporteur pour les PGs pourrait faciliter l'action intra-cellulaire des PGs au niveau de la membrane nucléaire (Kanai, 1995; Lu, 1996; Schuster, 1998); Finalement, des récepteurs des PGs au niveau de la membrane nucléaire ont été identifiés dans de nombreux tissus et ils interviennent dans la modulation de la transcription génique tels c-fos et iNOS (Bhattacharya, 1998; Bhattacharya, 1999). À partir de ces résultats, on peut suggérer que la présence des récepteurs des PGs au niveau de l'enveloppe nucléaire joue un rôle dans plusieurs fonctions nucléaires dont entre autre la régulation de l'expression des gènes, et ainsi influencer plusieurs fonctions biologiques au cours du développement.

II. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

L'hypothèse:

Le NO s'est révélé comme un messenger biologique important, ainsi qu'un agent vasodilatateur puissant durant la période périnatale. Il jouerait un rôle dans la synaptogénèse, la différenciation neuronale et dans le contrôle de la circulation sanguine au cours du développement du cerveau et de la vasculature. L'augmentation de l'activité des NOS constitutives aurait pour but de préserver des fonctions cellulaires et circulatoires importantes; toutefois les mécanismes qui sont responsables de cette activité accrue durant la période périnatale demeurent méconnus. Certaines études suggèrent un rôle des PGs dans la régulation de la NOS inducible, et d'autres ont démontré une relation temporelle et fonctionnelle entre l'activité des NOS et des PGs en période périnatale. En se basant sur ces informations, nous avons proposé l'hypothèse, que la production des PGs synthétisées par la COX contrôle l'expression des NOS constitutives (n-et e-NOS) durant la période périnatale. Nos études ont été faites sur des tissus neuronaux (cerveau et vaisseaux sanguins cérébraux) et sur un tissu vasculaire non neuronal (choroïde) chez deux espèces animales (rat et porc).

Les objectifs principaux étaient:

- 1) Étudier l'ontogénèse des NOS constitutives (n- et e-NOS) et des PGs en mesurant l'expression des ARN messagers des NOS et des COX, les niveaux de protéines, l'activité des NOS et les niveaux des PGs.
- 2) Déterminer le rôle des PGs dans la régulation de l'expression des NOS

constitutives en modulant la synthèse des PGs par des inhibiteurs de la COX (ibuprofène et nimesulide).

3) Caractériser le (s) type (s) de PGs et de son/ses récepteurs impliqué (s) dans ce processus par la régulation pharmacologique avec des agonistes et des antagonistes des PGs.

4) Déterminer le rôle physiologique d'une telle régulation sur le tonus vasomoteur par l'utilisation d'agents vasoactifs, et sur l'autorégulation des débits sanguins par l'utilisation de microsphères radioactives.

Contribution de l'auteur aux articles scientifiques

ARTICLE INTITULÉ:

PGE₂, via EP₃ receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period Dumont I, Peri KG, Hardy P, Hou X, Martinez-Bermudez AK, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. *Am J Physiol* 275: R1812-1821 (1998)

L'étudiante Isabelle Dumont a mené à bien toutes les expériences dont les résultats sont présentés dans cette article. L'analyse et l'interprétation de même que la rédaction de cette article ont été effectués en majeure partie par Isabelle Dumont, sous la supervision du Dr Chemtob. Les autres coauteurs ont principalement contribué à l'interprétation des résultats et à la correction de l'article.

ARTICLE INTITULÉ:

Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vessels of newborn pig by prostaglandin E₂ Dumont I, Hou X, Hardy P, Peri KG, Beauchamp M, Najarian T, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 627-633 (1999)

La majorité des résultats expérimentaux présentés dans cette article a été obtenue suite à des expériences réalisées par l'étudiante Isabelle Dumont. Les expériences de vasomotricité et ont toutefois été accomplies par le Dr. Hou.

L'analyse et l'interprétation de même que la rédaction de cette article ont été effectués en majeure partie par Isabelle Dumont, sous la supervision du Dr. Chemtob. Les autres coauteurs ont principalement contribué à l'interprétation des résultats et à la correction de l'article.

ARTICLE INTITULÉ:

Régulation of endothelial nitric oxide synthase by PGD₂ in the developing choroid Dumont I, Hardy P, Peri KG, Hou X, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. *Am J Physiol* 278: H60-66.

La majorité des résultats expérimentaux présentés dans cet article a été obtenue suite à des expériences réalisées par l'étudiante Isabelle Dumont. Les expériences de vasomotricité et d'autorégulation ont toutefois été accomplies par les docteurs Hou et Hardy.

L'analyse et l'interprétation de même que la rédaction de cet article ont été effectués en majeure partie par Isabelle Dumont, sous la supervision du Dr Chemtob. Les autres coauteurs ont principalement contribué à l'interprétation des résultats et à la correction de l'article.

III ARTICLE INTITULÉ :

PGE₂, via EP₃ receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period

Am J Physiol 275 :R1812-R1821, 1998

PGE₂, via EP₃ receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period

ISABELLE DUMONT,^{1,3} KRISHNA G. PERI,¹ PIERRE HARDY,¹ XIN HOU,¹ ANA KATHERINE MARTINEZ-BERMUDEZ,² STÉPHANE MOLOTCHNIKOFF,³ DAYA R. VARMA² AND SYLVAIN CHEMTOB^{1,2}

¹Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, Research Center of Hôpital Ste-Justine, Montreal, H3T-1C5, ²Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Canada, H3G-1Y6, and ³Faculty of Biological Sciences, University of Montreal, Montreal, H3C-3J7.

Running title: Regulation of NOS by PGE₂

To whom correspondence should be addressed:

Sylvain Chemtob, MD, PhD, FRCPC
Research Center of Hôpital Ste Justine
3175 Côte Ste. Catherine
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5
Tel: (514) 345-4691 or 4729
Fax: (514) 345-4801
E-mail: chemtobs@ere.umontreal.ca

1.1 Abstract

We tested the hypothesis that high prostaglandin levels during the perinatal period might regulate brain nitric oxide synthase (nNOS) expression. nNOS and cyclooxygenase (COX)-2 mRNAs were higher in brain cortex and periventricular area of newborn rats and pigs compared to adult brain. NOS activity was also 2½-4 fold higher in newborn than in adult brain. Administration of nonselective COX inhibitor ibuprofen or COX-2 inhibitor nimesulide every 8 h for 24 h to newborn rats and pigs reduced prostaglandin levels and caused comparable reductions in nNOS mRNA, protein and activity to levels of adult; COX inhibitor-induced changes were prevented by co-treatment with PGE₂ analog, 16,16-dimethyl PGE₂, and agonist for the EP₃ receptor of PGE₂, sulprostone, but not by PGI₂ analog carbaprostacyclin, PGD₂, EP₁ receptor agonist 17-phenyl trinor PGE₂ and EP₂ agonist butaprost. Concordant observations were made *in vitro* and revealed that nNOS expression (detected by NADPH diaphorase reactivity) mostly present in neurons of the deeper cortical layers was reduced by COX inhibitor, and this effect was prevented by EP₃ agonist. In conclusion, high levels of PGE₂ in neonatal brain contribute to the increased expression of nNOS by acting on EP₃ receptors; this positive interaction between PGE₂ and nNOS might be required physiologically for normal brain development.

Keywords: Cyclooxygenase-2, nNOS, PGE₂, EP₃ receptors, newborn.

1.2 Introduction

THE THREE ISOFORMS of nitric oxide synthase (NOS) include the calcium-independent isoform expressed mainly in macrophages and the calcium-dependent isoforms present in endothelial cells (eNOS) and neuronal tissues (nNOS) (22). Nitric oxide (NO), formed via neuronal NO synthase (nNOS), acts as a signal for the development and shaping of neuronal cells and their activity (6,55), as well as the control of blood supply to the brain in response to metabolic demands (30). More than 95% of all NOS activity in the brain is attributed to nNOS (17,25,29).

NOS displays a precise pattern of increased activity in the nervous system during the perinatal period in various species including rodents, pigs, cats and proposed for humans as well (6,9,40,52,58). These developmental changes in NOS activity immediately precede a period of maximal synaptogenesis (20,40,61) for which it has been implicated (57). Similar functions have been ascribed to cyclooxygenase (COX)-2 (39,61,32). The mechanisms regulating this high NOS activity in the perinatal period are not well understood. Although a role for estrogens has been suggested, this contribution is only partial (40). A role for prostaglandins in regulating NOS activity has been proposed under certain conditions. It has been reported that COX inhibitors markedly inhibit NO production in rat alveolar macrophages (2); this has led to the suggestion that the inhibition of prostaglandin synthesis results in an inhibition of NOS gene expression and in turn in a decreased NO synthesis. There is also evidence that constitutive NOS (eNOS and nNOS) can potentially be induced by prostaglandins (51). Furthermore, the suggested role of estrogens in partially governing NOS activity (40) may be partly mediated by prostaglandins since estradiol can stimulate prostaglandin synthesis (46).

Prostaglandin synthesis is catalyzed by COX-1, which is mostly constitutive, and COX-2, a readily inducible isozyme (59). We have previously shown that COX-2 expression is increased in brain cortex and periventricular white matter of the newborn and is its main source of high prostaglandin levels, such that COX-2 activity accounts for approximately 80% of total COX activity in perinatal brain, whereas in the adult it is responsible for less than 10% of total COX activity (39,50); COX-1 expression is unaltered in brain during this developmental period (39,50). Because NOS has the potential of being induced by prostaglandins (2,51), and both prostaglandin levels as well as NOS activity have been found to be high in brain tissue of the perinate (6,9,31,39,40,42,50,52), we hypothesized that high levels of prostaglandins regulate the expression of nNOS in brain in the newborn. For this purpose, we characterized the ontogeny of nNOS and COX-2 in brain cortex and periventricular region of neonatal rats and pigs and determined the role of COX-2-derived prostaglandins in inducing nNOS expression. Our findings reveal that PGE₂ exerts a positive control over nNOS expression in the brain during the perinatal period, and that this effect is mediated via the EP₃ subtype of PGE₂ receptors.

1.3 Materials and Methods

Chemicals. Butaprost was a gift from Miles (West Haven, CT) and M&B28,767 from Rhone-Poulenc Rorer (UK). The following products were purchased: polyclonal rabbit antibody specific to nNOS from (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA); β -actin cDNA from (Ambion, Austin, TX); α -[32 P]CTP (3000 Ci/mmol), enhanced chemiluminescence kit, and L-[3 H]arginine from (Amersham, Mississauga, ON, Canada); pepstatin and leupeptin from (Boehringer Mannheim, Montreal, Que, Canada); nimesulide, ibuprofen, aspirin, neutral red, soybean trypsin inhibitor (type II-S), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), β -mercaptoethanol, 1,4-dithiothreitol, HEPES, EDTA, EGTA, L-arginine, N^G-nitro-L-arginine (L-NA), N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), NADPH, FAD, 6R-tetrahydrobiopterin, and β -NADPH from (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada); 16,16-dimethyl PGE₂, PGD₂, carbaprostacyclin, 17-phenyl trinor PGE₂, and sulprostone from (Cayman, Ann Arbor, MI); 7-nitroindazole (Tocris Cookson, St. Louis, MO); ribonuclease A, T₇ sequencing kit from (Pharmacia Biotech, Montreal, Que, Canada); pGEM3 plasmid vector and *in vitro* transcription kit from Promega (Madison, WI); Dowex AG-50W-X8 resin, protein assay and electrophoretic reagents purchased from (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada); guanidinium isothiocyanate, T4 DNA ligase, restriction enzymes from (BRL Life Technologies, Burlington, ON, Canada); radioimmunoassay kits for PGE₂, PGD₂ and 6-keto-PGF_{1 α} (Advanced Magnetics, Boston, MA); all others chemicals were from Fisher Scientific, Montreal, Que, Canada.

Animals. Time-pregnant Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River, St. Constant, Québec, and maintained on a schedule of 12 h light:12 h

darkness (lights on 07.00-19.00 h) at 22-25°C and 50-70% humidity and fed *ad libitum* rat chow and tap water. Newborn (1-2 days old) Yorkshire pigs were purchased from Fermes Ménard, L'Ange Gardien, Québec. Adult (6-8 months) pig brains were collected from an abbatoir immediately after sacrifice and brought to the lab on ice. Animals were used according to a protocol of the Animal Care Committee of St. Justine Hospital, Montréal, Québec. Pregnant rats were decapitated after anesthesia with pentobarbital (60 mg/kg ip), and 17 and 19 days old fetuses were immediately delivered thereafter by caesarian section. A group of pregnant rats were allowed to deliver and pups were studied at 6, 8, 10, 12 and 15 days of age. Frontoparietal brain cortex and periventricular area from rat pups was collected following decapitation. Tissues from adult animals were obtained from males as well as non-pregnant females; results were independent of gender. Newborn pigs were anesthetized with halothane and polyethelene catheters were placed in the jugular vein for intravenous injections. Piglets were killed with pentobarbital (120 mg/kg) for the removal of brain.

Treatments. Rat pups (9 days old) were randomly assigned to intraperitoneal treatment every 8 h for 24 h with saline, non selective COX inhibitor ibuprofen (40 mg/kg), COX-2 inhibitor nimesulide (5 mg/kg) (21), or a combination of nimesulide with one of the following: 16,16-dimethyl PGE₂ (stable PGE₂ analog, 10 µg/kg), carbaprostacyclin (PGI₂ analog, 1 µg/kg), PGD₂ (10 µg/kg), 17-phenyl trinor PGE₂ (agonist of the EP₁ receptor of PGE₂, 20 µg/kg), butaprost (agonist of the EP₂ receptor of PGE₂, 100 µg/kg), sulprostone (EP₃ agonist, 10 µg/kg) (13); animal age selected was based upon pilot studies which revealed near-peak expression of nNOS (see confirmation in Fig. 1). Newborn pigs were treated with the same agents as described for rats. The 24 h treatment duration was based on pilot experiments which revealed that acute (≤2 h) administration of COX

inhibitors was ineffective in altering nNOS expression. Doses of ibuprofen and nimesulide used in this study have previously been shown to reduce prostaglandin levels to those found in the adult pig (23,38); and doses of prostaglandins and analogs administered have been demonstrated to alter prostaglandin levels and/or cause effects *in vivo* (3,34,47). In addition, conversely we tested the role of NO on COX-2 expression; accordingly, animals were treated every 8 h for 24 h with L-NAME (1 mg/kg [26]).

In separate experiments, slices (2-3 mm) of newborn pig brain cortex were incubated for 12-18 h in culture medium without or with (10 μ M) ibuprofen, nimesulide, or a combination of nimesulide (10 μ M) and a PGE₂ analog (1 μ M): PGD₂, carbaprostacyclin, 16,16-dimethyl PGE₂, 17-phenyl trinor PGE₂, butaprost, sulprostone or M&B28,767 (selective EP₃ agonist) (13).

Preparation of cRNA probes for rat and pig nNOS, pig destrin and rat COX-2, and ribonuclease protection assays. The partial cDNAs encoding rat and pig nNOS and pig destrin mRNAs (45) were synthesized by RT-PCR respectively from rat and porcine cerebellar total RNA. Reverse transcription of total RNA followed by amplification of the cDNA using the gene specific primer sets were conducted as previously described (49,50). The primer pair for porcine destrin were: 5'-ATG ATG CAA GCT TTG AAA CC -3' and 5'-GGA AGC TTT CGA TCT GTG G -3'. The primer pairs for porcine nNOS were: 5'- GGG GGA TCC ARG ART AYG ARG ART GGA ART GG -3' (QEYEEWKW) and 5'- GGG GAA TTC GAT RTC RAA YTG CGY TGY TGC CA -3' (WQQRQFDIQ), based on the consensus amino acid sequences (in parentheses) of human and rat nNOS sequences. The amplified product (0.4 Kb) were digested with appropriate restriction enzyme (underlined

sequences in the primers denote the restriction sites) and cloned into pGEM4 vector.

Rat nNOS cDNA was amplified as above with the following primer pair: 5'- GCA CAT TTG CAT GGG CTC GA -3' and 5'- CCT CTG CAG CGG TAT TAT TC -3'. The amplified product (1.0 Kb) was digested with Bam HI and the 0.214 Kb fragment was cloned into pGEM4. The nucleotide sequences of rat and pig nNOS partial cDNAs were determined by sequencing, multiple clones using T₇ sequencing kit. The partial cDNAs of pig (50) and rat COX-2 (49) were previously described.

[³²P]-Labelled cRNA probes for nNOS and COX-2 were prepared using an *in vitro* transcription kit (Promega). Total RNAs from brain cortex was obtained as described previously (11). Aliquots of the total RNAs were subjected to ribonuclease protection assays according to a published protocol (4) with minor modifications. Briefly, 60 µg of total RNA was mixed with 10⁵ cpm of nNOS or COX-2 probes in 20 µl of hybridization buffer (80% deionized formamide, 40 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EDTA and 0.4 M NaCl), denatured at 90°C for 5 min and incubated overnight at 50°C. The RNA hybrids were digested with ribonuclease A (10 µg/ml) and ribonuclease T₁ (200 units/ml) in 200 µl of digestion buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, and 0.3 M NaCl) for 30 min at 25°C. Proteinase K treatment followed by precipitation of protected fragments was conducted exactly as described (4). The protected RNA fragments were resolved on urea-8% polyacrylamide gels and the bands were visualized by phosphorimaging (Molecular Dynamics) and quantified densitometrically.

Western blotting. Western blotting for nNOS was performed using a method previously described (1,49,50). Brain cortex was homogenized in a buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 137 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, and 10 µg/ml each of leupeptin, pepstatin, soybean trypsin inhibitor,

0.2 mM PMSF) with an Omni tissue grinder for 15-20 s; whole tissue lysates were used since nNOS is contained in both membrane and cytosolic fractions (8,28). Protein was determined by dye-binding assays using bovine serum albumin as the standard. After the addition of β -mercaptoethanol to aliquots of supernatants (100 μ g protein) to a final concentration of 10%, the samples were denatured by boiling for 5 min and resolved by electrophoresis on an 8% SDS-polyacrylamide gel. The transfer of tissue lysate proteins to membranes and immunoblotting using antibodies (1:2000) against nNOS were conducted exactly as previously described (1,50). Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence (Amersham, Canada) as recommended by the supplier.

NOS activity. NOS activity was determined by the conversion of L-arginine to L-citrulline (53) as previously described (26). Briefly brain tissue was homogenized in 5 ml ice-cold homogenization buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM 1,4-dithiothreitol, 5 mM glucose, 1 mM PMSF, and 20 μ g/ml each of aprotinin, leupeptin, and soybean trypsin inhibitor). The homogenate was centrifuged at 12,000 x g for 15 min and the protein content of the supernatant determined by the dye-binding method. An aliquot of the supernatant (100-200 μ g protein) was incubated in the absence or the presence of the NOS inhibitor L-NA (1 mM) or the selective nNOS inhibitor 7-nitroindazole (100 μ M) (44) in incubation buffer (in mM: HEPES 50, pH 7.5, 1,4-dithiothreitol 1, EDTA 1, and CaCl_2 1.25) with 0.1 mM L-arginine (containing 1 μ Ci L-[^3H]arginine [1 μ Ci/mmol specific activity]), 1 mM NADPH, 15 μ M 6R-tetrahydrobiopterin, 1 μ M FAD, and 1 μ M calmodulin for 10 min at 37°C. The reaction was terminated by addition of 1 ml ice-cold 100 mM HEPES buffer (pH 5.5) containing 10 mM EGTA and 500 mg Dowex AG-50W-X8 cation exchange resin and immediately centrifuged at 10,000 x g for 20 min. Radioactivity in the L-[^3H]citrulline-containing

supernatant was counted. Total NOS and nNOS activities were respectively measured from the L-NA- and 7-nitroindazole-sensitive production of L-[³H]citrulline from L-[³H]arginine. iNOS activity was determined by adding EGTA (10 mM) to the incubation buffer. Constitutive NOS activity, mostly all nNOS in brain tissue (25,29), was obtained by subtracting iNOS activity from total L-NA-sensitive NOS activity. 7-Nitroindazole-sensitive NOS activity was measured as total NOS activity minus that after addition of 7-nitroindazole.

Prostaglandin assays. Brain tissue was homogenized and centrifuged at 1,000 x g for 10 min at 4°C; the supernatant was homogenized again and recentrifuged at 50,000 x g for 30 min at 4°C. Extraction and measurement of PGE₂, PGD₂ and 6-keto-PGF_{1α} (stable PGI₂ metabolite) in the supernatant was performed as previously described in detail (38,50).

NADPH diaphorase histochemistry. NADPH diaphorase reactivity which is currently a well established marker for NOS (5,15), was performed using a method previously described (36). Brain slices were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1% phosphate buffer saline (pH 7.4) overnight at 4° C and then placed in 30% sucrose buffer for 2 days. Tissue sections 40 μm thick were made with a cryotome. The free-floating sections were incubated in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1% β-NADPH at 37° C for 60 min. Following the reaction, the sections were rinsed in phosphate buffer and mounted onto slides. The slides were air dried and treated in chloroform for 30 min to remove background staining and counterstained with neutral red (0.13 g/100 ml).

Statistics. Data were analyzed by analysis of variance, comparison among means test (Tukey-Kramer method) and Student's *t*-test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data are presented as means \pm S.E.

1.4 Results

Ontogeny of nNOS and COX-2 mRNA in rat and pig brain. nNOS and COX-2 mRNAs were expressed in rat fetal brain cortex and periventricular area on days 17 and 19 of gestation, and exhibited an age-related increase that peaked on postnatal day 10, after which they declined (Fig. 1). In pig, expression of nNOS and COX-2 mRNA was approximately 3-fold greater in newborn than in adult brain cortex (Fig. 2a,b) and periventricular area (data not shown).

nNOS protein immunoreactivity and NOS activity in newborn and adult pig brain. As was the case with nNOS mRNA, nNOS immunoreactive protein and constitutive NOS activity in newborn pig brain cortex was 2½-4 fold greater than that in the adult (Fig. 2c-e). Similar age-related differences were observed in the periventricular region. L-NA and 7-nitroindazole-sensitive NOS activities yielded equivalent results, which reflects the predominant nNOS activity in brain (25,29); for instance, L-NA and 7-nitroindazole-sensitive NOS activity in newborn brain cortex were respectively 62 ± 12 and 55 ± 10 pmol/min/mg protein. iNOS activity was approximately one tenth that of nNOS and did not significantly differ between newborn and adult.

Modulation of nNOS mRNA expression by prostaglandins in the newborn rat. Treatment of 9 days old rat pups for 24 h with COX-2 inhibitor nimesulide or nonselective COX inhibitor ibuprofen reduced brain PGE₂ concentrations (pg/mg protein) from 201 ± 54 to 87 ± 14 and 72 ± 15 , respectively; comparable reductions were observed for PGD₂ and 6-keto-PGF_{1α}. Prostaglandin levels in the adult (eg. PGE₂: 79 ± 10 pg/mg protein) were similar to those in treated newborns. Treatment with COX inhibitors

for 24 h (but not acute, ≤ 2 h) caused a significant reduction in the expression of nNOS mRNA in brain cortex and periventricular region of the newborn to levels found in the adult (Fig. 3a-d). Effects of COX inhibitors on nNOS mRNA were prevented by co-treatment with 16,16-dimethyl PGE₂ (stable PGE₂ analog), but unaltered by the other major prostaglandins, namely PGI₂ (utilizing carbaprostacyclin) and PGD₂, at similar doses; prostaglandin and analog doses used have previously been shown to change prostaglandin levels and/or cause effects *in vivo* (3,34,47). Treatments did not affect mRNA expression of β -actin.

In order to assess if conversely high NO synthesis in the newborn affected COX-2 expression, a separate group of rat pups were treated with L-NAME (1 mg/kg [26]). L-NAME did not affect COX-2 mRNA expression or tissue PGE₂ levels (data not shown) as we previously reported for the latter (27). Studies were therefore pursued to ascertain the role of COX-2 products on nNOS mRNA, protein and activity in the perinate.

Modulation of nNOS mRNA and protein expression by prostaglandins in the newborn pig. Experiments conducted in the rat pup utilizing prostaglandin synthesis inhibitors and prostaglandin analogs were repeated in the newborn pig for confirmation. In addition, since PGE₂ seemed to be the major prostaglandin involved in the regulation of nNOS expression (Fig. 3), the PGE₂ receptor(s) (EP₁, EP₂, EP₃ and/or EP₄ [13]) mediating these actions was investigated using receptor agonists. Treatment of newborn pigs with nimesulide reduced brain PGE₂ concentrations (pg/mg protein) from 297 ± 43 to 68 ± 17 levels similar to those of the adult, 80 ± 15 . Nimesulide caused a significant decrease in the expression of nNOS mRNA and immunoreactive protein (Fig. 4a,b). This effect was prevented by 16,16-dimethyl PGE₂ and sulprostone (agonist of EP₃ receptors of PGE₂), but not by 17-phenyl trinor PGE₂ (EP₁ agonist) and butaprost (EP₂ agonist); role for

EP₄ was not investigated because this receptor is not detected in newborn brain tissue (37).

Effects of COX inhibitors and prostaglandins on NOS activity in newborn brain. We examined if PGE₂-elicited changes in nNOS mRNA and protein are reflected in NOS activity. NOS activity in newborn rat and pig brain cortex and periventricular region was similarly decreased to adult levels by COX inhibitors, ibuprofen and nimesulide (shown in Fig. 5a,b). This reduction was prevented by co-treatment with 16,16-dimethyl PGE₂ and EP₃ agonist sulprostone but not with the same dose (10 µg/kg every 8 h x 3) of PGD₂.

In vitro modulation of newborn brain nNOS activity by COX inhibitors, prostaglandins and PGE₂ receptor agonists. To examine whether effects of PGE₂ on NOS expression *in vivo* and dependent upon EP₃ receptors (Figs. 11-13) are mediated directly on brain, experiments were conducted *in vitro*. Incubation of slices of newborn pig brain cortex with ibuprofen or nimesulide for 18 h caused a significant and equivalent reduction in 7-nitroindazole-sensitive NOS activity (Fig. 6a). 16,16-Dimethyl PGE₂, sulprostone as well as the selective EP₃ receptor agonist M&B28,767, prevented COX inhibitor-induced decrease in NOS activity. In contrast, PGD₂, carbaprostacyclin, 17 phenyl trinor PGE₂ or butaprost (at high concentrations of 1 µM), did not alter effects of nimesulide. Prevention of nimesulide-induced decrease in NOS activity by EP₃ agonists *in vitro* was also reflected on nNOS mRNA and this effect was EP₃ agonist (sulprostone) concentration-dependent (Fig. 6b).

Modulation of nNOS-containing brain cells by prostaglandins. To localize the neural elements producing NO that are modulated by prostaglandins,

slices of newborn pig brain incubated for 12 h in culture medium without or with nimesulide or a combination of nimesulide with sulprostone were stained for NADPH diaphorase activity. This approach was based on numerous reports demonstrating that NOS fully accounts for NADPH diaphorase activity as identified histochemically (5,15). The major modulation of NADPH diaphorase staining by prostaglandins was located in neurons of the deepest layers of the brain cortex and in the immediate underlying white matter consistent with prominent location of NOS in forebrain (5,36); whereas NADPH diaphorase reactivity of cerebral microvessels due to eNOS expression (5,43) was unaffected by prostaglandin modulation (Fig. 7). Incubation of slices of newborn pig brain with COX-2 inhibitor nimesulide for 12 h caused a 3-fold reduction in NADPH diaphorase positive cells (Fig. 7). This effect was prevented by the EP₃ receptor agonist sulprostone. Hematoxylin and eosin staining (10) of brain slices revealed no adverse effect of prostaglandin modulation on cell number (data not shown) as previously reported (7,48); hence, the effect of prostaglandins was on the expression of nNOS.

1.5 Discussion

NO has been attributed with important roles in neural development and synaptogenesis in early life (33,57,60), and its formation is relatively high during the perinatal period in nearly all species (6,9,26,31,40,42,50,52,58). Similar functions and ontogenic changes have been observed for COX-2-derived prostaglandins (32,39,50,61). Based on evidence that prostaglandins can regulate NOS expression *in vitro* (2,51), we set out to investigate whether these eicosanoids contribute to the perinatal regulation of nNOS expression and activity. Our findings reveal that the high levels of PGE₂ in the brain of the neonate, arising from COX-2, contribute to the increased expression of nNOS in brain cortex and periventricular region by acting on EP₃ receptors, as demonstrated on two distinct species, namely rat and pig, and shown both *in vivo* and *in vitro*.

Evidence that nNOS is regulated by prostaglandins, specifically PGE₂, in the perinatal period is based on numerous observations: 1) The main COX isoform responsible for catalysis of prostaglandin generation in brain of the young neonate, namely COX-2 (39,50), exhibits a profile of ontogenic changes similar to that of nNOS mRNA in the rat (Fig. 1). Although it was not practical to follow the ontogeny of NOS from fetal to adult life in pigs, we demonstrated nonetheless an equivalent abundance of nNOS in brain of the newborn pig relative to that of the adult, consistent with changes observed for COX-2 (Fig. 2). 2) More convincingly, a reduction in prostaglandin synthesis (sustained [24 h], but not acute) in newborn brain to levels in the adult, using either non-selective or COX-2-selective inhibitors, resulted in decreased expression of nNOS mRNA, immunoreactive protein, and activity in brain cortex and periventricular region of rats and pigs. 3) Among the major prostaglandins, PGE₂ was the one that prevented COX-inhibitor-induced reduction in nNOS expression

and activity. This effect, was observed *in vivo* (Figs. 3 and 5), as well as *in vitro* after incubation of newborn brain slices with COX inhibitors and PGE₂ analogs (Fig. 6); these data also suggest that the *in vivo* modulation of nNOS by PGE₂ is the result of a direct action of this prostaglandin, which is most specifically observed on brain neuronal cells (Fig. 6b). Inefficacy of PGD₂ and carbaprostacyclin *in vivo* cannot be explained by insufficient dosing which was comparable for all prostaglandins and analogs, and previously shown to alter prostaglandin levels and/or cause effects *in vivo* (3,34,47). Moreover, inability of high concentrations (1 μM) of PGD₂ and carbaprostacyclin to reverse effects of COX inhibitors *in vitro* additionally supports their inefficacy (Fig. 6).

The effect of PGE₂ on nNOS expression in newborn brain seems to depend upon EP₃ receptor activation. Correspondingly, actions of PGE₂ in preventing COX-inhibitor-induced reduction in nNOS expression and activity were reproduced specifically by EP₃ receptor agonists, sulprostone and M&B28,767 (13), and demonstrated *in vivo* and *in vitro* (Figs. 3, 4 and 6). It is relevant to point out that EP₃ was previously shown to be the only PGE₂ receptor detected in newborn cerebrum (37). The mechanism through which EP₃ activation induces nNOS expression is not known; stimulation of c-fos (55), for which binding sites on the nNOS gene promoter are found in the 5' regulatory sequence (24), is a possibility. Altogether, our observations reveal that PGE₂, via EP₃ receptors, is the principal prostaglandin involved in the regulation of brain nNOS in the newborn. Along these lines one may suggest that the previously reported partial role of estrogens in regulating NOS activity in brain (40) may in part be attributed to prostaglandins (46).

At the cellular level, modulation of NADPH diaphorase staining by prostaglandins was located in the deepest layers of the cortex and in the immediately adjacent white matter in the area corresponding to the subplate

neurons which are the first ones to be generated in the developing mammalian cortex (12) and are critical in synaptogenesis and maturation of neuronal phenotype (14). Of interest the developmental and regional profile of COX-2 (16,32,50), nNOS (6,16), along with that of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor expression (54,56) which *per se* is coupled to NO production (41), coincides with the critical period for activity-dependent synaptic remodeling (19,35). In addition, an intimate relationship between neural cells and blood vessels (18) which are also known to contain abundant NOS and COX-2 in the perinatal period (1,50, and present paper [Fig. 7]) may also suggest a significant contribution for products of these enzymes in coupling developing synaptic activity with local cerebral microcirculation (18). Because NO and COX-2 products seem to play important roles in neural development and synaptogenesis (32,33,39,50,57,60,61) our observations provide a link for these distinct factors in shaping neural development by disclosing a major role for PGE₂ in modulating nNOS expression through action on EP₃ receptors.

In conclusion, our data reveal a mechanism for increased activity of nNOS in brain during the perinatal period, contributed by actions of EP₃ receptors of PGE₂ which *per se* is generated by equivalently high catalytic activity of COX-2 (39,50, and present study). Of interest, a similar role for prostaglandins has recently been suggested in the regulation of NOS in the eye (1). At present the mechanisms responsible for increased COX-2 expression in the perinate remain unknown; these are currently under investigation. We speculate that the positive interaction between nNOS and COX-2 in brain disclosed in this study might be required physiologically for normal neural development (19,35,57,60,61).

PERSPECTIVES

Nitric oxide and prostaglandin formation is abundant in the brain of the perinate relative to that of the older subject, at a time critical for synaptogenesis and cortical development. Both these factors (NO and prostaglandins) have independently been attributed significant roles in these crucial functions of neural development as well as in the control of coupled cerebral microcirculation. The present study clearly demonstrates an interaction between prostaglandins and NO. Of the prostaglandins specifically PGE₂, via its EP₃ receptors, was found to regulate nNOS mRNA and protein expression as well as its activity in brain cortex, mostly in its deepest layers and adjacent white matter, predominantly in neurons; of relevance, EP₃ is the main PGE₂ receptor found in the perinatal brain parenchyma. Based on our findings we propose a concerted interaction between NO and PGE₂ at a crucial period of ontogeny, which may be implicated in synaptogenesis and cortical brain development.

1.6 Acknowledgments

The authors wish to thank Mrs. Hendrika Fernandez for technical support, and Dr. P. Russo (pathologist) for assisting in interpretation of histological data. We are also grateful to Les Fermes Ménard Inc., L'Ange Gardien, Québec, for their generosity in supplying us with piglets. This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, the Heart and Stroke Foundation of Québec, the Hospital for Sick Children Foundation, the March of Dimes Birth Defects Foundation, the United Cerebral Palsy Foundation, the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. Isabelle Dumont is a recipient of a studentship from the Ministry of Indian and Northern Affairs, Canada, and Ana-Katherine Martinez-Bermudez was awarded a studentship from the Medical Research Council of Canada. Pierre Hardy is recipient of a fellowship award from the Medical Research Council of Canada. Sylvain Chemtob is a recipient of a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

1.7 References

1. **Abran, D., I. Dumont, P. Hardy, K. Peri, D.-Y. Li, S. Molotchnikoff, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Characterization and regulation of prostaglandin E₂ receptor and receptor coupled functions in the choroidal vasculature of the pig during development. *Circ. Res.* 80: 463-472, 1997.
2. **Aeberhard, E.E., S.A. Henderson, N.S. Arabolos, J.M. Griscavage, F.E. Castro, C.T. Barret, and L.J. Ignarro.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208: 1053-1059, 1995.
3. **Ando, T., T. Ichijo, T. Katafuchi, and T. Hori.** Intracerebroventricular injection of prostaglandin E₂ increases splenic sympathetic nerve activity in rats. *Am. J. Physiol.* 269: R662-R668, 1995.
4. **Bordonaro, M., C.F. Saccomanno, and J.L. Nordstrom.** An improved T1/A ribonuclease protection assay. *Biotechniques* 16: 428-430, 1994.
5. **Bredt, D.S., C.E. Glatt, P.M. Hwang, M. Fotuhi, T.M. Dawson, and S.H. Snyder.** Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7: 615-624, 1991.
6. **Bredt, D.S., and S.H. Snyder.** Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 13: 301-313, 1994.

7. **Breitner, J.C.** The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* 47: 401-411, 1996.
8. **Brenman, J.E., D.S. Chao, S.H. Gee, A.W. McGee, S.E. Craven, D.R. Santillano, Z. Wu, F. Huang, H. Xia, M.F. Peters, S.C. Froehner, and D.S. Brecht.** Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84: 757-767, 1996.
9. **Buttery, L.D.K., D.R. Springall, F.A.M. Dacosta, H. Oliveira, A.A. Hislop, S.G. Haworth, and J.M. Polak.** Early abundance of nerves containing NO synthase in the airways of newborn pigs and subsequent decrease with age. *Neurosci. Lett.* 201: 219-222, 1995.
10. **Chemtob, S., P. Hardy, D. Abran, D.Y. Li, K. Peri, O. Cuzzani, and D.R. Varma.** Peroxyde-cyclooxygenase interactions in postasphyxial changes in retinal and choroidal hemodynamics. *J. Appl. Physiol.* 78: 2039-2046, 1995.
11. **Chomczynski, P., and N. Sacchi.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987.
12. **Chun, J.J.M., and C.J. Shatz.** Interstitial cells of the adult neocortical white matter are the remnant of the early generated subplate neuron population. *J. Comp. Neurol.* 282: 555-569, 1989.

13. **Coleman, R.A., W.L. Smith, and S. Narumyia.** International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46: 205-229, 1994.
14. **Constantine-Paton, M., H.T. Cline, and E. Debski.** Patterned activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 29-54, 1990.
15. **Dawson, T.M., D.S. Brecht, M. Fotuhi, P.M. Hwang, and S.H. Snyder.** Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7797-7801, 1991.
16. **Dégi, Rózsa., F. Bari, T.C. Beasley, N. Thrikawala, C. Thore, T.M. Louis, and D.W. Busija.** Regional distribution of prostaglandin H synthase-2 and neuronal nitric oxide synthase in piglet brain. *Pediatr. Res.* 43: 683-689, 1998.
17. **Eliasson, M.J., S. Backshaw, M.J. Schell, and S.H. Snyder.** Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localization in the brain. *Proc. Natl. Acad. USA* 94: 3396-3401, 1997.
18. **Estrada, C., and J. DeFelipe.** Nitric oxide-producing neurons in the neocortex: morphological and functional relationship with intraparenchymal microvasculature. *Cerebral Cortex* 8: 193-203, 1998.
19. **Fox, K.** The critical period for long term potentiation in primary sensory cortex. *Neuron* 15: 485-488, 1995.

20. **Galea, E., D.J. Reis, H. Xu, and D.L. Feinstein.** Transient expression of calcium-independent nitric oxide synthase in blood vessels during brain development. *FASEB J.* 9: 1632-1637, 1995.
21. **Gandini, R., C. Montalto, D. Castoldi, V. Monzani, M.L. Nava, I. Scaricabarozzi, G. Vargiu, and I. Bartosek.** First dose and steady state pharmacokinetics of nimesulide and its 4-hydroxy metabolite in healthy volunteers. *Farmaco* 46: 1071-1079, 1991.
22. **Gross, S. S., and M.S. Wolin.** Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 737-769, 1995.
23. **Guerguerian, A.M., P. Hardy, I. Lahaie, M. Bhattacharya, K. Peri, J. Segar, P. Olley, J-C. Fouron, J. St. Louis, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Cyclooxygenase (COX)-2 is the main intrinsic source of prostaglandin in the ductus arteriosus of the newborn but not the fetus. *Pediatr Res.* 41: 21A (abstr).
24. **Hall, A.V., H. Antoniou, Y. Wang, A.H. Cheung, A.M. Arbus, S.L. Olson, W.C. Lu, C.L. Kau, and P.A. Marsden.** Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J. Biol. Chem.* 269: 33082-33090, 1994.
25. **Hara, H., C. Waeber, P.L. Huang, M. Fujii, M.C. Fishman, and M.A. Moskowitz.** Brain distribution of nitric oxide synthase in neuronal or endothelial nitric oxide synthase mutant mice using [³H]L-N^G-nitro-arginine autoradiography. *Neuroscience* 75: 881-890, 1996.

26. **Hardy, P., K.G. Peri, I. Lahaie, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circ. Res.* 79: 504-511, 1996.
27. **Hardy, P., A.M. Nuyt, D. Abran, J. St-Louis, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interactions with prostaglandins. *Pediatr. Res.* 39: 487-493, 1996.
28. **Hecker, M., A. Mulsch, and R. Busse.** Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* 62: 1524-1529, 1994.
29. **Huang, P.L., T.M. Dawson, D.S. Bredt, S.H. Snyder, and M.C. Fishman.** Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75: 1273-1286, 1993.
30. **Iadecola, C., D.A. Pelligrino, M.A. Moskowitz, and N.A. Lassen.** Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 175-192, 1994.
31. **Jones, S.A., S.L. Adamson, I. Bishai, J. Lees, D. Engelberts, and F. Coceani.** Eicosanoids in third ventricular cerebrospinal fluid of fetal and newborn sheep. *Am. J. Physiol.* 264: R135-R142, 1993.
32. **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.
33. **Kendrick, K.M., R. Guevara-Guzman, J. Zorrilla, M.R. Hinton, K.D. Broad, M. Mimmack, and S. Ohkura.** Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature* 388: 670-674, 1997.
34. **Kennedy, T.G., and P.E. Doktorcik.** Effects of analogues of prostaglandin E₂ and F_{2α} on the decidual cell reaction in the rat. *Prostaglandin* 35: 207-219, 1988.
35. **Kirkwood, A., H.-K. Lee, and M.F. Bear.** Co-regulation of long-term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity in visual cortex by age and experience. *Nature* 375: 328-331, 1995.
36. **Kuchiiwa, S., T. Kuchiiwa, S. Mori, and S. Nakagawa.** NADPH diaphorase neurones are evenly distributed throughout cat neocortex irrespective of functional specialization of each region. *Neuroport* 5: 1662-1664, 1994.
37. **Li, D.Y., D.R. Varma, T.K. Chatterjee, H. Fernandez, D. Abran, and S.Chemtob.** Fewer PGE₂ and PGF_{2α} receptors in brain synaptosomes of newborn than of adult pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267: 1292-1297, 1993.
38. **Li, D.Y., D.R. Varma, and S. Chemtob.** 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.

39. **Li, D.Y., P. Hardy, D. Abran, A.K. Martinez-Bermudez, A.M. Guerguerian, M. Bhattacharya, G. Almazan, R. Menezes, K.G. Peri, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Key role for cyclooxygenase-2 in PGE₂ and PGF_{2α} receptor regulation and cerebral blood flow of the newborn. *Am. J. Physiol.* R1283-R1290, 1997.
40. **Lizasoain, I., C.P. Weiner, R.G. Knowles, and S. Moncada.** The ontogeny of cerebral and cerebellar nitric oxide synthase in the guinea pig and rat. *Pediatr. Res.* 39: 779-783, 1996.
41. **Montague, P.R., C.D. Gancayco, M.J. Winn, R.B. Marchase, and M.J. Friedlander.** Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263: 973-977, 1994.
42. **Mitchell, M.D., A. Lucas, P.C. Etches, J.D. Brant, and A.C. Turnbull.** Plasma prostaglandins levels during early neonatal life following term and preterm delivery. *Prostaglandins* 16: 319-326, 1978.
43. **Mitrovic, N., and M. Schachner.** Transient expression of NADPH diaphorase activity in the mouse whisker to barrel field pathway. *J. Neurocytol.* 25: 429-437, 1996.
44. **Moore, P.K., P. Wallace, Z.A. Gaffen, S.L. Hart, and R.C. Babbedge.** Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related diazoles: anti-nociceptive and cardiovascular effects. *Brit. J. Pharmacol.* 110: 219-224, 1993.

45. **Moriyama, K., E. Nishida, N. Yonezawa, H. Sakai, S. Matsumoto, K. Iida, and I. Yahara.** Destrin, a mammalian actin-depolymerizing protein, is closely related to cofilin. *J. Biol. Chem.* 265: 5768-5773, 1990.
46. **Myers, S.I., R.H. Turnage, L. Bartula, B. Kalley, and Y. Meng.** Estrogen increases male rat aortic endothelial (RAEC) PGI₂ release. *Prostag. Leukotr. Ess.* 54: 403-409, 1996.
47. **Oka, T., and T. Hori.** EP₁-receptor mediation of prostaglandin E₂-induced hyperthermia in rats. *Am J. Physiol.* 267: R289-R294, 1994.
48. **Patel, P., J.C. Drummond, T. Sano, D.J. Cole, C.J. Kalkman, and T.L. Yaksh.** Effect of ibuprofen on regional eicosanoid production and neuronal injury after forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* 614: 315-324, 1993.
49. **Peri, K.G., D.R. Varma, and S. Chemtob.** Stimulation of prostaglandin G/H synthase-2 expression by arachidonic acid monooxygenase product, 14,15-epoxyeicosatrienoic acid. *FEBS Lett.* 416: 269-272, 1997.
50. **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.
51. **Radomski, M., R.M.J. Palmer, and S. Moncada.** Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric

- oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87: 10043-10047, 1990.
52. **Riche, D., A.S. Foutz, and M. Denavitsaubie.** Developmental changes of NADPH-diaphorase neurons in the forebrain of neonatal and adult cat. *Dev. Brain Res.* 89: 139-145, 1995.
53. **Salter, M., R.G. Knowles, and S. Moncada.** Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 291: 145-149, 1991.
54. **Sherrif, H.J., H.J. Olverman, H.E. Thomson, C.B. Yates, J. Butterworth, and S.P. Butcher.** Developmental changes in [3H] MK801 binding to human frontal cortex. *J. Neurochem.* 61: S196.
55. **Simonson, M.S., W.H. Herman, and M.J. Dunn.** PGE₂ induces c-fos expression by a cAMP-independent mechanism in glomerular mesangial cells. *Exp. Cell Res.* 215: 137-144, 1994.
56. **Slater, P., S.E. McConnel, S.W. D'Souza, and A.J. Barson.** Postnatal changes in N-methyl-D-aspartate receptor binding and stimulation by glutamate and glycine of [3H]-MK-801 binding in human temporal cortex. *Brit. J. Pharmacol.* 108: 1143-1149, 1993.
57. **Son, H., R.D. Hawkins, K. Martin, M. Kiebler, P.L. Huang, M.C. Fishman, and E.R. Kandel.** Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87: 1015-1023, 1996.

58. **Tsukahara, H., M. Hiraoka, C. Hon, S. Tsuchida, I. Hata, K. Nishida, K. Kikuchi, and M. Sudo.** Urinary nitrite/nitrate excretion infancy: comparison between term and preterm infants. *Early Hum. Dev.* 47: 51-56, 1997.
59. **Williams, C.S., and R.N. DuBois.** Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am. J. Physiol.* 270: G393-G400, 1996.
60. **Wu, H.H., C.V. Williams, and S.C. McLoon.** Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development. *Science* 265: 593-1596, 1994.
61. **Yamagata, K., K.I. Andreasson, W.E. Kaufman, 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.

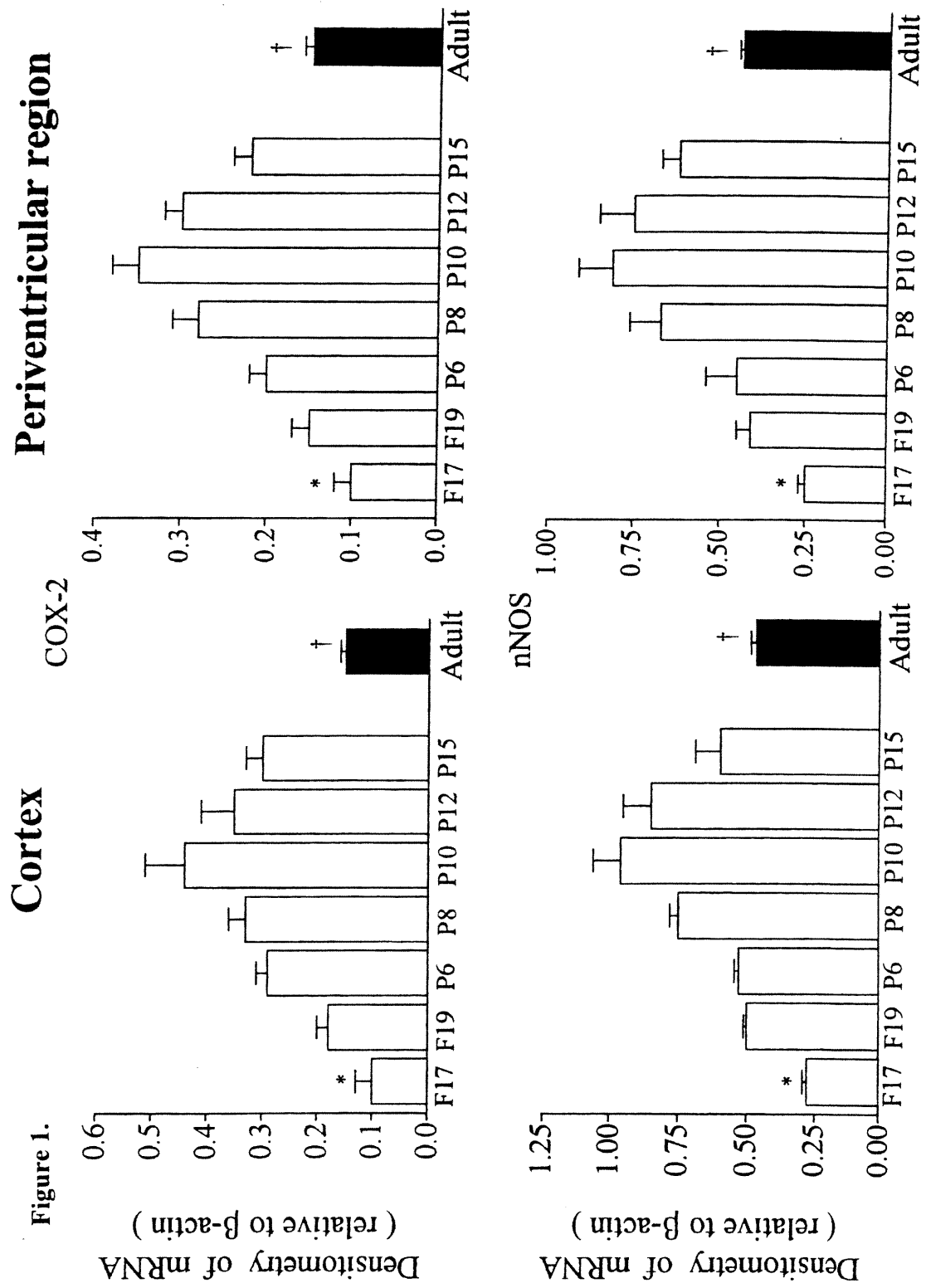


Figure 1. Expression of nNOS and COX-2 mRNA in rat brain cortex and periventricular region at different developmental ages. Total RNA (60 μ g) isolated from fetal, neonatal and adult rat brain was subjected to ribonuclease protection assay. The letters F and P in front of the ages refer to fetal and post-natal, respectively. Values are means \pm SE of 3 experiments for each age. * $p < 0.05$ compared with all other values without asterisk; [†] $p < 0.05$ with values at P8-P15 (by analysis of variance and Tukey-Kramer method).

Figure 2.

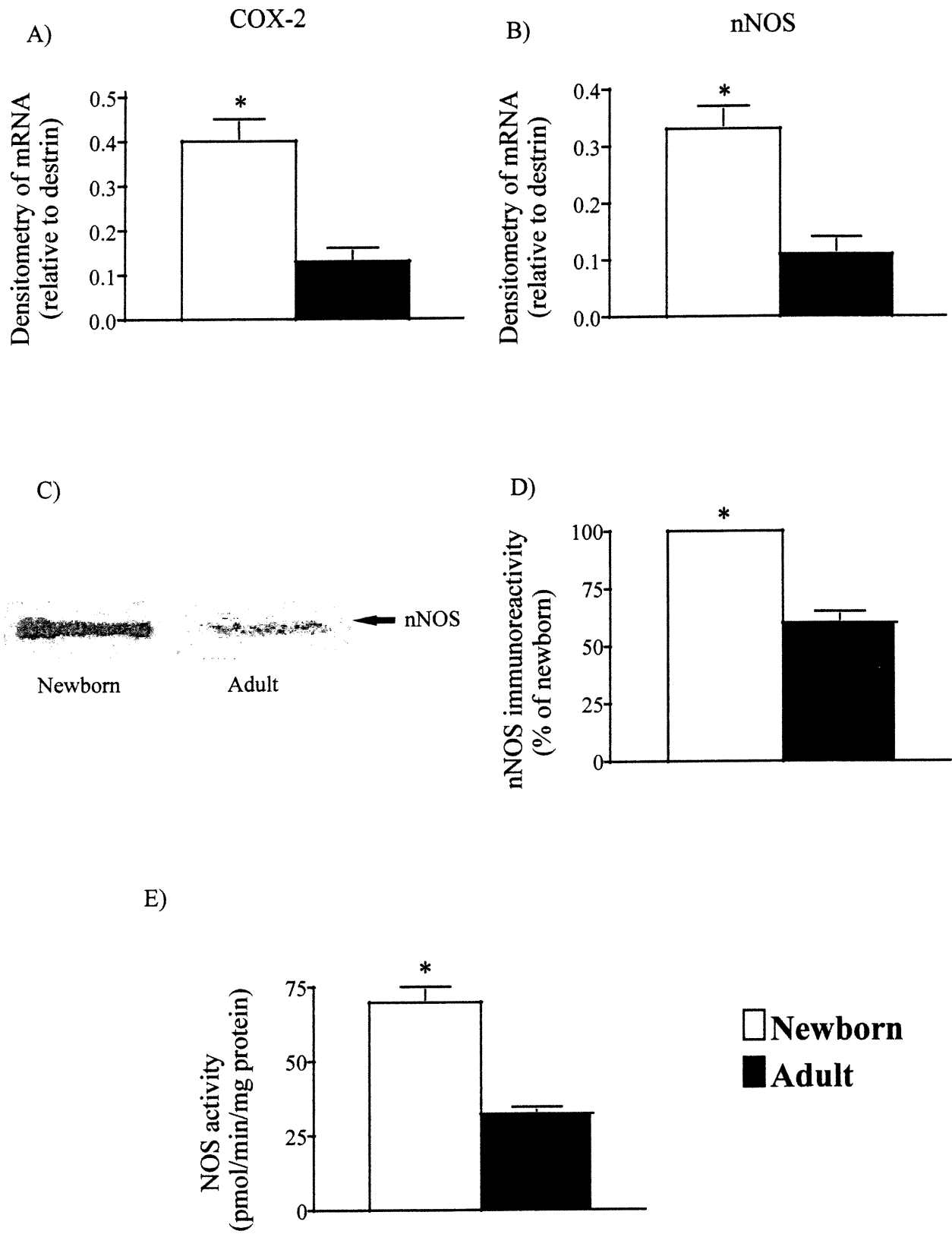


Figure. 2. COX-2 (a) and nNOS mRNA (b), nNOS immunoreactive protein (c,d), and NOS activity (e) in newborn and adult pig brain cortex. (a,b) Total RNA (60 μ g) isolated from pig brain of newborn (1-2 days old) and adult was subjected to ribonuclease protection assay. (c) Western blot lanes were each loaded with 100 μ g protein (Bio-Rad). Arrow points to the nNOS 155 kDa protein, the only band detected in the range of interest, 100-165 kDa. Immunoreactive band densitometry was quantified by chemiluminescence (d). Constitutive brain NOS activity was measured from the L-NA-sensitive production of L-[3 H]citrulline from L-[3 H]arginine after subtracting iNOS activity from total NOS activity as described in the Methods section (e); similar NOS activity was measured by determining 7-nitroindazole-sensitive NOS activity, indicating that the latter reflects mostly nNOS activity. Values are means \pm SE; n=3-4 for each value; * $p < 0.05$ compared with value for the adult.

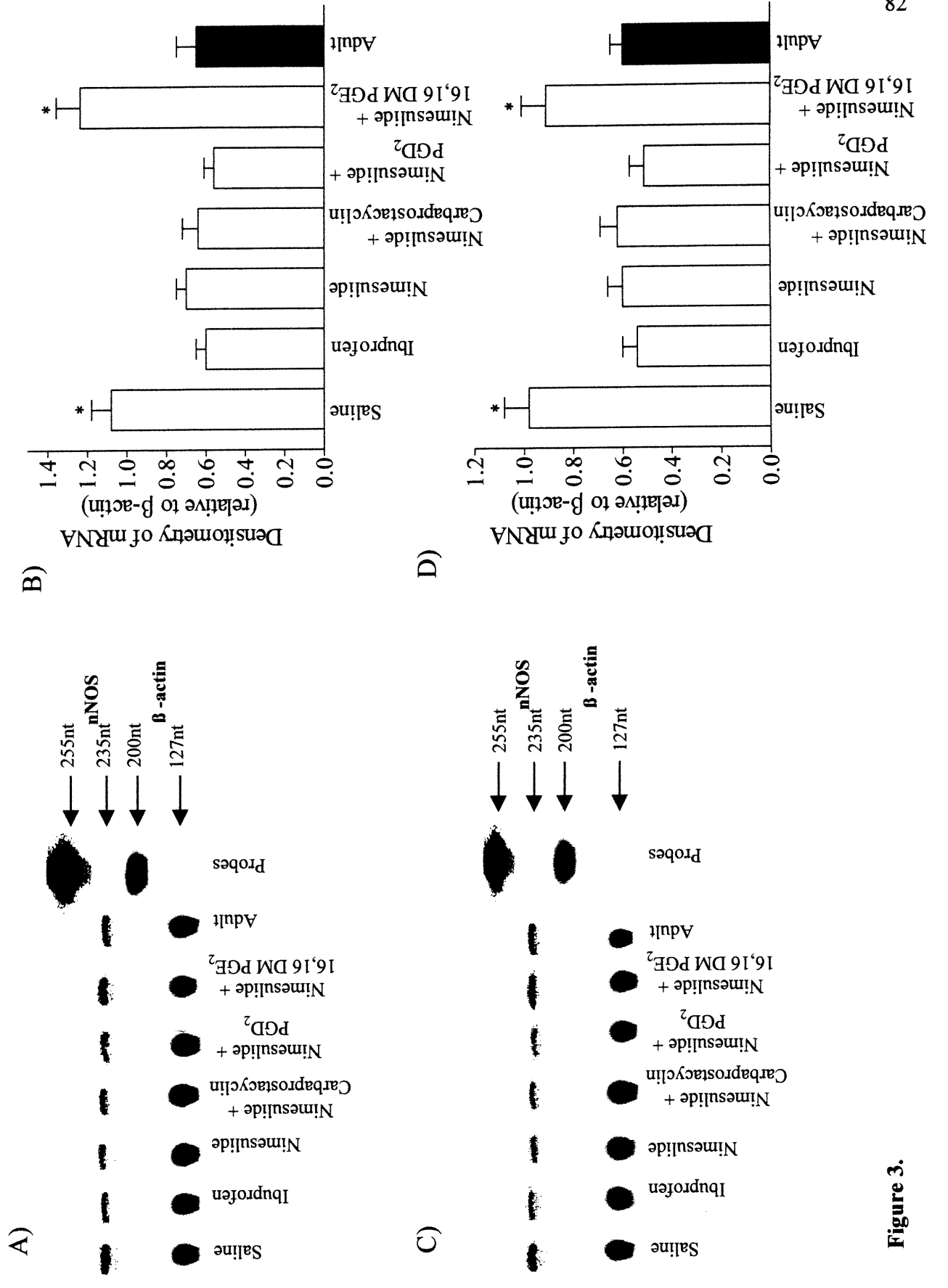


Figure 3.

Figure 3. Modulation of nNOS mRNA expression by prostaglandins in newborn rat brain cortex (a,b) and periventricular area (c,d). Rat pups (9 days old) were treated ip every 8 h for 24 h with saline, ibuprofen (40 mg/kg), nimesulide (5 mg/kg), or a combination of nimesulide (5 mg/kg) and carbaprostacyclin (PGI₂ analog, 1 µg/kg), PGD₂ (10 µg/kg) or 16,16-dimethyl PGE₂ (10 µg/kg). Adult rats were untreated. Total RNA (60 µg) was subjected to ribonuclease protection assay. The nNOS cRNA probe and protected RNA fragment contained respectively 255 and 235 nucleotides (nt), and the cRNA probe and protected RNA fragment for β-actin contained 200 and 127 nt. Autoradiographic exposure was overnight and visualized by phosphorimaging. 16,16 DM PGE₂ refers to 16,16-dimethyl PGE₂. Values in histogram are mean ± SE of 3-4 experiments each. * p < 0.01 compared with other values without asterisk.

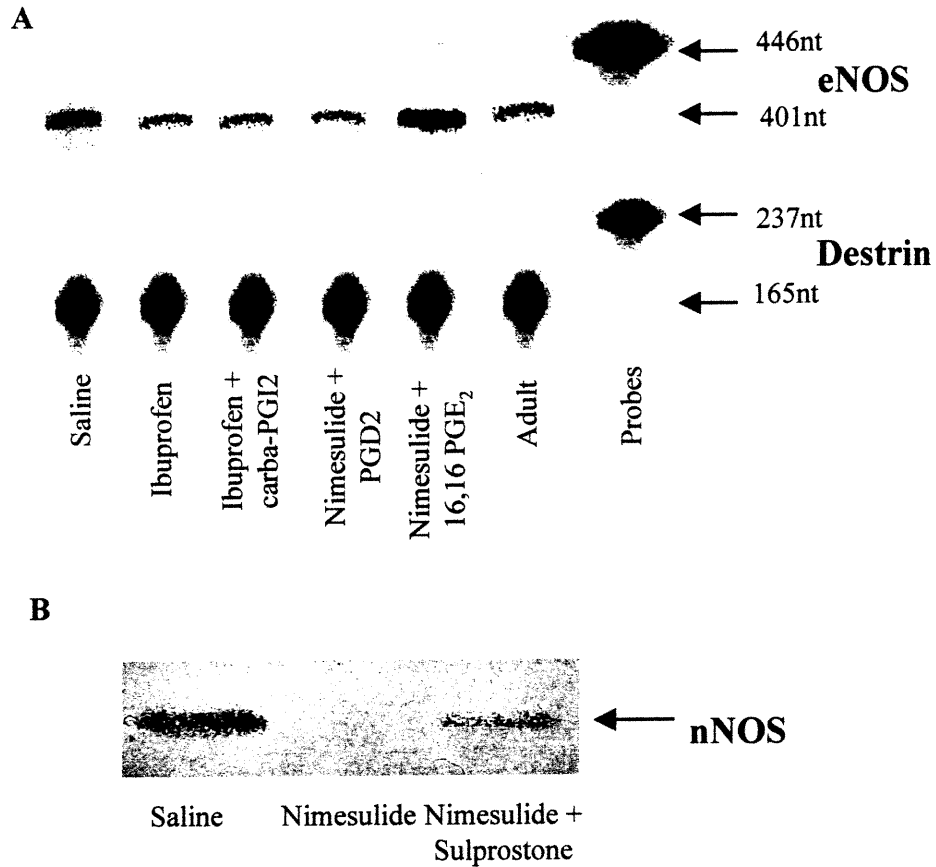


Figure 4. Modulation of nNOS mRNA (a) and protein (b) expression by prostaglandins in newborn pig brain. Newborn pigs (1-2 days old) were treated iv every 8 h for 24 h with saline, nimesulide (5 mg/kg), or a combination of nimesulide (5 mg/kg) and 16,16-dimethyl PGE₂ (10 μg/kg), 17-phenyl trinor PGE₂ (EP₁ agonist, 20 μg/kg), butaprost (EP₂ agonist, 100 μg/kg) or sulprostone (EP₃ agonist, 10 μg/kg). (a) Total RNA (60 μg) was subjected to ribonuclease protection assay as described in the Methods section. The nNOS cRNA probe and protected RNA fragment contained respectively 446 and 401 nucleotides (nt), and the cRNA probe and protected RNA fragment for destrin contained 237 and 165 nt. Autoradiographic exposure was overnight and visualized by phosphorimaging. (b) For Western blot each lane was loaded with 100 μg protein (Bio-Rad). Arrow points to 155 kDa nNOS immunoreactive band revealed by chemiluminescence; a single band was detected in the range of interest, 100-165 kDa. Figure is a typical representation of 4 experiments.

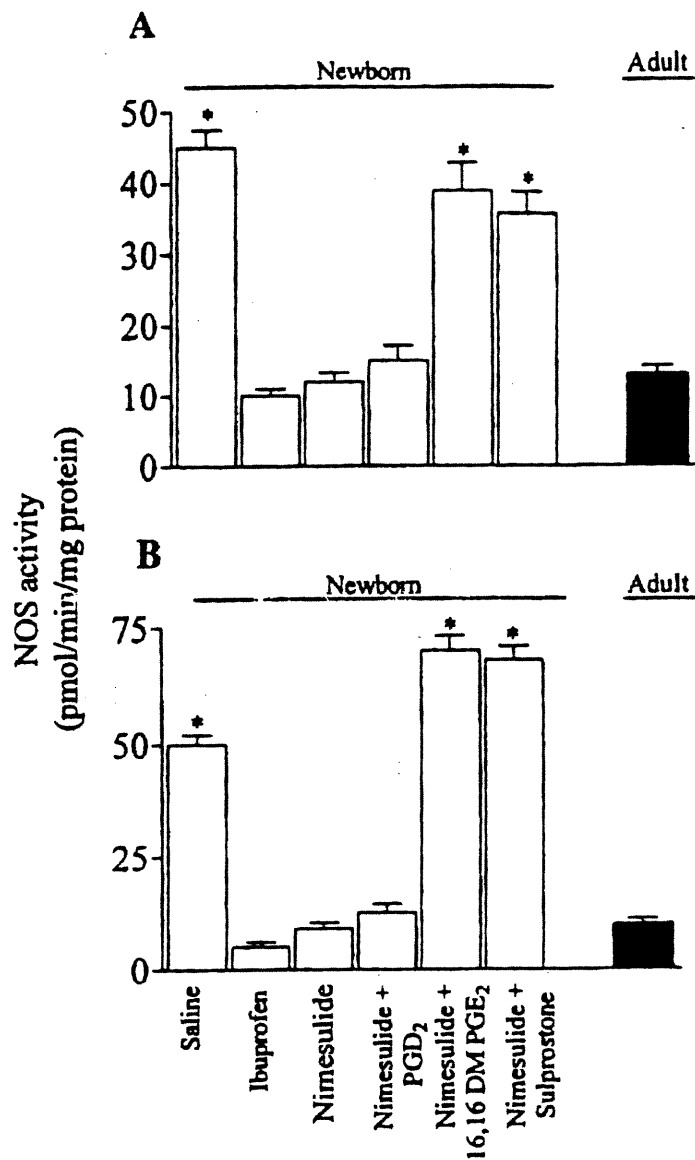


Figure 5. Effects of COX inhibitors and prostaglandins on NOS activity in newborn rat (a) and pig (b) brain. Newborn rats (9 days old) and pigs (1-2 days old) were treated for 24 h with saline, ibuprofen, or nimesulide with and without 16,16-dimethyl PGE₂, sulprostone or PGD₂, as described in Figs. 3 and 4, and in the Methods section. Adult animals were untreated. 7-Nitroindazole-sensitive NOS activity was determined as described in Fig. 2 and in the Methods section. Values are mean \pm SE of 3-4 experiments each. 16,16 DM PGE₂ refers to 16,16-dimethyl PGE₂. * $p < 0.01$ compared with all other values without asterisk (by analysis of variance and Tukey-Kramer method).

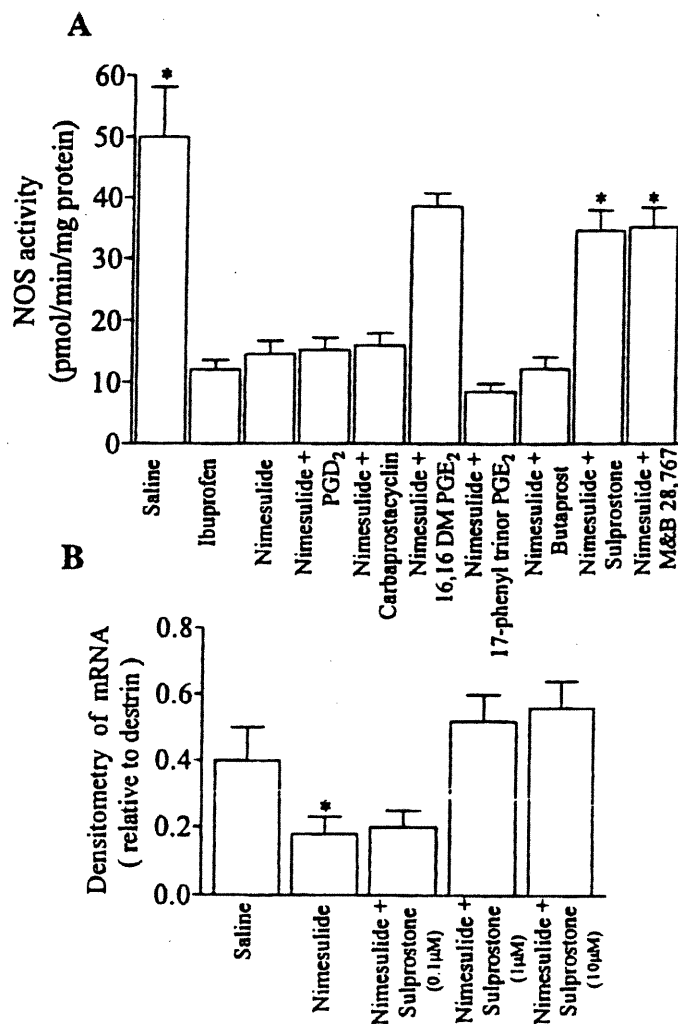
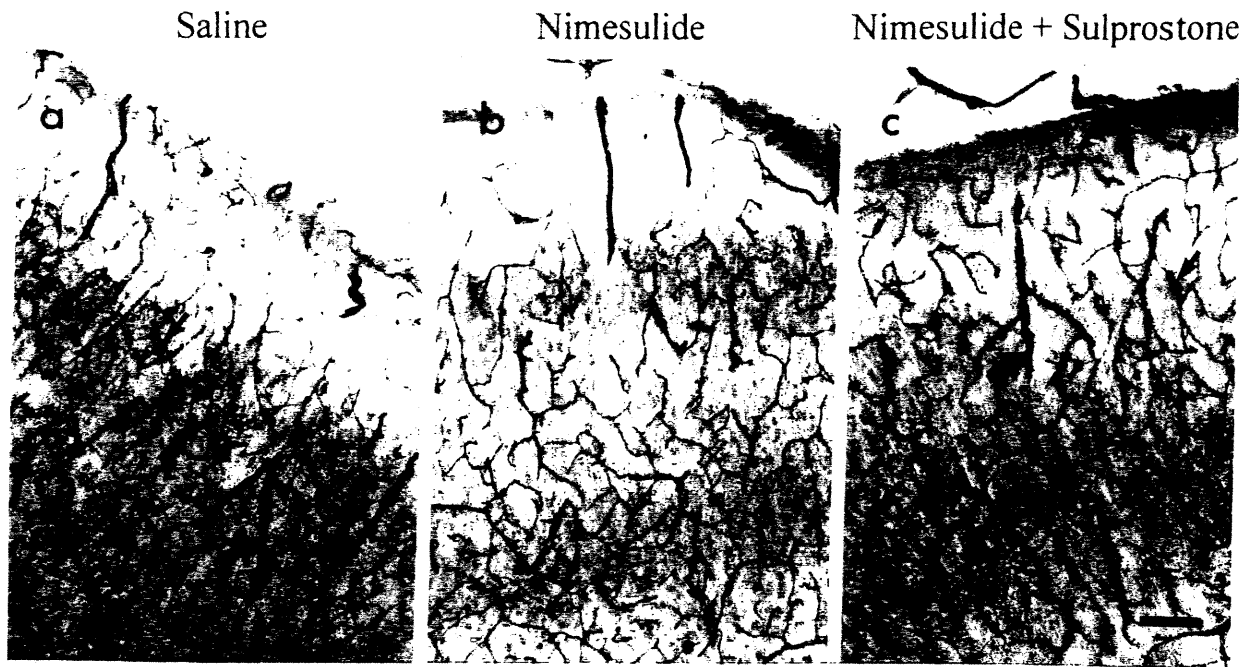


Figure 6. (a) *In vitro* modulation of nNOS activity in newborn pig brain by COX inhibitors in the absence or presence of PGE₂ receptor agonists. Brain cortex slices from 1-2 days old newborn pigs were incubated for 18 h in culture medium without or with 10 μM ibuprofen, nimesulide, or a combination of nimesulide and 1 μM PGD₂, carbaprostacyclin (PGI₂ analog), 16,16-dimethyl PGE₂, 17-phenyl trinor PGE₂ (EP₁ agonist), butaprost (EP₂ agonist), sulprostone or M&B28,767 (EP₃ agonists). 7-Nitroindazole-sensitive NOS activity was measured as described in Fig. 2 and in the Methods section. Values are means ± SEM; n=3 for each value. * p < 0.01 compared with all other values without asterisk (by analysis of variance and Tukey-Kramer method). (b) Dose-response of EP₃ receptor agonist sulprostone on nNOS mRNA expression. Newborn (1-2 days old) pig brain cortex slices were incubated for 18 h in culture medium without or with nimesulide (10 μM), or a combination of nimesulide (10 μM) and sulprostone (0.1, 1 and 10 μM). Total RNA (60 μg) was subjected to ribonuclease protection assay as described in the Methods section. Values are means ± SE; n=3 for each value. * p < 0.05 compared with all other values without asterisk (by analysis of variance and Tukey-Kramer method).

Figure 7.



Neutral red alone

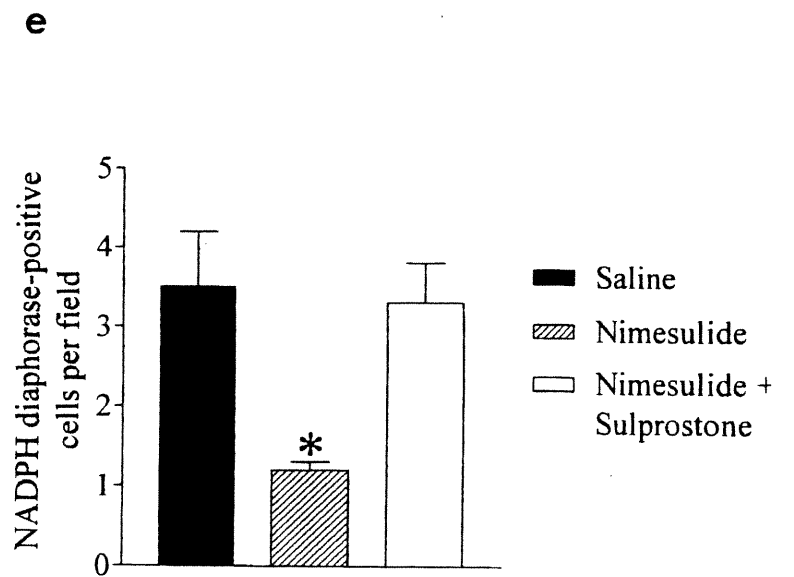


Figure 7. Modulation of NADPH diaphorase staining by prostaglandins. Brain cortex slices from newborn pig incubated for 12 h in culture medium (a) without, or (b) with nimesulide (10 μ M) or (c) a combination of nimesulide (10 μ M) and sulprostone (EP₃ agonist, 1 μ M) were stained for NADPH diaphorase as described in the Methods section; counterstaining by neutral red is shown in (d). Calculated distribution of NADPH diaphorase-positive individual cells per field is presented in (e). Small arrows point to individual NADPH diaphorase-positive cells (which are neurons), and large arrows to blood vessels. Scale bar represents 200 μ m. Values in histogram (e) are mean \pm SE of 3 experiments each. * $p < 0.01$ compared with other values without asterisk (by analysis of variance and Tukey-Kramer method).

IV ARTICLE INTITULÉ

**Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in the cerebral
Vessels of newborn pig by prostaglandin E₂**

J Pharmacol Exp Ther 291: 627-633, 1999

Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vessels of newborn pig by prostaglandin E₂

Isabelle Dumont,^{1,2} Xin Hou,¹ Pierre Hardy,¹ Krishna G. Peri,¹ Martin Beauchamp,¹ Taline Najarian,^{1,3} Stéphane Molotchnikoff,² Daya R. Varma,³ and Sylvain Chemtob^{1,3}

Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, Research Center of Hôpital Ste-Justine, Montreal, H3T-1C5

Running title: NOS regulation by PGE₂

To whom correspondence should be addressed:

Sylvain Chemtob, MD, PhD, FRCPC
Research Center of Hôpital Ste Justine
3175 Côte Ste. Catherine
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5
Tel: (514) 345-4691 or 4729
Fax: (514) 345-4801
e-mail: chemtobs@ere.umontreal.ca

1.1 Abstract

We investigated if prostaglandins regulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the pig cerebral vasculature during the neonatal period. Prostaglandins, eNOS mRNA, eNOS protein and NO production were higher in cerebral microvessels of newborn (1 day old) than of adult (6-8 months) pigs. Treatment of isolated cerebral microvessels of newborn animals with ibuprofen for 24 h reduced eNOS mRNA and nitrite production to levels in the adult; this effect of ibuprofen was prevented by concurrent treatment with PGE₂ analog 16,16-dimethyl PGE₂, nonselective PGE₂ receptor analog 11-deoxy PGE₁, and EP₃ receptor agonists sulprostone and M&B 28,767 but was not modified by PGI₂ analog carbaprostacyclin, PGD₂, and EP₁ receptor agonist 17-phenyl trinor PGE₂. Correspondingly, 16, 16-dimethyl PGE₂ and M&B 28,767 increased eNOS mRNA expression of adult microvessels to values in the newborn. Data similar to those with isolated cerebral vessels were obtained by histochemical analysis (NADPH-diaphorase positivity) of brain from newborn animals treated in vivo with ibuprofen in combination or not with sulprostone. Furthermore, Substance P-induced NO-mediated cerebral vasorelaxation was decreased to adult values by treatment of newborn pigs with ibuprofen; this effect was prevented by concomitant treatment with sulprostone. It is concluded that PGE₂ regulates eNOS in newborn pig cerebral microvessels via EP₃ receptors; this may be physiologically required during normal neurovascular development.

1.2 Introduction

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) plays an important role in the control of cerebral blood flow, metabolism, and in turn in neuronal activity (Ohashi *et al.*, 1998; Prado *et al.*, 1992; Lo *et al.*, 1996). Mice with disrupted eNOS gene are hypertensive and exhibit a reduction in cerebral blood flow (Huang *et al.*, 1995), which could favor cerebral ischemia (Prado *et al.*, 1992; Lo *et al.*, 1996). NOS activity is developmentally regulated in cerebral vasculature (Northington *et al.*, 1996; Northington *et al.*, 1997). Increased cerebrovascular levels of NOS activity during the perinatal period could have functional significance during brain development (Northington *et al.*, 1996; Northington, *et al.*, 1997; Bredt and Snyder, 1994; Estrada and DeFelipe, 1998). However, the mechanisms regulating the ontogeny of cerebrovascular NOS are not known. A role for prostaglandins in regulating inducible NOS expression in macrophages has been proposed (Aeberhard *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 1992; Kuchiiwa *et al.*, 1994; Raddassi *et al.*, 1993); but this type of regulation has never been reported for constitutive NOS, specifically eNOS, and especially not during development.

There is some evidence that the ontogeny of cerebral prostaglandin synthesis parallels that of NOS (Leffler *et al.*, 1993; Peri *et al.*, 1995; Busija, 1997). Based on evidence presented, and because brain microvessels (< 150 μm) are major regulators of cerebral circulation (Baumbach and Heistad, 1985), we hypothesize that high levels of prostaglandins regulate eNOS expression and activity in cerebral microvessels. For this purpose, we characterized the expression of eNOS in cerebral microvessels of newborn and adult pigs and determined whether increased prostaglandin levels in the former modulate eNOS expression, activity and function. Our findings reveal that PGE₂ positively regulates eNOS expression in the cerebral microvessels of the newborn and that this effect is mediated via the EP₃ subtype of PGE₂ receptors.

1.3 Materials and methods

Chemicals

M&B 28,767 was a gift from Rhone-Poulenc Rorer, Dagenham Essex, UK. The following products purchased: carbaprostacyclin, PGD₂, 16,16-dimethyl-PGE₂, 11-deoxy PGE₁, 17-phenyl trinor PGE₂, sulprostone, U46619 from Cayman (Ann Arbor, MI); polyclonal rabbit antibody specific to eNOS from Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA); [α -³²P] CTP (3,000 Ci/mmol), enhanced chemiluminescence kit from Amersham (Mississauga, ON, Canada); pepstatin and leupeptin from Boehringer Mannheim (Montreal, PQ, Canada); ribonuclease A and T₇ sequencing kit from Pharmacia Biotech (Montreal, PQ, Canada); pGEM4 plasmid vector and in vitro transcription kit from Promega (Madison, WI); protein assay and electrophoretic reagents purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada); guanidinium isothiocyanate, T₄ DNA ligase, and restriction enzymes from BRL Life Technologies (Burlington, ON, Canada); radioimmunoassay for PGE₂ from Advanced Magnetics (Boston, MA); all other chemicals were from Fisher Scientific (Montreal, PQ, Canada) and Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Animals

Newborn (1 day old) Yorkshire pigs were used according to a protocol of the Hôpital Sainte Justine Animal Care Committee. Animals were anesthetized with 2% halothane and then killed with 120 mg/kg intracardiac pentobarbital and brains were removed. Brains from adult (6-8 months) pigs were collected from an abbatoir immediately after sacrifice and transported on ice to the lab.

Preparation of microvessels

Cerebral microvessels were prepared as previously described (Li *et al*, 1994). To compare eNOS mRNA and immunoreactivity, as well as nitrite production in newborn and adult microvessels, brains were gently homogenized with a Wheaton pestle in 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1.1 mM acetylsalicylic acid (ASA), 0.5 mM EGTA, 1 mM benzamidine, 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) and 5 μ M soybean trypsin inhibitor; for all other experiments which involved effects of modulation of prostaglandin levels on eNOS expression, ASA was omitted from the buffer for the microvessel preparations. ASA was initially added to avoid potential effects of prostaglandins on eNOS expression; subsequent experiments revealed that this action required several hours (see results section), whereas the full microvessel preparation only took 75-90 min. After homogenization of brain, the homogenates were mixed with equal volume of Ficoll 400 and centrifuged at 20,000 \times g for 20 min. The pellets containing the microvessels were washed three times in the above buffer and then filtered through 150 μ m filter. The filtrates containing the microvessels were centrifuged at 1,000 \times g for 15 min and stored at -80°C until assayed. The morphology and purity of microvessels were monitored by light microscopy and enrichment of γ -glutamyl transpeptidase activity (Sasz, 1969; Golstein *et al*, 1975). The activity of γ -glutamyl transpeptidase was greater in the microvessels (5.6-5.9 mU/mg protein) than in brain parenchyma (0.30-0.35 mU/mg protein).

Incubation of microvessels

Cerebral microvessels of newborn pigs were incubated for 24 h in DMEM culture medium in the absence or the presence of 10 μ M ibuprofen or 10 μ M ibuprofen plus 1 μ M of one of the following agents: carbaprostacyclin (stable PGI₂ analog), PGD₂, 16,16-dimethyl-PGE₂ (stable PGE₂ analog), 11-deoxy PGE₁, 17-phenyl trinor PGE₂, sulprostone, M&B 28,767. Microvessels of adult pigs were similarly treated with 16,16-dimethyl PGE₂ and M&B 28,

767. Concentrations of agents used have been previously reported to be effective (Li *et al*, 1995; Kennedy and Doktorcik, 1988; Ando *et al*, 1995). Following incubation, eNOS mRNA and nitrite production were determined.

In vivo experiments

Newborn pigs were anesthetized with 2% halothane, and polyethylene catheters were placed in the jugular vein for intravenous injection. Animals were randomly assigned to receive every 8 h for 24 h intravenous (iv), saline, ibuprofen (40 mg/kg), or ibuprofen plus EP₃ agonist sulprostone (10 µg/kg) (Coleman *et al*, 1994). Animals were killed at the end of the 24 h period and brain was immediately removed for NADPH diaphorase staining and vasomotor experiments as described below; experiments were conducted on frontoparietal cortex because of its neuronal organization and segregated vasculature.

eNOS and destrin Ribonuclease protection assays.

The primer pair for porcine eNOS synthesized by RT-PCR was: 5'-GCT TTT CCC TGC AGG AGC GAC- 3' and 5'-GCC AGT CTC TGC AGA CTC TGG-3' (Zhang *et al*, 1996). The primer pair for (loading control) destrin was: 5'-ATG ATG CAA GCT TTG AAA CC -3' and 5'- GGA AGC TTT CGA TCT GTG G -3'. The amplified products (0.4 Kb) were digested with appropriate restriction enzyme (underlined sequences in the primers denote the restriction sites) and cloned into pGEM4 vector. The nucleotide sequences of eNOS and destrin partial cDNAs were determined using T7 sequencing kit. [³²P]-Labelled cRNA probes for eNOS and destrin were prepared using an *in vitro* transcription kit (Promega).

Total RNAs from brain microvessels was aliquoted and subjected to ribonuclease protection assays according to a published protocol (Bordonaro *et al*, 1994) with minor modifications. Briefly, 20 µg of total RNA was mixed with 10⁵ cpm of eNOS and destrin probes in 20 µl of hybridization buffer (80%

deionized formamide, 40 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EDTA and 0.4 M NaCl), denatured at 90°C for 5 min and incubated overnight at 50°C. The RNA hybrids were digested with ribonuclease A (10 µg/ml) and ribonuclease T₁ (200 units/ml) in 200 µl of digestion buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, and 0.3 M NaCl) for 30 min at 25°C. Proteinase K treatment followed by precipitation of protected fragments was conducted exactly as described (Bordonaro *et al*, 1994). The protected RNA fragments were resolved on urea-6% polyacrylamide gels and the bands were visualized by phosphorimaging (Molecular Dynamics) and quantified by densitometer.

Western blotting

Western blotting for eNOS was performed using a method previously described (Abran *et al*, 1997). Cerebral microvessels were homogenized in a buffer containing 20 mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 137 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 µg/ml each of leupeptin, pepstatin, soybean trypsin inhibitor, and 0.2 mM PMSF. After centrifugation at 13, 000 g for 10 min to remove fibrous material, the supernatants were saved and protein was determined (Bio-Rad DC assay). After addition of β-mercaptoethanol to aliquots of supernatants (100 µg protein) to a final concentration of 10%, the samples were denatured by boiling for 5 min and resolved by electrophoresis on 8% SDS-polyacrylamide gels. The transfer of tissue lysate proteins to membranes and immunoblotting using specific antibodies against eNOS (1:1,000 titer) conducted exactly as previously described (Abran *et al*, 1997). Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence (Amersham) as recommended by the supplier.

Nitrite Production

NO formation was estimated by determination of its stable metabolite, nitrite (Verdon *et al*, 1995), as previously reported (Abran *et al*, 1997). NOS-

dependent generation of NO was estimated as the difference in nitrite production in the absence or presence of 1 mM N^ω-nitro-L-arginine (L-NA).

NADPH diaphorase histochemistry

NADPH diaphorase reactivity was performed using a method previously described (Kuchiiwa *et al*, 1994). Tissue from frontoparietal cortex was fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1% phosphate buffer saline (pH 7.4) overnight at 4°C and then placed in 30% sucrose buffer for 2 days. Tissues were sectioned (40 μm) using a microtome. The free-floating sections were incubated in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1% β-NADPH at 37°C for 60 min. Following the reaction, the sections were rinsed in phosphate buffer and mounted on slides. The slides were air dried and treated in chloroform for 30 min to remove background staining and counterstained with neutral red. Densitometry of tonality was analysed after normalization adjustment of background tone; tonality was determined on similar number of pixels delineating microvessels (which differed by ≤ 1% between photographs) using software program Photoshop 5 (Adobe, CA).

Vasomotor response of brain microvessels

Newborn pigs treated with ibuprofen in combination or not with sulprostone were prepared as described above; adult animals were not treated (tissues obtained from abattoir). Brains from these animals were sectioned (1 mm thick) to study vascular responses using videoimaging technique as previously reported (Li *et al*, 1997). Cumulative concentration-relaxant response curves to NO-dependent Substance P (Rosenblum *et al*, 1993; Jansen *et al*, 1991) were determined on tissues precontracted with U46619 to approximately 75% of maximum contraction; relaxant response was calculated as percent decrease in the induced-tone.

Prostaglandin synthesis

PGE₂ synthesis in cerebral microvessels was measured as previously described (Peri *et al*, 1995). Cerebral microvessels from newborn and adult pigs were homogenized in ice-cold buffer containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF and 10 µg/ml each of leupeptin, aprotinin, and soybean trypsin inhibitor. An aliquot of the homogenate (400-600 µg of protein /ml) was preincubated for 20 min at 25°C and the reaction was initiated by adding 50 µM arachidonic acid for 10 min at 25°C; the reaction rate was linear over this time period.

Statistical analysis

Data were analyzed by analysis of variance, comparison among means test (Tukey-Kramer method) and Student's *t*-test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data are presented as means \pm S.E.

1.4 Results

Prostaglandin level, eNOS expression and nitrite generation in newborn and adult brain microvessels

PGE₂ levels were approximately 6-fold higher in newborn than in adult cerebral microvessels (Fig. 1a). This was associated with 3-5 fold greater eNOS mRNA, immunoreactive protein, and nitrite production in newborn compared to adult (Fig. 1b-f).

Modulation of eNOS mRNA and nitrite production on isolated microvessels by prostaglandins

Incubation of cerebral microvessels from newborn pigs with ibuprofen for 24 h (but not acute, ≤ 2 h) caused a significant reduction in the expression of eNOS mRNA and nitrite production (Fig. 2a-c). Effects of ibuprofen were prevented by concurrent treatment with 16,16-dimethyl PGE₂ but not with other major prostaglandins, carbaprostacyclin and PGD₂.

Effects PGE₂ receptor agonists on eNOS mRNA on isolated microvessels

Incubation of newborn pig cerebral microvessels with 11- deoxy PGE₁ (EP₂, EP₃, EP₄ agonist), EP₁/EP₃ agonist sulprostone or selective EP₃ receptor agonist M&B 28,767 prevented ibuprofen-induced decrease in eNOS mRNA (Fig. 3a-b); effects of M&B 28,767 on eNOS mRNA expression were concentration-dependent (Fig. 3c). In contrast, 17-phenyl trinor PGE₂ (EP₁ agonist), even at relatively high concentrations (1 μ M), did not modify the effect of ibuprofen on eNOS mRNA. Furthermore, treatment of adult cerebral microvessels with 16,16-dimethyl PGE₂ and M&B 28,767 increased eNOS mRNA values to those in saline-treated newborn (Fig. 3a, 3b).

In vivo modulation of brain tissue NADPH diaphorase staining by prostaglandins

To ascertain that findings *ex vivo* also applied *in vivo*, newborn pigs were treated with ibuprofen with or without sulprostone; ibuprofen reduced PGE₂ levels in brain cortex from 201 ± 54 to 87 ± 14 pg/mg protein, comparable to levels in adult brain. In ibuprofen treated animals there was a decrease in overall NADPH diaphorase staining of brain microvessels (as well as neurons), which was prevented by sulprostone (Fig. 4); these changes can be further appreciated by tonality densitometry of microvessels (Fig. 4). Hematoxylin and eosin stainings revealed no adverse effects of prostaglandin modulation on cell number (data not shown) as previously reported (Patel *et al*, 1993).

Effects of prostaglandin modulation on NO-dependent vasorelaxant response of brain vasculature

To assess whether modulation of eNOS on vessels by prostaglandins was reflected functionally, newborn pigs were treated with ibuprofen with or without sulprostone, and vasomotor effects of NO-dependent Substance P (Rosenblum *et al*, 1993; Jansen *et al*, 1991) were tested. Treatment of newborn pigs with ibuprofen decreased vasorelaxant response to Substance P (Fig. 5); this effect was prevented by concomitant treatment with sulprostone. Correspondingly in adult animals, Substance P caused less vasorelaxation than that seen in saline-treated newborns and approached dilatation of ibuprofen (alone) treated newborns. Vasorelaxation to Substance P was inhibited by the NOS blocker L-NMMA (Fig. 5).

1.5 Discussion

NO has been attributed important roles in the regulation of cerebral hemodynamics (Prado *et al*, 1992; Lo *et al*, 1996), particularly in the newborn when the metabolic demand is high (Northington *et al*, 1996; Northington *et al*, 1997). Similar functions and ontogenic changes have been observed for prostaglandins (Leffler *et al*, 1993; Peri *et al*, 1995; Busija, 1997). Thus far the factors that regulate cerebrovascular eNOS expression in the perinate were not known. Based on evidence that prostaglandins can regulate NOS activity in macrophages (mostly iNOS) (Aeberhard *et al*, 1995; Gaillard *et al*, 1992; Marotta *et al*, 1992; Raddassi *et al*, 1993), we investigated whether increased perinatal levels prostanoids contribute to the regulation of the constitutive eNOS expression and activity in cerebral vasculature. Our findings reveal that high levels of PGE₂ in cerebrovascular tissues of the perinate, through actions on EP₃ receptors, regulate eNOS expression and NO generation in brain microvessels, and this in turn affects vasomotor responses.

The ability of ibuprofen (which reduced prostaglandin levels) to decrease eNOS expression and NO formation in the newborn cerebral microvessels would suggest that prostaglandins regulate eNOS; since this effect of ibuprofen could be prevented by PGE₂ and not by other major prostanoids (Fig 2), it seems that PGE₂ is the major prostaglandin playing a critical role in eNOS regulation (Fig 2). This regulation of eNOS expression in the newborn cerebral microvessels by PGE₂ seems to be mediated via EP₃ receptors since EP₃ receptor agonists sulprostone and M&B 28,767 prevented the effect of ibuprofen like PGE₂ did (Figs. 2 and 3). As a corollary to observations made in the newborn, PGE₂ and M&B 28,767 increased eNOS expression in adult microvessels to values in the newborn (Fig. 3). Moreover, the regulation of eNOS expression by EP₃ stimulation both *ex vivo* and *in vivo* was also manifested functionally by studying the vasorelaxant response to NO-dependent Substance P (present study; Rosenblum *et al*, 1993; Jansen *et al*, 1991);

Substance P- induced vasorelaxation was diminished by treatment (24 h) of newborn pigs with ibuprofen to values seen in the adult (Fig. 5), and could be prevented by concomitant treatment with ibuprofen plus sulprostone. It is of interest to point out in this regard that EP₃ receptors were among the two PGE₂ receptors detected in porcine cerebral microvessels, the other one being EP₁ (Li *et al*, 1994); EP₂ and EP₄ are not detectable in porcine brain microvessels (Li *et al*, 1994). Altogether findings suggest that PGE₂ via EP₃ positively regulates NOS expression as well as NOS-dependent functions in cerebral vessels.

NADPH-diaphorase staining of cerebral vessels in the cerebral cortex was modulated by prostaglandins (Fig. 4). Interestingly a majority of the NADPH-diaphorase positive cerebral vessels were found near neurons, which also exhibited strong NADPH staining and was also affected by prostaglandins. The spatial relationship between cerebral vessels and neurons, together with the fact that prostaglandins modulate NADPH-diaphorase positivity could suggest that PGE₂ via EP₃ may be involved in the concerted regulation of cerebral blood flow and neuronal development; this inference has been proposed for nNOS (Dumont *et al*, 1998).

The mechanism by which PGE₂ induces eNOS expression is not clear; however certain inferences can be drawn. EP₃ stimulation may lead to activation of protein kinases (Burkey and Regan, 1995); eNOS promoter contains a site for AP-1 which could be stimulated by phosphorylation (Barchowsky *et al*, 1995). Alternatively, we recently reported the activation directly of functional perinuclear PGE₂ receptors which can induce gene transcription (Bhattacharya *et al*, 1998). In support of this suggestion, inhibition of prostaglandin transporter using bromocresol green (Kanai *et al*, 1995) prevented PGE₂-induced up regulation of eNOS expression (data not shown).

In conclusion, our results reveal an important mechanism for the developmental regulation of eNOS by PGE₂ through its action on EP₃ receptors in cerebral microvessels. Because parturition is associated with significant

increases in PGE₂ levels in brain (Jones *et al*,1993), we speculate that PGE₂ is developmentally required in the perinate to maintain via increased NO formation adequate brain circulation particularly at the end of labor when fetal blood oxygen tension decreases (Dildy *et al*, 1994).

1.6 Acknowledgments

The authors wish to thank Mrs. Hendrika Fernandez for technical support. We are also grateful to Les Fermes Ménard Inc., L'Ange Gardien, Québec, for their generous supply of piglets.

1.7 References

Abran D, Dumont I, Hardy P, Peri KG, Li DY, Molotchnikoff S, Varma DR and Chemtob S (1997) Characterization and regulation of prostaglandin E₂ receptor and receptor coupled functions in the choroidal vasculature of the pig during development. *Circ Res* **80**: 463-472.

Aeberhard EE, Henderson SA, Arabolos NS, Griscavage JM, Castro FE, Barret CT and Ignarro LJ (1995) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* **208**: 1053-1059.

Ando T, Ichijo T, Katafuchi T and Hori T (1995) Intracerebroventricular injection of prostaglandin E₂ increases splenic sympathetic nerve activity in rats. *Am J Physiol* **38**: R662-R668.

Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ, Vincenti MP and Treadwell M (1995) Oxydant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B and AP-1 in endothelial cells. *Am J Physiol* **269**: L829-836.

Baumbach GL and Heistad DD (1985) Heterogeneity of brain blood flow and permeability during acute hypertension. *Am J Physiol* **249**: H629-637.

Bhattacharya M, Peri KG, Almazan G, Ribeiro-da-Silva A, Shichi H, Durocher Y, Abramovitz M, Hou X, Varma DR and Chemtob S (1998) Nuclear Localization of prostaglandin E₂ receptors. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 15792-15799.

Bordonaro M, Saccomanno CF and Nordstrom JL (1994) An improved T1/A ribonuclease protection assay. *Biotechniques* **16**: 428-430.

Bredt DS and Snyder SH (1994) Transient nitric oxide neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory bulb. *Neuron* **13**: 301-314.

Burkey TH and Regan JW (1995) Activation of mitogen-activated protein kinase by the human prostaglandin EP3A receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **211**: 152-158.

Busija DW (1997) Eicosanoids and cerebrovascular control. In *Primer on Cerebrovascular Disease* (Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ and Siesjö BK, Weir B eds) pp 93-96, Academic Press, New York.

Coleman RA, Smith W and Narumiya S (1994) VIII. International Union of Pharmacology Classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* **46**: 205-229.

Dildy GA, van den Berg PP, Katz M., Clark SL, Jongsma HW, Nijhuis JG and Loucks CA (1994) Intrapartum fetal pulse oximetry: fetal oxygen saturation trends during labor and relation to delivery outcome. *Am J Obstet Gynecol* **171**: 679-684.

Dumont I, Peri KG, Hardy P, Hou X, Martinez-Bermudez AK, Molotchnikoff S, Varma DY and Chemtob S (1998) PGE₂, via EP₃ receptor, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period. *Am J Physiol* **275**: R1812-1821.

Estrada C and DeFelipe J (1998) Nitric oxide-producing neurons in the neocortex: morphological and functional relationship with intraparenchymal microvasculature. *Cereb Cortex* **8**: 193-203.

Gaillard T, Mulsch A, Klein H and Decker K (1992) Regulation by prostaglandin E₂ of cytokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages. *Biol Chem* **373**: 897-902.

Golstein GM, Wolinsky GS, Csejtey J and Diamond I (1975) Isolation of metabolically active capillaries from rat brain. *J Neurochem* **25**: 715-717.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA and Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**: 239-242.

Jansen I, Alafaci C, Mc Culloch J, Uddman R and Edvinsson L (1991) Tachykinins (Substance P, and Neurokinin B) in the cerebral cortex circulation: Vasomotor responses in vitro and In situ. *J Cereb Blood Flow Metab* **11**: 567-575.

Jones SA, Adamson SL, Bishai I, Lees J, Engelberts D and Coceani F (1993) Eicosanoids in third ventricular cerebrospinal fluid of fetal and newborn sheep *Am J Physiol* **264**: R135-R142.

Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW and Schuster VL (1995) Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* **268**: 866-869.

Kennedy TG and Doktorcik PE (1988) Effects of analogues of prostaglandins E₂ and F_{2α} on the decidual cell reaction in the rat. *Prostaglandins* **35**: 201-219.

Kuchiiwa S, Kuchiiwa T, Mori S and Nakagawa S (1994) NADPH diaphorase neurones are evenly distributed throughout cat neocortex irrespective of functional specialization of each region. *NeuroReport* **5**: 1662-1664.

Leffler C.W, Armstead WM and Shibata M (1993) Role of eicosanoids in cerebral hemodynamics, in the Regulation of Cerebral Blood Flow (Phyllis JW and Boca Raton FL CR eds) pp 297-313.

Li DY, Varma DR and Chemtob S (1994) Ontogenic increase in PGE₂ and PGF_{2α} receptors in brain microvessels in pigs. *Br J Pharmacol* **112**: 59-64.

Li DY, Varma DR and Chemtob S (1995) Up-regulation of PGE₂ and PGF_{2α} receptors on newborn pig brain synaptosomes by inhibition of cyclooxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* **272**: 15-19.

Li DY, Hardy P, Abran D, Martinez-Bermudez AK, Guerguerian AM., Bhattacharya, M, Almazan G, Menezes R, Peri KG, Varma DR. and Chemtob S (1997) Key role of cyclooxygenase- in PGE₂ and PGF_{2α} receptor regulation and cerebral blood flow of the newborn. *Am J Physiol* **273**: R1283-1290.

Lo EH, Hara H, Rogowska J, Trocha M, Pierce AR, Huang PL, Fishman MC and Wolf GL and Moskowitz MA (1996) Temporal correlation mapping analysis of the hemodynamic penumbra in mutant mice deficient in endothelial nitric oxide synthase gene expression. *Stroke* **27**: 1381-1385.

Marotta P, Sautebin L and Rosa MDi (1992) Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line. *Br J Pharmacol* **107**: 640-641.

Northington FJ, Koehler RC, Traystman RJ and Martin LJ (1996) Nitric oxide synthase 1 and nitric oxide synthase 3 protein expression is regionally and temporally regulated in fetal brain. *Dev Brain Res* **95**:1-14.

Northington FJ, Tobin J.R, Harris AP, Traystman RJ and Koehler RC (1997) Developmental and regional differences in nitric oxide synthase activity and blood flow in the sheep brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**: 109-115.

Ohashi Y, Kawashima S, Hirata Ki, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, Sakoda T, Kurihara, H, Yazaki Y and Yokoyama Y (1998) Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* **102**: 2061-2071.

Patel P, Drummond T, Sano Cole DJ, Kalkman CJ and Yaksh TL (1993) Effect of ibuprofen on regional eicosanoid production and neuronal injury after forebrain ischemia in rats. *Brain Res* **614**: 315-324.

Peri KG, Hardy P, Li DY, Varma DR and Chemtob S (1995) Prostaglandin G/H synthase -2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem* **270**: 24615-24620.

Prado R, Watson BD, Kuluz J and Dietrich WD (1992) Endothelium-derived nitric oxide synthase inhibition. Effects on cerebral blood flow, pial diameter artery, and vascular morphology in rat. *Stroke* **8**: 1118-1123.

Raddassi K, Petit JF and Lemaire S (1993) LPS-induced activation of primed murine peritoneal macrophages is modulated by prostaglandins and cyclic nucleotides. *Cell Immunol* **149**: 50-64.

Rosenblum WI, Shimizu T and Nelson GH (1993) Endothelium-dependent effects of substance P and calcitonin gene related peptide on mouse pial arterioles. *Stroke* **24**: 1043-1048.

Sasz G (1969) A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. *Clin Chem* **15**: 24-136.

Verdon CP, Burton BA and Prior RL (1995) Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP^+ when the Greiss reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem* **224**: 502-508.

Zhang JL, Patel JM and Block. ER (1996) Molecular cloning, characterization and expression of a nitric oxide synthase from porcine pulmonary artery endothelial cells. *Comp Biochem Physiol* **116**: 485-491.

Figure 1.

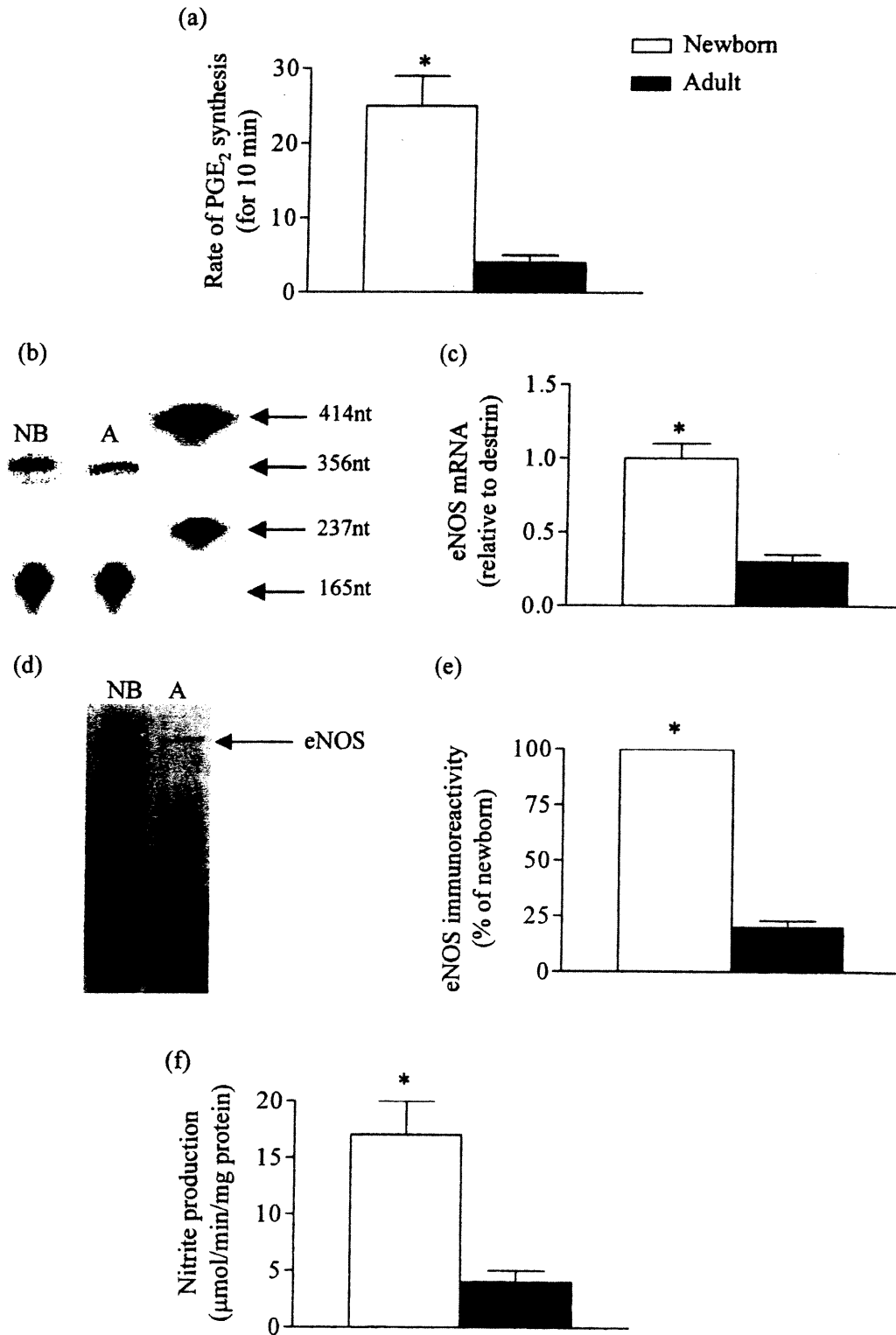


Figure 1. Rate of (PG) E₂ synthesis (a), eNOS mRNA (b and c) and eNOS protein (d and e) and nitrite production (f) in cerebral microvessels from 1 day old (NB) and adult (A) pigs. In (b) and (c), 20 µg total RNA was subjected to RNase protection assay; The unprotected and protected fragments for eNOS are respectively 414 and 356 nt and for destrin 237nt and 165 nt. In (d) and (e), 100 µg protein was loaded for Western analysis; the arrows points to the eNOS 140 kDa protein, the only band detected in the range (120-180 kDa) of interest. The production of nitrite measured was that sensitive to L-NA (f). Values are means ± SEM of 3-4 experiments, each performed in duplicate. * Different (p < 0.01) from the value for the adult.

Figure 2.

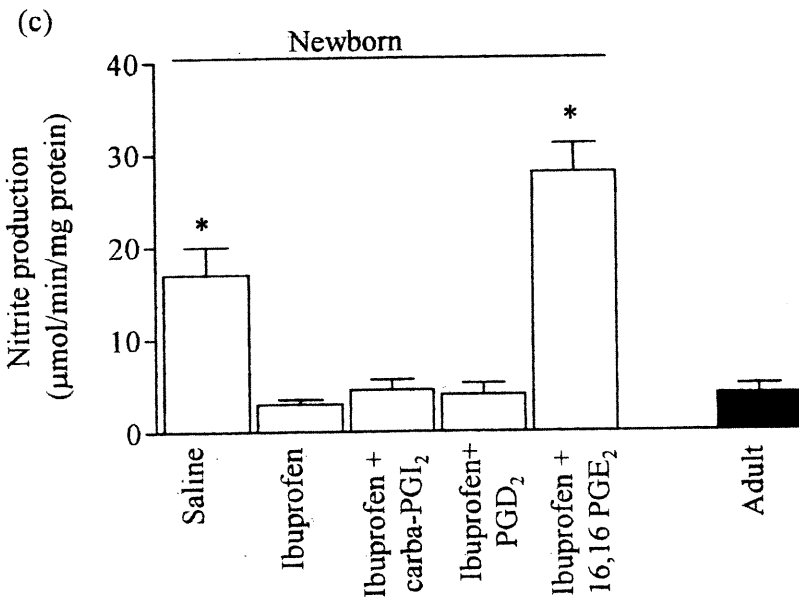
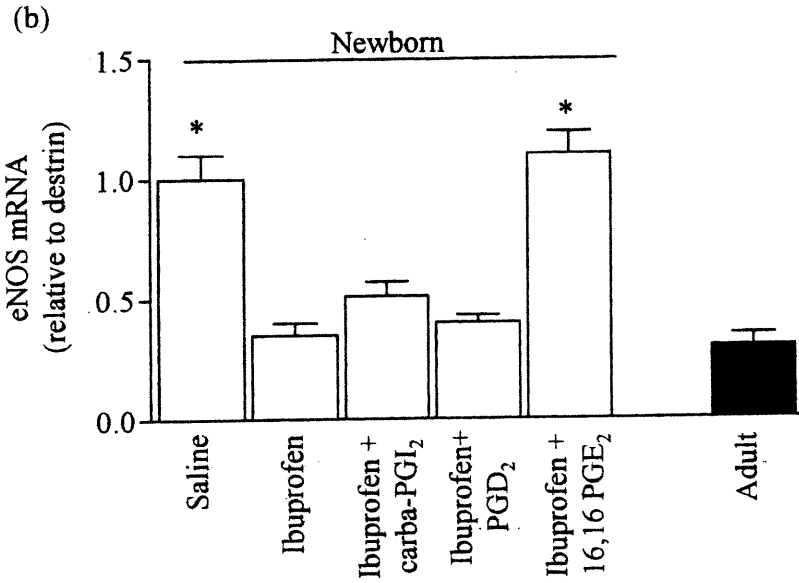
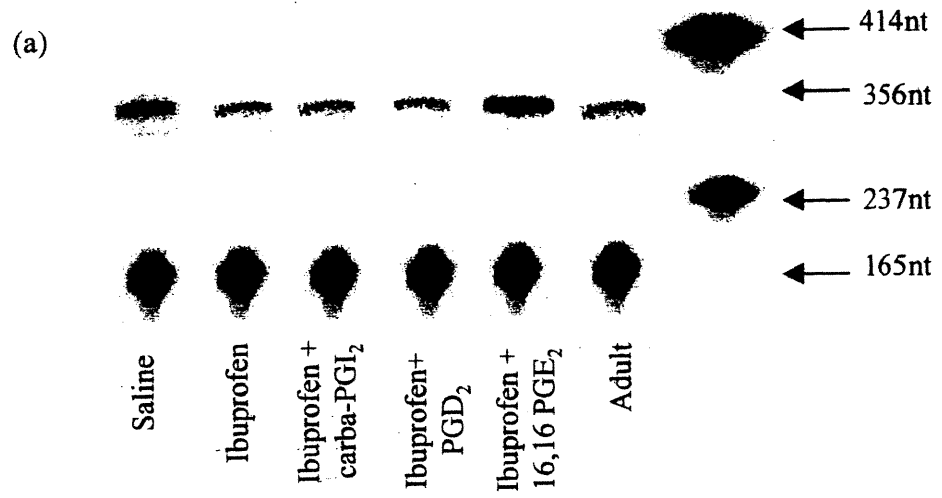
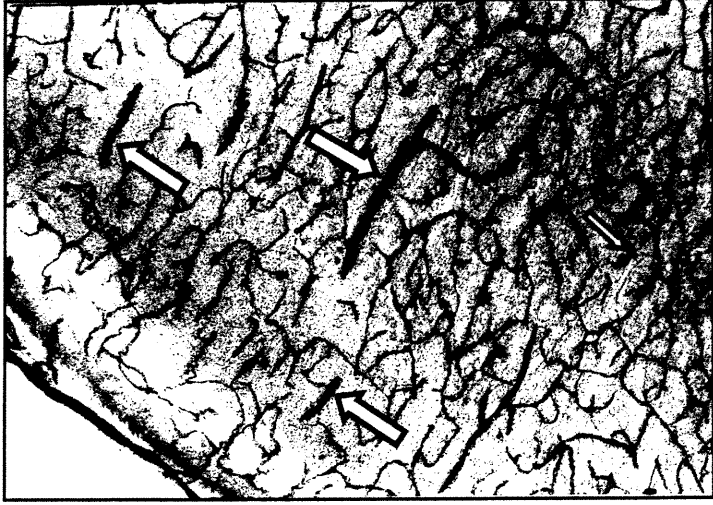
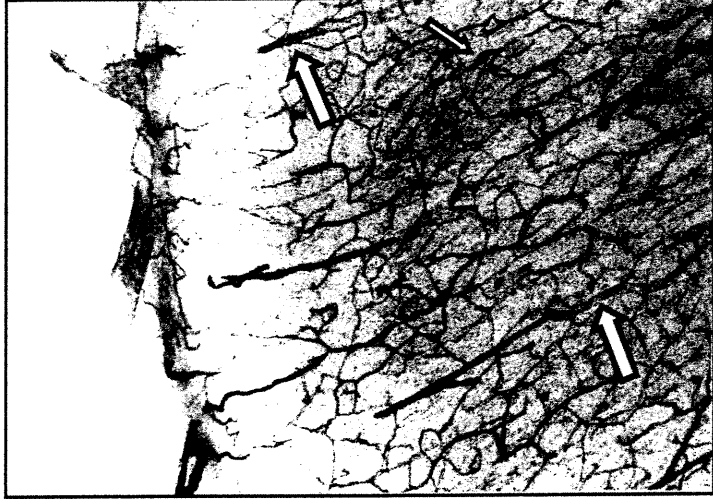


Figure 2. Modulation of eNOS mRNA expression (a, b) and nitrite production (c) by prostaglandins in isolated newborn cerebral microvessels. Cerebral microvessels of newborn pigs were incubated for 24 h with saline, ibuprofen (10 μ M), a combination of ibuprofen (10 μ M) and 1 μ M of each of the following: carbaprostacyclin (carba-PGI₂), PGD₂, 16,16-dimethyl PGE₂ (16,16 PGE₂). Cerebral microvessels of adults were treated with saline. RNase protection assays were performed as in Fig. 1. Autoradiographic exposure was overnight and visualized by phosphorimaging. Values are mean \pm SEM of 3-4 experiments each performed in duplicate. * Different ($p < 0.01$) from all other values without an asterisk.

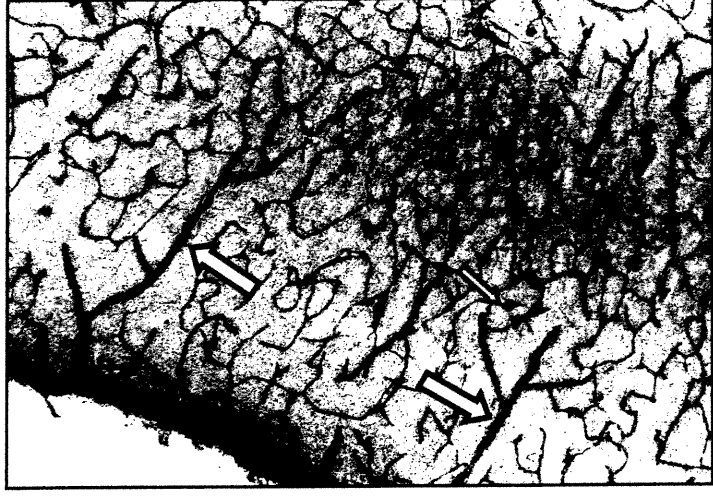
Figure. 3. Modulation of eNOS mRNA expression in pig cerebral microvessels by PGE₂ analogs. Isolated newborn cerebral microvessels were incubated 24 h with saline, ibuprofen (10 μM), a combination of ibuprofen with 1 μM of one of the following: 16,16-dimethyl PGE₂ (16,16 PGE₂), 11-deoxy PGE₁, 17-phenyl trinor PGE₂, sulprostone, or M&B 28,767. Isolated cerebral microvessels of adult pig were treated with saline, 16, 16 PGE₂ or M&B 28,767. Values are mean ± SEM of 3-4 experiments. * Different (p < 0.01) from values without asterisk.



Saline



Ibu



Ibu + Sulp

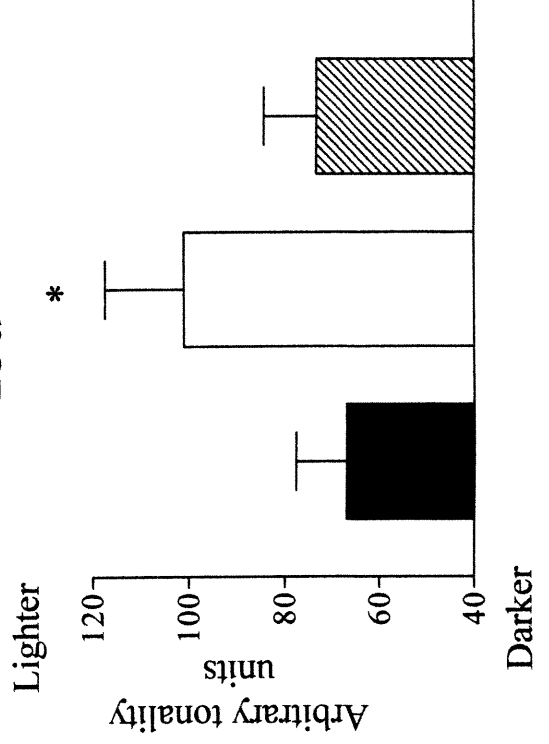


Figure 4.

Figure 4. In vivo modulation of NADPH diaphorase staining by prostaglandins. Newborn animals were treated every 8 h for 24 h with saline, ibuprofen (40 mg/kg) or a combination of ibuprofen plus sulprostone (10 µg/kg). At the end of treatment period, animals were killed and brain was stained for NADPH diaphorase. Tonality densitometry was analysed as described in the Methods sections (n=3 for each treatment); note that higher arbitrary tonality units correspond to reduced densitometry and vice versa for lower units. Ibu and Sulp refer to ibuprofen and sulprostone respectively. Large arrows point to individual NADPH diaphorase-positive vessels and small arrows point to neurons. 1 cm represents 200 µm. * Different ($p < 0.05$) from values without asterisk.

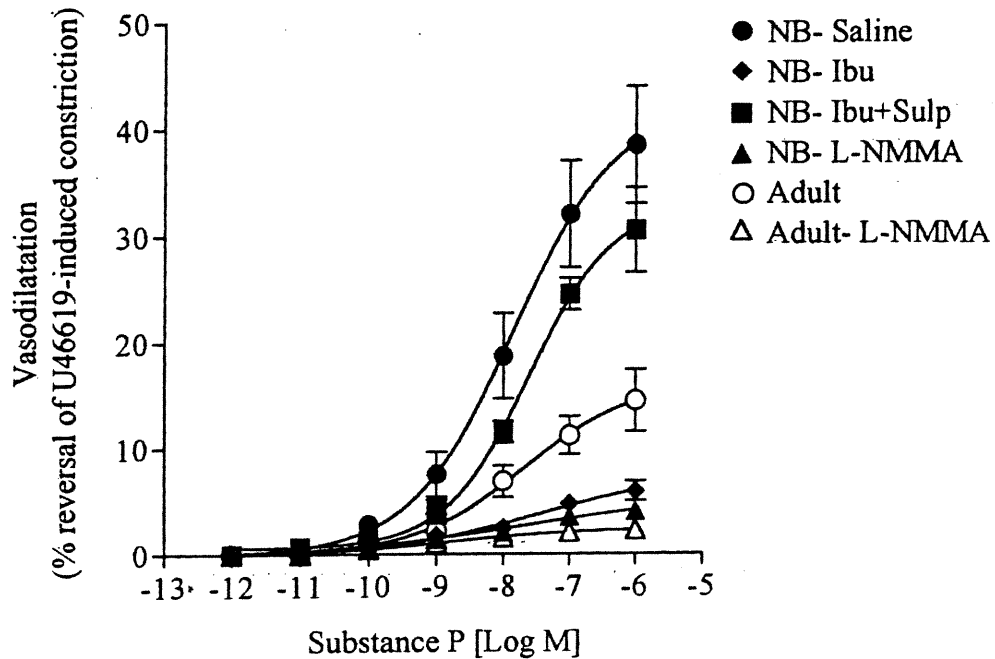


Figure 5. Vasorelaxant effects of Substance P on cerebral microvessels. Newborn animals were treated as described in Fig. 4; adults were untreated. Some tissue preparations from saline-treated newborn and from adult animals were exposed to LNMMA (1 mM). Ibu, Sulp and NB refer to ibuprofen, sulprostone and newborn respectively. Values are mean \pm SEM of 4 experiments each. * Different ($p < 0.01$) from adult and ibuprofen (alone) treated newborns and from L-NMMA-treated preparations (two-analysis of variance factoring for Substance P concentration and group).

V ARTICLE INTITULÉ

**Regulation of endothelial nitric oxide synthase by PGD₂
in the developing choroid**

Am J Physiol Heart Circ Physiol 278:H60-66, 2000

Regulation of endothelial nitric oxide synthase by prostaglandin D₂ in the developing choroid

ISABELLE DUMONT,^{1,2} PIERRE HARDY,¹ KRISHNA G. PERI,¹ XIN HOU,¹ STÉPHANE MOLOTCHNIKOFF,² DAYA R. VARMA,³ AND SYLVAIN CHEMTOB^{1,3}

¹Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, Research Center of Hôpital Sainte-Justine, Montreal H3T 1C5; ²Faculty of Biological Sciences, University of Montreal, H3C 3J7; and the ³Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada H3G 1Y6.

Running title: Nitric oxide synthase regulation by prostaglandin D₂

To whom correspondence should be addressed:

Dr. Sylvain Chemtob, M.D., Ph.D.

Research Center, Hôpital Sainte-Justine

Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology

3175, Côte Sainte-Catherine

Montreal, Quebec

Canada, H3T 1C5

Tel: (514) 345-4692

Fax: (514) 345-4801

e-mail: chemtobs@ere.umontreal.ca

1.1 Abstract

We investigated if prostaglandins might regulate the increased choroidal endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in the perinate. Prostaglandins, eNOS mRNA, immunoreactive protein and activity, as well as nitrite (stable metabolite of NO) production were markedly higher in newborn (1 day old) than juvenile (6-8 weeks old) pig choroid. Treatment of isolated newborn choroids with the prostaglandin synthase inhibitor ibuprofen for 24 h reduced eNOS mRNA and nitrite production to values in juveniles. This effect was equally observed with the PGD₂ receptor (DP) blocker BW A868C, and prevented by cotreatment with PGD₂ but not other prostaglandins; similar observations were made on NOS activity *in vivo*. PGD₂ also increased eNOS expression on choroids of juveniles and this effect was blocked by BW A868C. The manifestation of this up-regulation of eNOS by PGD₂ on the control of choroidal vasomotor response was tested by using NO-dependent vasorelaxants, acetylcholine (ACh), bradykinin (Bk) and Substance (SP). ACh-, Bk- and SP-elicited choroidal vasorelaxation was greater in saline-treated newborn than juvenile pigs. Ibuprofen (24 h) decreased ACh-, Bk- and SP-evoked vasorelaxation in newborns, whereas PGD₂ increased that in juveniles and prevented the ibuprofen-induced attenuated relaxation in newborns; infusion of L-NMMA in choroids of those animals treated with PGD₂ reversed the augmented vasorelaxation to ACh-, Bk- and SP. Finally, PGD₂-induced up-regulation of NOS in the perinate was also reflected by curtailed choroidal blood flow autoregulatory response to increased perfusion pressure. In conclusion, PGD₂ exhibits a major role in up-regulating eNOS expression and activity in the choroid, which in turn results in greater NO-mediated vasorelaxation; a new mechanism for eNOS regulation via DP receptors is hereby disclosed. The relationship between PGD₂ and eNOS in the developing subject provide an explanation for the interactive role of these two factors in the absent choroidal blood flow autoregulation in the perinate.

Keywords: Endothelial nitric oxide synthase, prostaglandin D₂, newborn, choroid

1.2 Introduction

THE CHOROID IS A VASCULAR tissue which provides the principal supply of O₂ and nutrients to the retina (4). Despite the lower tissue O₂ consumption of the perinate its choroidal blood flow (ChBF) is relatively high compared to that in the adult in order partly to compensate for the developing retinal vascular bed (19). Choroidal vasculature of the newborn, in contrast to that of the adult, also fails to constrict appropriately in response to augmented O₂ and perfusion pressure (18,19,24). This failure to adequately control O₂ delivery to the eye of the newborn could favor oxygen toxicity (28) and has also been suggested to contribute to predisposing to retinopathy of prematurity (19,20,28). The relatively increased basal ChBF and lack of the latter to exhibit O₂- and pressure-induced autoregulation in the newborn largely results from excess endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity which generates higher levels of the vasorelaxant NO (18,19). The mechanisms that regulate the ontogeny of NOS activity, particularly in the choroid, are not yet known.

In the developing subject prostaglandins and NO seem to exhibit a comparable regulation of ChBF (10,18). As seen with NO, prostaglandin formation is also increased in perinatal ocular tissues (1,17). A role for prostaglandins in the regulation of inducible (i) NOS expression has been reported (3,12,27,30). However whether prostaglandins regulate the expression of the constitutive eNOS, specifically in the developing choroid, as well as the type of prostaglandin involved in this regulatory process, are not known.

We therefore determined whether and which type of prostaglandin modulate eNOS expression, activity and function in the choroid of newborn and juveniles pigs. Our data reveal that specifically PGD₂ regulates the expression of eNOS in the developing choroid, which in turn affects vasomotor tone and ChBF autoregulation. These observations disclose a new regulatory mechanism of eNOS expression via a novel function for PGD₂ via its receptor (DP).

1.3 Materials and methods

Animals

Newborn (1 day old) and juvenile (6-8 weeks) Yorkshire pigs were used according to a protocol approved by the Animal Care Committee of Hôpital Sainte-Justine in accordance with the principles of the Guide to the Care and Use of Experimental Animals and guidelines of the Canadian Council on Animal Care. For *in vitro* experiments anesthetized (2% halothane) pigs were killed with pentobarbital (120 mg/kg intracardiac) and eyes were quickly removed and placed in ice cold Krebs buffer (pH 7.4) of the following composition (mmol/L): NaCl 120, KCl 4.5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.0, NaHCO₃ 27, KH₂PO₄ 1.0, and glucose, to which was added 1.5 U/mL heparin. On choroids from these eyes eNOS mRNA, immunoreactivity and activity as well as nitrite production and prostaglandin levels were measured. Other choroids were first incubated with modulators of prostaglandin levels described below.

In vitro incubation of choroids

Isolated choroids of newborn were incubated for 24 h in DMEM culture medium in presence or absence of the prostaglandin synthase inhibitor ibuprofen (10 μ M), a combination of ibuprofen (10 μ M) and either (1 μ M) PGD₂, 16,16-dimethyl PGE₂ or carbaprostacyclin (stable PGI₂ analog), or only with the selective PGD₂ receptor (DP) antagonist BW A868C (1 μ M) (8,13). Choroids of juveniles were similarly treated with PGD₂ or a combination of PGD₂ with BW A868C. The 24 h treatment duration was based on pilot experiments which revealed that acute (\leq 2 h) administration of those agents were ineffective in altering eNOS expression. At the end of the incubation tissues were processed to measure eNOS mRNA and nitrite production; neuronal NOS is not detectable in the isolated choroid (1).

Animal preparation for in vivo experiments

Pigs were anesthetized with 2% halothane. A catheter (Cathlon, Johnson & Johnson, Arlington, TX) was placed in a femoral vein and secured to the animal with tape. Newborn animals were randomly assigned to receive intravenous (iv) every 8 h for 24 h, saline, ibuprofen (40 mg/kg), a combination of ibuprofen (40 mg/kg) with either PGD₂, 16,16 dimethyl-PGE₂ or carbaprostacyclin (each at 10 µg/kg), the PGD₂ receptor blocker BW A868C (10 µg/kg); a few animals treated with both ibuprofen and PGD₂ also received the NOS inhibitor N^o-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) (1 mg/kg) 30 min prior to hemodynamic studies. The dose of ibuprofen was previously shown to decrease neonatal prostaglandin levels to those of the adult (1,2), and those of prostaglandins and analogs to change prostaglandin levels and/or cause effects *in vivo* (5,23,25). Juvenile pigs were treated with saline or PGD₂. At the end of the 24 h period, animals were either kept alive to study ChBF autoregulation or killed (120 mg/kg pentobarbital iv) to obtain eyes to measure choroidal NOS activity or perform vasomotor studies.

eNOS and destrin RNase protection assays

Partial eNOS and destrin cDNAs were synthesized by RT-PCR respectively from porcine cerebellar total RNA. The primer pair for porcine eNOS was: 5'-GCT TTT CCC TGC AGG AGC GAC-3' and 5'-GCC AGT CTC TGC AGA CTC TGG-3' (35). The primer pair for porcine destrin was: 5'-ATG ATG CAA GCT TTG AAA CC -3' and 5'- GGA AGC TTT CGA TCT GTG G -3'. The amplified products (0.4 Kb) were digested with appropriate restriction enzyme (underlined sequences in the primers denote the restriction sites) and cloned into pGEM4 vector. The nucleotide sequences of pig eNOS and destrin partial cDNAs were determined by sequencing multiple clones using T7 sequencing kit (BRL Life Technologies, Burlington, ON, Canada). [³²P]-

Labelled cRNA probes for eNOS and destrin were prepared using an *in vitro* transcription kit (Promega).

Total RNAs from choroid was aliquoted and subjected to RNase protection assays according to a published protocol with minor modifications (9). Briefly, 20 µg of total RNA was mixed with 10^5 cpm of eNOS and destrin probes in 20 µl of hybridization buffer (80% deionized formamide, 40 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EDTA and 0.4 M NaCl), denatured at 90°C for 5 min and incubated overnight at 50°C. The RNA hybrids were digested with ribonuclease A (10 µg/ml) and ribonuclease T₁ (200 units/ml) in 200 µl of digestion buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, and 0.3 M NaCl) for 30 min at 25°C, followed by precipitation of protected fragments (9). The protected RNA fragments were resolved on urea-6% polyacrylamide gels and the bands were visualized by phosphorimaging (Molecular Dynamics) and quantified densitometrically.

eNOS Western Blotting

Western blotting for choroidal eNOS was performed exactly as previously described (1).

Nitrite Production

Nitric oxide production was estimated by determination of its stable metabolite, nitrite (33). Measurement of nitrite production in isolated choroids was performed as previously reported (1). NOS-dependent formation of NO was estimated as the difference in nitrite production in the absence or presence of N^o-nitro-L-arginine (L-NA) (1 mM).

NOS activity

Total NOS activity in choroid was determined as the L-NA (1 mM)-sensitive production of L-[³H]citrulline from L-[³H]arginine as previously

described (19); constitutive calcium-dependent NOS activity (largely eNOS in choroid) (1) was determined after subtraction of calcium-independent iNOS activity (in presence of 0.5 mM EGTA) from total NOS activity.

Prostaglandin measurements

Choroidal levels of PGE₂, PGD₂ and 6-keto-PGF_{1α} (stable metabolite of PGI₂) were measured by radioimmunoassay (1,15).

Choroidal Vasomotor Responses

Choroidal vasomotor response to agents which elicit their effects mostly via NO was studied as previously described (1,15). Hence, effects of NO-dependent vasorelaxants acetylcholine (ACh) (14), bradykinin (Bk) (37) and Substance P (SP) (31) were determined on vascular tone of choroids from newborn animals treated for 24 h with saline, ibuprofen, or a combination of ibuprofen and PGD₂; juvenile pigs were treated with saline or PGD₂. The choroid was perfused using a pulsatile minipump (Gilson) with Krebs buffer at physiological (19) constant flow rates of ~0.20 mL/min in the newborn and at ~0.57 mL/min in juvenile to produce a perfusion pressure of 60 to 67 mm Hg (10,19) respectively. Perfusion pressure was continuously recorded using a pressure transducer (Perceptor DT) connected immediately afferent to the choroid; accordingly, a decrease in perfusion pressure reflects vasorelaxation and an increase vasoconstriction. After stabilization of the preparation (~30 min), U46619 (0.1 μM) was added to the perfusate to evoke constriction, and thereafter cumulative concentrations (10⁻¹² - 10⁻⁵ M) of ACh, Bk or SP were added to the perfusate; in some tissues the perfusate contained L-NMMA (1 mM). Relaxation was calculated as the percent reversal of U46619-induced constriction which was approximately 75-85% of maximal U46619-evoked constriction in both newborn and juvenile preparations; constriction to U46619 is unaffected by ibuprofen (2). To ascertain that NO-dependent vasorelaxants

produced a similar comparative profile of action on newborn and juvenile preparations, effects of ACh were tested on tissues precontracted with 8 μ M phorbol-12-myristate-13-acetate (non-receptor mediated) which exerts similar (80% of maximum) constriction in choroids of newborn and juvenile (1); results were comparable to those with U46619.

Measurement of ChBF

Animals were prepared to measure ChBF using the radiolabeled microsphere technique exactly as described in detail elsewhere (10,16,18,19). ChBF as a function of changes in perfusion pressure was studied as reported (17,18). Increased ocular perfusion pressure (OPP: mean blood pressure [MBP] minus intraocular pressure [IOP]) was produced by inflating a balloon-tipped catheter placed in the distal thoracic descending aorta through a femoral artery. Each animal was subjected to stepwise acute increases in OPP preset at 90, 105 and 125 mm Hg. These values varied by ≤ 5 mm Hg on different animals; baseline MBP was 68 ± 5 mm Hg for all animals and was unaffected by treatments. Once MBP remained steady (within 30 sec after balloon inflation), approximately 10^6 microspheres (15 μ m diameter) labeled with [141 Ce], [113 Sn] and [85 Sr] (DuPont NEN, Boston, MA) were injected in a random sequence into the catheterized left ventricle. Reference samples were appropriately collected over the following 70 sec. After the experiment pigs were killed (120 mg/kg pentobarbital). Radioactivity in the choroid and the reference blood samples were counted in a gamma scintillation counter (Cobra II, Canberra Packard, Meriden, CT), and blood flow calculated using an on-line computer program (PCGERDA, Charlottesville, VA).

Statistical Analysis

Data were analyzed by analysis of variance, comparison among means test (Tukey-Kramer method) and Student's *t*-test. ChBF was analyzed by

regression analysis as previously described (17,18). The Pearson's product moment coefficient (r) was calculated. Linear regressions were compared by regression equality test using the method of least squares. Data are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

1.4 Results

eNOS expression and activity in choroid of newborn and juvenile pig

Prostaglandin levels were 4-6 fold higher in newborn than juvenile choroid (Fig. 1A). This was associated with 3-5 fold greater eNOS mRNA, immunoreactive protein and activity, as well as nitrite production in newborn compared to juvenile tissue (Fig.1B-F); >90% of NOS activity was Ca⁺⁺-dependent (constitutive), and as we reported nNOS was not detectable using selective nNOS blockers and by immunoreactivity, confirming dominance of eNOS in this vascular tissue(1,19).

In vitro modulation of eNOS mRNA and nitrite production by prostaglandins in the choroid

Incubation of isolated newborn choroid with ibuprofen (10 μM) for 24 h (but not ≤2 h) caused a significant reduction in the expression of eNOS mRNA and in nitrite production to levels observed in the juvenile (Fig. 2A-C). Effects of ibuprofen were prevented by cotreatment with PGD₂, but unaltered by stable analogs of other major prostaglandins, 16,16-dimethyl PGE₂ and carbaprostacyclin, at similarly increased doses. Furthermore, the selective PGD₂ receptor (DP) antagonist BW A868C decreased eNOS mRNA and nitrite production to levels found in saline treated-juvenile and the ibuprofen-treated newborn choroids (Fig. 2A-C). Moreover in choroids of juveniles PGD₂, but not other prostaglandins, increased nitrite production and eNOS mRNA and this effect was prevented by co-treatment of PGD₂ with BW A868C to levels found in ibuprofen-treated newborn choroids.

In vivo modulation of NOS activity in newborn choroid

We examined whether in vitro effects of PGD₂ on eNOS mRNA and nitrite production are reflected more specifically on Ca⁺⁺-dependent NOS activity in vivo in the newborn. Treatment of neonatal pigs for 24 h with ibuprofen

reduced PGE₂, 6-keto-PGF_{1α} and PGD₂ levels in choroid respectively to 1408 ± 351, 704 ± 106 and 56 ± 11 pg/mg protein from those in saline-treated newborns (see Fig. 1A). This decrease in prostaglandin levels was associated with a decrement in NOS activity to levels found in the juvenile (Fig. 3). This reduction in NOS activity was prevented by cotreatment with PGD₂ but not with 16,16-dimethyl PGE₂ or carbaprostacyclin. Once again, the selective DP receptor blocker BW A868C reduced NOS activity to values in the juvenile and the ibuprofen-treated newborn.

Choroidal Vasomotor Responses

To determine if this up-regulation of eNOS expression and activity by PGD₂ is manifested physiologically in the control of choroidal vasomotor response, we tested if NO-dependent vasorelaxation was affected by modulation of eNOS expression. ACh, Bk and SP caused NO-dependent vasorelaxation as it was inhibited by LNMMA (Fig. 4). Treatment of newborns with ibuprofen decreased vasorelaxation to ACh, Bk and SP to values in juvenile (Fig. 4); this effect was prevented by (24 h but not ≤ 2 h) cotreatment with PGD₂, consistent with increased PGD₂-dependent NOS activity (Figs. 2 and 3). Correspondingly, juvenile animals treated (24 h) with PGD₂ exhibited increased vasorelaxation to ACh, Bk and SP as seen in saline-treated newborns. Infusion of L-NMMA in choroids of animals treated with PGD₂ reversed the augmented vasorelaxation to ACh, Bk and SP (Fig. 4).

ChBF Autoregulation

Because failure of the newborn to autoregulate ChBF is largely due to increased NO formation (18,19), we tested if modulation of NOS by prostaglandins affected in turn ChBF autoregulation; experiments were not conducted in juveniles because other factors such as increased efficacy of vasoconstrictors participate in the complex autoregulatory control of the older

subjects (25). Basal ChBF was 32 ± 3 and 29 ± 4 ml/min/g respectively in newborn and juvenile saline-treated pigs; blood gases, heart rate and IOP remained stable throughout experiments. In saline-treated newborn pigs, in contrast to juveniles ($r = 0.13-0.22$, $p > 0.3$; [Fig. 5F]), ChBF increased linearly as function of OPP over the entire range of OPP studied ($r = 0.82-0.96$, $p < 0.01$) (Fig. 5A). Whereas treatment of newborns with ibuprofen or BW A868C (24 h) led ChBF to be maintained constant as a function of OPP ($r = 0.07-0.31$, $p > 0.4$) (Fig. 5B,D). Coadministration of PGD_2 with ibuprofen caused ChBF to increase linearly with OPP as seen in saline-treated newborns ($r = 0.71-0.99$, $p < 0.05$) (Fig. 5C); addition of L-NMMA reduced basal ChBF to 16 ± 3 ml/min/g, increased MBP from 64 ± 4 to 83 ± 5 mm Hg as expected (18), and caused ChBF to remain stable as a function of OPP ($r = 0.10-0.30$, $p > 0.3$) (Fig. 5E). Regression coefficients for newborn pigs treated with saline or ibuprofen + PGD_2 differed significantly from juveniles and from newborns treated with ibuprofen, BW A868C or ibuprofen + PGD_2 + L-NMMA ($p < 0.05$, by regression equally test).

1.5 Discussion

Increased NOS activity in the newborn choroid exerts important functions by maintaining adequate ocular circulation during the development of the retinal vascular bed (18,19,21). However, as a result of this increased NO formation ChBF autoregulatory response to increased O₂ and perfusion pressure is absent in the perinate (18,19). The mechanisms that regulate NOS expression and activity in choroid during development are not known. Prostaglandin levels in choroid are also increased in the neonate and these have equally been found to curtail ChBF autoregulation (1,2,10,21). Prostaglandins, primarily PGE₂, have been reported to regulate iNOS expression (3,12,27,30). We therefore investigated if and which type of prostaglandins might govern the expression specifically of eNOS in the developing choroid. Our findings reveal that high levels of PGD₂ through its actions on DP receptors regulate eNOS expression and activity in the choroid of the neonate, and this in turn affects choroidal vasomotor regulation.

Evidence that high levels of prostaglandins, specifically PGD₂, modulate eNOS expression in the newborn choroid is based on the following observations. 1) Reduction in prostaglandin levels of the newborn by ibuprofen (sustained [24 h], but not acute) to levels in the juvenile caused a decrease in eNOS mRNA, protein and NOS activity (Figs. 2 and 3) to values in the older subject. 2) Effects of ibuprofen were reproduced by the selective PGD₂ receptor blocker BW A868C. 3) Ibuprofen-induced inhibition of eNOS expression in newborns was prevented specifically by PGD₂ but not by other prostaglandins (even at high concentrations, 1 μM); this modulation of eNOS by PGD₂ was observed *in vitro* and *in vivo*. 4) Because our data suggested that high PGD₂ levels in the newborn up-regulate eNOS expression, we tested if PGD₂ can increase eNOS activity in the juveniles (which have low prostaglandin and NO formation); our observations supported this inference (Fig. 2). One may suggest that the reported role of estrogens in regulating eNOS activity in lung tissue and

cells may in part be attributed to prostaglandins (26,29); alternatively, prostaglandins and estrogens may facilitate each other in coordinating the control of eNOS expression.

An important finding in this study is that the regulation of eNOS expression by PGD₂ in the choroid is reflected in the developmental control of vasomotor tone. It has previously been shown that increased NO formation in the newborn exerts a greater contribution on basal choroidal vascular tone than in that of the juvenile adult and also curtails autoregulatory response (18,19). Accordingly, a reduction in NOS activity after ibuprofen or BW A868C decreased effects of NO-dependent vasorelaxants and enhanced ChBF autoregulation (Figs. 4 and 5) as seen after treatment with NOS inhibitors (18,19). Conversely, addition of PGD₂ (24 h) evoked a choroidal vasomotor control as seen in the saline-treated newborns. Interestingly, sustained inhibition of prostaglandin synthesis has been reported to improve the regulation of choroidal vasomotor tone *in vivo* in the newborn (10). The present study provides a mechanism by which prostaglandins, specifically PGD₂, interact with NOS in the control of choroidal vascular tone, such that prostaglandins regulate NO formation and the latter exerts a major role in governing ChBF.

The mechanism responsible for PGD₂ in inducing eNOS expression is not clear; however certain inferences can be made. Although DP receptors stimulation is mostly coupled to cAMP formation (11) a cAMP response element is not present on the eNOS promoter (32,36); albeit the latter does contain a site for AP-1 which may be activated by cAMP-dependent protein kinase A -induced phosphorylation (6). Alternate possibilities include the activation directly of functional perinuclear prostanoid receptors which have been shown to induce gene transcription (7). In support of this suggestion inhibition of the prostaglandin transporter using bromocresol green (22) prevented PGD₂-induced up-regulation of eNOS expression in choroid (personal data).

In conclusion, our results reveal an important mechanism for the developmental regulation of eNOS by PGD₂ in the choroid, which in turn confers a major role on vasomotor tone. The findings disclose a new mechanism for the regulation of eNOS expression, namely by PGD₂ via DP receptors. This relationship between PGD₂ and eNOS provides an explanation for the interactive role of these two factors in curtailed ChBF autoregulation in the newborn (10,18,19). The findings may also have implications for understanding of retinal hyperoxygenation (10,19), a predisposition to retinopathy of prematurity.

1.6 Acknowledgments

We are grateful to Hendrika Fernandez for her technical assistance. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, the Heart and Stroke Foundation of Québec, the Hospital for Sick Children Foundation, the March of Dimes Birth Defects Foundation, the United Cerebral Palsy Foundation, the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. I. Dumont is a recipients of a studentship from the Ministry of Indian and Northern Affairs, Canada, and P. Hardy of a fellowship award from the Medical Research Council of Canada.

1.7 Reference

1. **Abran, D., I. Dumont, P. Hardy, K.G. Peri, D.Y. Li, S. Molotchnikoff, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Characterization and regulation of prostaglandin E₂ receptor and receptor coupled functions in the choroidal vasculature of the pig during development. *Circ. Res.* 80:463-472, 1997.
2. **Abran, D., D.R. Varma, and S. Chemtob.** Regulation of prostanoid vasomotor effects and receptors in choroidal vessels of newborn pigs. *Am. J. Physiol.* 272 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 41): R995-R1001, 1997.
3. **Aeberhard, E.E., S.A. Henderson, N.S. Arabolos, J.M. Griscavage, F.E. Castro, C.T. Barret, and L.J. Ignarro.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208:1053-1059, 1995.
4. **Alm, A., and A. Bill.** The oxygen supply to the retina. I. Effects of changes in intraocular and arterial blood pressures, and in arterial PO₂ and PCO₂ on the oxygen tension in the vitreous body of the cat. *Acta. Physiol. Scand.* 84:261-274, 1972.
5. **Ando, T., T. Ichijo, T. Katafuchi, and T. Hori.** Intracerebroventricular injection of prostaglandin E₂ increases splenic sympathetic nerve activity in rats. *Am. J. Physiol.* 269 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 38): R662-R668, 1995.
6. **Barchowsky, A., S.R. Munro, S.J. Morana, M.P. Vincenti, and M. Treadwell.** Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-κB and AP-1 in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 269:L829-L836, 1995.
7. **Bhattacharya, M., K.G. Peri, G. Almazan, A. Ribeiro-da-Silva, H. Shichi, Y. Durocher, M. Abramovitz, X. Hou, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Nuclear Localization of prostaglandin E₂ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95:15792-15797, 1998.

8. **Bhattacharjee, P., L. Rhodes, and C.A. Paterson.** Prostaglandin receptors coupled to adenylyl cyclase in the iris-ciliary body of rabbits, cats and cows. *Exp. Eye Res.* 56:327-333, 1993.
9. **Bordonaro, M., C.F. Saccomanno, and J.L. Nordstrom.** An improved T1/A ribonuclease protection assay. *Biotechniques* 16:428-430, 1994.
10. **Chemtob, S., K. Beharry, J. Rex, T. Chattejee, D.R. Varma, and J.V. Aranda.** Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32:1799-1807, 1991.
11. **Coleman, R.A., W. Smith, and S. Narumiya.** VIII. International Union of Pharmacology Classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46:205-229, 1994 .
12. **Gaillard, T., A. Mulsch, H. Klein, and K. Decker.** Regulation by prostaglandin E₂ of cytokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages. *Biol. Chem.* 373:897-902, 1992.
13. **Giles, H., P. Leff, M.L. Bolofo, M.G. Kelly, and A.D. Robertson.** The classification of prostaglandin DP-receptors in platelets and vasculature using BW A868C, a novel, selective and potent competitive antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 96:291-300, 1989.
14. **Granstam, E., S.O. Granstam, B. Fellstrom, and L. Lind.** Endothelium-dependent vasodilation in the uvea of hypertensive and normotensive rats. *Curr. Eye Res.* 17:189-196, 1998.
15. **Hardy, P., D. Abran, X. Hou, I. Lahaie, K.G. Peri, P. Asselin, D.R. Varma, and S. Chemtob.** A major role for prostacyclin in nitric oxide-induced ocular vasorelaxation in the piglet. *Circ. Res.* 83:721-729, 1998.
16. **Hardy, P., D. Abran, D.Y. Li, H. Fernandez, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation

in the piglets interaction with prostaglandins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35:580-591,1994.

17. **Hardy, P., M. Bhattacharya, D. Abran, K.G. Peri, P. Asselin, D.R.Varma, and S. Chemtob.** Increases in retinovascular prostaglandin receptor functions by cyclooxygenase-1 and -2 inhibition. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:1888-1898, 1998.
18. **Hardy, P., A.M. Nuyt, D. Abran, J. St-Louis, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interactions with prostaglandins. *Pediatr. Res.* 39: 487-493, 1996.
19. **Hardy, P., K.G. Peri, I. Lahaie, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circ. Res.* 79: 504-511, 1996.
20. **Hardy, P., D.R. Varma, and S. Chemtob.** Control of cerebral and ocular blood flow autoregulation in neonates. *Pediatr. Clinics North Am.* 44: 137-152, 1997.
21. **Jacot, J.L., J.T. O'Neill, D.M. Scandling, S.D. West, and J.E. McKenzie.** Nitric oxide modulation of retinal, choroidal, and anterior uveal blood flow in newborn piglets. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 14:473-489, 1998.
22. **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.
23. **Kennedy, T.G., and P.E. Doktorcik.** Effects of analogues of prostaglandin E₂ and F_{2a} on the decidual cell reaction in the rat. *Prostaglandins* 35:207-219,1998.
24. **Kiel, J.W., and W.A.J. van Heuven.** Ocular perfusion pressure and choroidal blood flow in the rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36:579-585, 1995.

25. **Li, D., P. Hardy, D. Abran, A.K. Martinez-Bermudez, A.M. Guerguerian, M. Bhattacharya, G. Almazan, K. Menezes, K.G. Peri, D.R. Varma, and S. Chemtob.** Key role for cyclooxygenase-2 in PGE₂ and PGF_{2α} receptor regulation and cerebral blood flow of the newborn. *Am. J. Physiol.* 273 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 42): R1283-R1290, 1997.
26. **MacRitchie, A.N., S.S. Jun, Z. Chen, Z. German, I.S. Yuhanna, T.S. Sherman, and P.W. Shaul.** Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ. Res.* 81:355-62, 1997.
27. **Marotta, P., L. Sautebin, and M. Di. Rosa.** Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line. *Br. J. Pharmacol.* 107:640-641, 1992.
28. **McLeod, D.S., R. Brownstein, and G.A Lutty.** Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:300-311, 1996.
29. **Myers, S.I., R.H. Turnage, L. Bartula, B. Kalley, and Y. Meng.** Estrogen increases male rat aortic endothelial (RAEC) PGI₂ release. *Prostaglandin Leukot. Essent. Fatty Acids* 54:403-409, 1996.
30. **Raddassi, K., J.F. Petit, and S. Lemaire.** LPS-induced activation of primed murine peritoneal macrophages is modulated by prostaglandins and cyclic nucleotides. *Cell Immunol.* 149:50-64, 1993.
31. **Rosenblum, W.I., T. Shimizu, and G.H. Nelson.** Endothelium-dependent effects of substance and calcitonin gene-related peptide on mouse pial arterioles. *Stroke* 7:1043-1047, 1993.
32. **Venema, R.C., K. Nishida, R.W. Alexander, D.G. Harrison, and T.J. Murphy.** Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1218:413-420, 1994.

33. **Verdon, C.P., B.A. Burton, and R.L. Prior.** Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP^+ when the Greiss reaction is used to assay for nitrite. *Anal. Biochem.* 224:502-508, 1995.
34. **Zhang, J.L., J.M. Patel, and E.R. Block.** Molecular cloning, characterization and expression of a nitric oxide synthase from porcine pulmonary artery endothelial cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 116:485-491, 1996.
35. **Zhang, R., W. Min, and W.C. Sessa.** Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270:15320-15326, 1995.
36. **Zhu, P., J.L. Beny, J. Flammer, T.F. Lüscher, and I.O. Haefliger.** Relaxation by bradykinin in porcine ciliary artery. Role of nitric oxide and K^+ channels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38:1761-1767, 1997.

Figure 1.

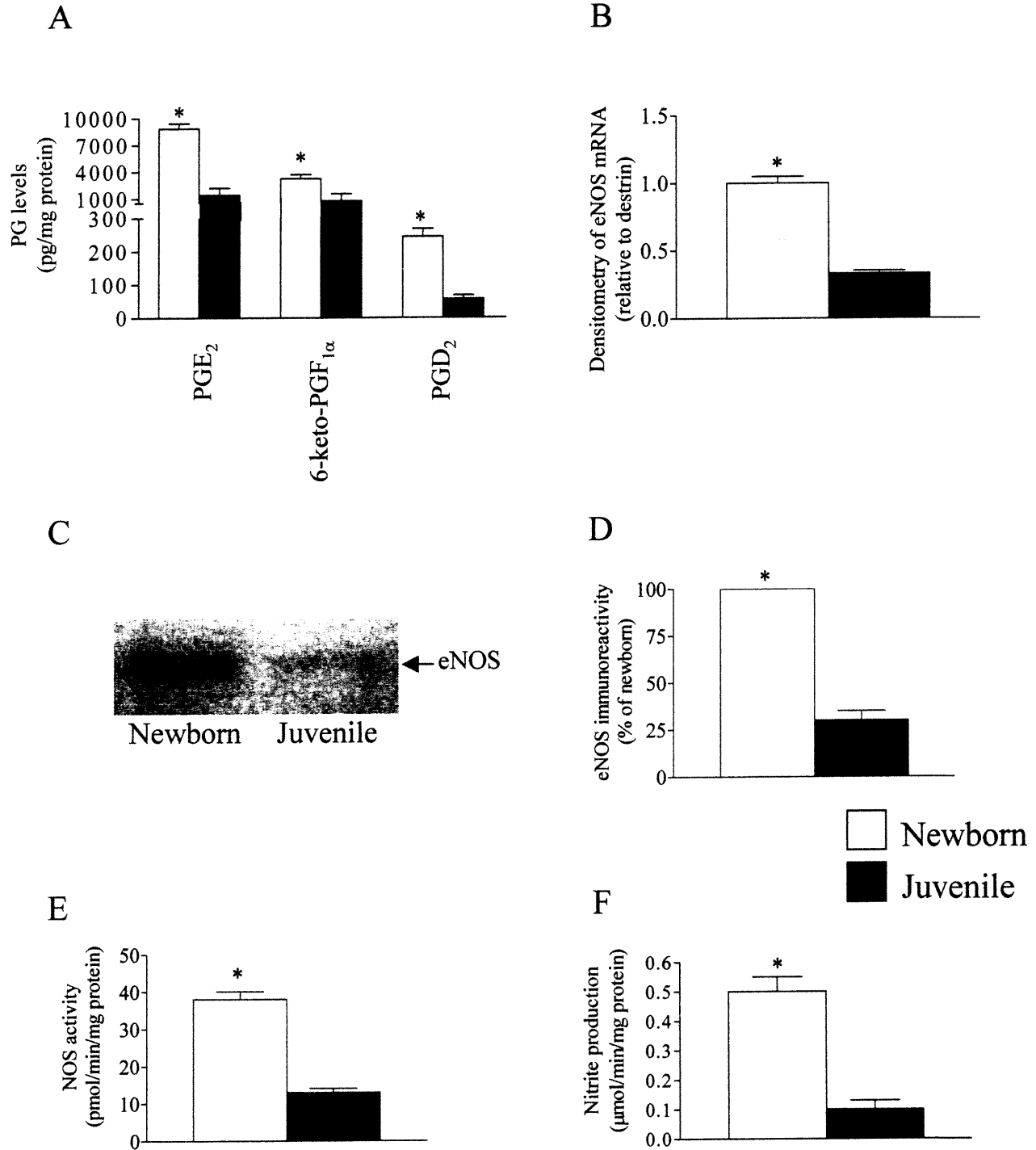


Figure 1. Prostaglandin (PG) levels (A) and endothelial (e) nitric oxide synthase(NOS) mRNA (B), eNOS protein (C and D), NOS activity (E), and nitrite production (F) in newborn (1 day old) and juvenile (6-8 weeks old) pig choroid. (B) 20 μg total RNA were subjected to RNase protection assay. C and D Western blot lanes were each loaded with 100 μg protein; arrow points to the eNOS 140 kDa protein, the only band detected in the range of interest, 120-180 kDa. (E) NOS activity was measured as Ca^{++} -dependent N^{o} -nitro-L-arginine (L-NA)-sensitive production of L- [^3H] citrulline from L- [^3H] arginine. Likewise in (F) nitrite production was measured as that sensitive to L-NA. Values are means \pm SEM of 3-4 experiments for values each performed in duplicate. * $p < 0.01$ compared with value for the juvenile.

Figure 2.

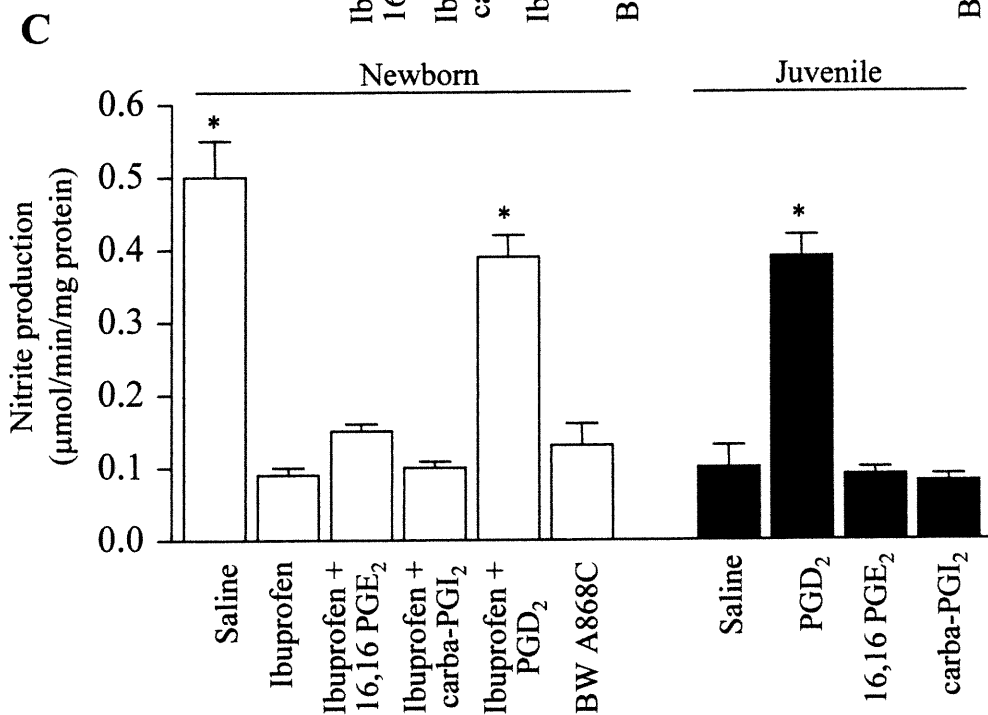
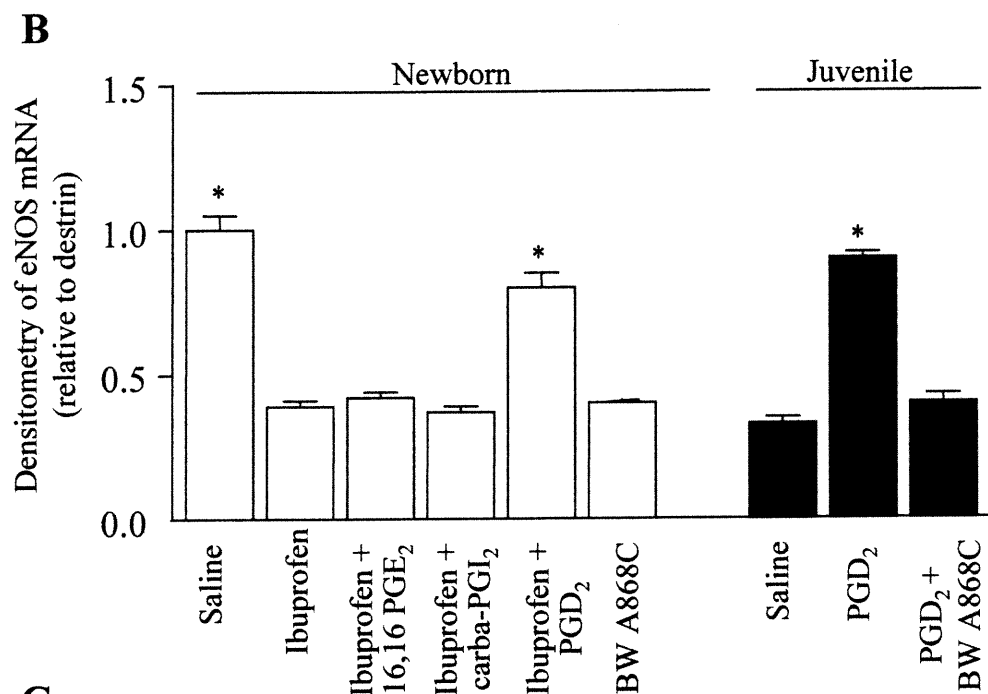
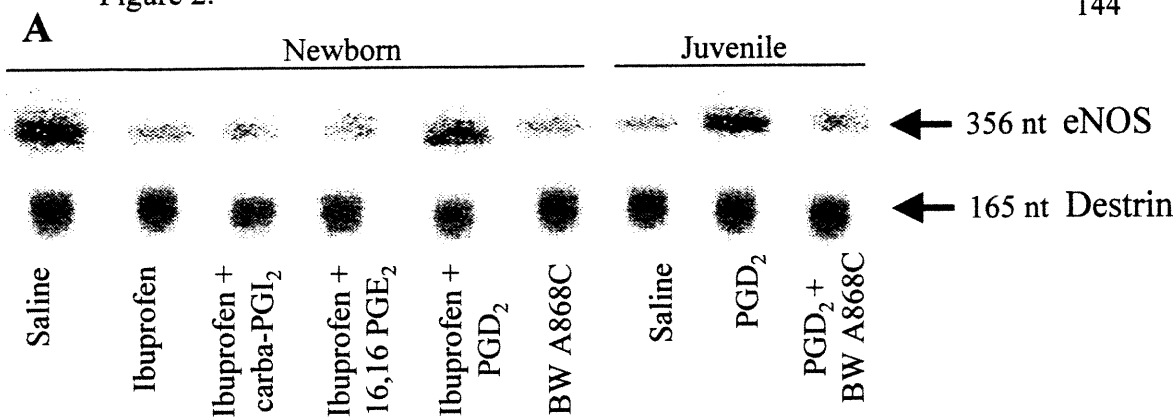


Figure 2. Modulation of eNOS mRNA expression (A and B) and nitrite production (C) by prostaglandins in isolated choroids. Choroids of newborn pigs were incubated for 24 h with saline, ibuprofen (10 μ M), a combination of ibuprofen and (1 μ M) PGD₂, 16,16-dimethyl PGE₂ (16,16 PGE₂) or carbaprostacyclin (carba-PGI₂), or with BW A868C (1 μ M); choroids of juveniles were treated with saline, PGD₂, or a combination of PGD₂ with BW A868C. RNase protection assays were performed as in Figure 1. The protected RNA fragment of eNOS contained 356 nucleotides (nt), and that of destrin 165 nt. Autoradiographic exposure was overnight and visualized by phosphorimaging. Values are mean \pm SEM of 3-4 experiments each performed in duplicate. * $p < 0.01$ compared with all other values without asterisk.

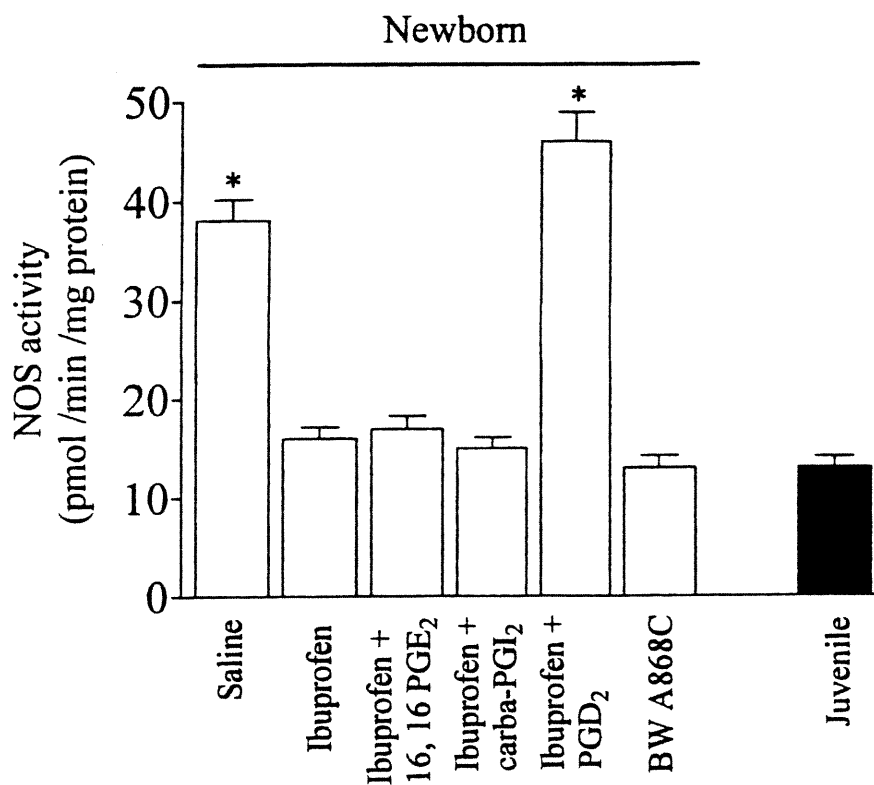


Figure 3. *In vivo* modulation of NOS activity in newborn pig choroid by prostaglandins. Newborn pigs were treated every 8 h for 24 h with saline, ibuprofen (40 mg/kg), a combination of ibuprofen with PGD₂, 16,16-dimethyl PGE₂, or carbaprostacyclin (all at $\mu\text{g}/\text{kg}$) or with BW A868C (PGD₂ receptor antagonist, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Juvenile animals were treated with saline. Ca⁺⁺-dependent constitutive NOS activity was determined as the L-NA (1 mM)-sensitive production of L-[³H]citrulline from L-[³H]arginine after subtracting Ca⁺⁺-independent activity (see Material and methods). Values are mean \pm SEM of 3-4 experiments. * $p < 0.01$ compared with all other values without asterisk.

Figure 5.

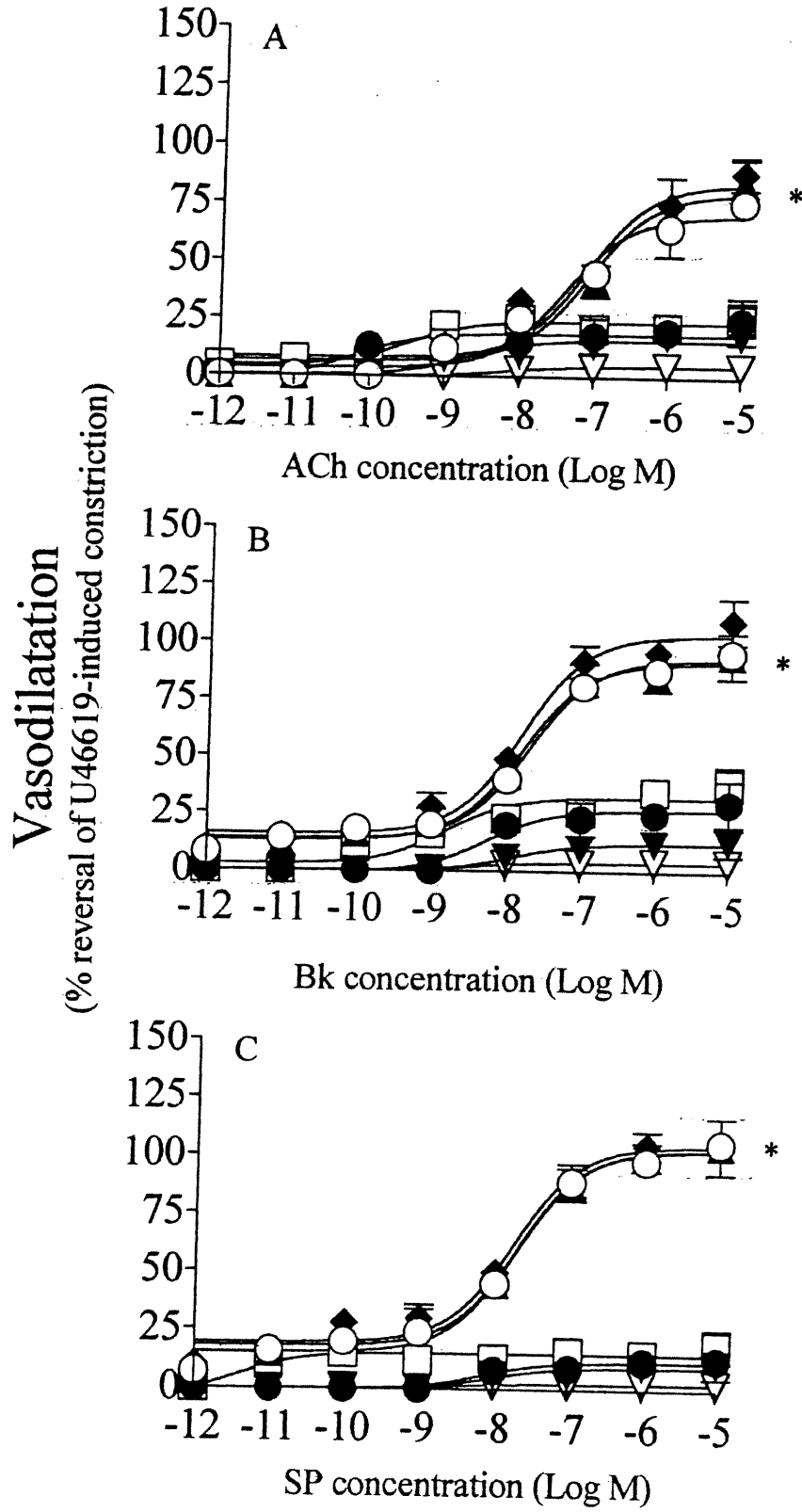


Figure 4. Vasorelaxation of choroids to Ach (A), bradykinin (Bk; B) and Substance P (SP;C). Newborn animals were treated every 8 h for 24 h with saline (○), ibuprofen (40 mg/kg;●), or a combination of ibuprofen and PGD₂ (10 μg/kg; ▲); juvenile pigs were treated similarly with saline (□) or PGD₂ (◆). Some preparations of newborn and juvenile animals were infused with N^ω-monomethyl-L-arginine (L-NMMA;1 mM). To avoid overcrowding data are shown only for PGD₂-treated newborn (▼), although results were similar for PGD₂-treated juvenile as well as saline-treated newborn; L-NMMA-infused preparations of saline treated juveniles are presented (∇). Values are mean ± SEM of 4 experiments expressed as percent reversal of constriction induced by U46619 (0.1 μM). * p < 0.01 compared to juveniles, and with L-NMMA- and ibuprofen-treated newborn pigs (by ANOVA).

Figure 6.

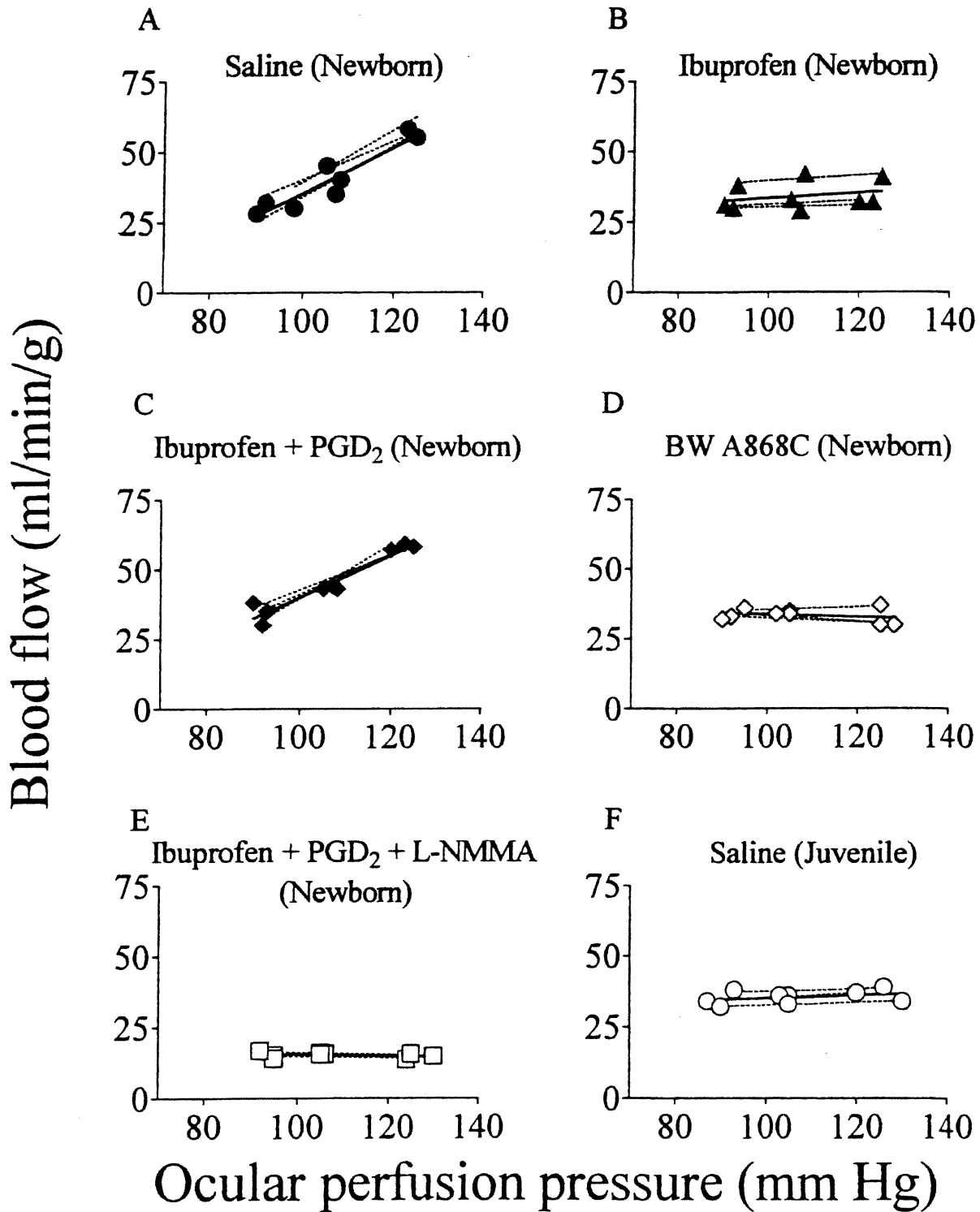


Figure 5. Choroidal blood flow (ChBF) as a function of ocular perfusion pressure (OPP). Animals (n=3 in each group) were treated as described in Figures. 3 and 4; an additional 3 animals treated with ibuprofen and PGD₂ also received L-NMMA (1 mg/kg) 30 min prior to ChBF measurements. Broken lines correspond to the regressions for individual animals, and solid lines are mean regressions for all animals in the group. In newborn pigs treated with saline or a combination of ibuprofen and PGD₂ (C), ChBF increased linearly with OPP ($r = 0.71-0.99$, $p < 0.01$). In saline-treated juvenile pigs and in newborns treated with ibuprofen, BW A868C or a combination of ibuprofen + PGD₂ + L-NMMA (B,D, and E), ChBF did not change as a function of OPP ($r = 0.07-0.31$, $p > 0.4$).

VI. DISCUSSION

Le NO s'est révélé comme un messager intercellulaire très important et un agent vasodilatateur puissant dans plusieurs fonctions physiologiques lors du développement du cerveau et de la vasculature. Le NO synthétisé par les NOS constitutives (n- et e- NOS) joue des rôles dans la synaptogénèse, le raffinement des connexions, ainsi que dans l'hémodynamie vasculaire en réponse aux demandes métaboliques (Bredt, 1994; Iadecola, 1994; Wu, 1994). Des fonctions similaires ont été observées pour les PGs (Kaufmann, 1996; Li, 1997; Peri, 1995; Yagamata, 1993). L'induction de NO et des PGs durant la période périnatale aurait pour but de préserver des fonctions cellulaires et circulatoires pour le développement normal du cerveau et de la vasculature.

Ontogenèse des NOS constitutives et des prostaglandines dans le cerveau et la vasculature

Nos résultats démontrent une augmentation de l'expression génique, de l'activité des NOS constitutives, et des niveaux des PGs en période périnatale. Dans le cerveau du rat, l'ARN messager de la nNOS est détecté à l'âge embryonnaire F₁₇ et atteint son plus haut niveau 10 jours après la naissance et ensuite diminue pour atteindre ainsi un niveau qui correspond approximativement à celui obtenu chez le fœtus (III : Fig. 1). Ces niveaux corrélerent avec ceux de la COX-2, c'est à dire l'enzyme responsable des niveaux élevés des PGs et de l'activité totale (90 %) de la COX dans le cerveau du nouveau-né (Yagamata, 1993; Peri, 1995; Li, 1997). En effet, l'ARN messager de la COX-2 atteint son plus haut niveau au jour 10 après la naissance et diminue ensuite chez l'adulte (III :

Fig. 1). Des études démontrent que le nombre de synapses chez le cerveau du rat augmente d'une façon marquée entre la deuxième et la troisième semaine après la naissance (Crain, 1973; Lennon, 1980; Galea, 1995). Nos résultats suggèrent donc, que la nNOS et la COX -2 atteignent leur plus haut niveau juste avant la phase rapide de la formation des synapses. Les niveaux élevés de la production de NO par la nNOS et des PGs synthétisées par la COX-2 pourraient avoir un rôle important dans la physiologie et le développement normal du cerveau. Des résultats similaires ont été obtenus chez le porc. L'ARN messager de la nNOS et de la COX-2 est de 3 à 4 fois plus élevé dans le cerveau du porc nouveau-né que chez l'adulte (III : Fig. 2). Les niveaux de protéines de la nNOS, de l'activité de NOS, ainsi que la production des nitrites sont aussi augmentés chez le nouveau-né comparativement à l'adulte (III : Fig. 2). Ainsi, nos résultats démontrent un parallélisme temporel entre la nNOS et la COX-2 au cours du développement du cerveau dans deux modèles animaux différents.

La eNOS joue un rôle important dans le contrôle du débit sanguin cérébral, du métabolisme et de l'activité neuronale (Ohashi, 1998; Prado, 1992; Lo, 1996), notamment chez le nouveau-né (Northington, 1996; Northington, 1997). Des fonctions similaires et des changements ontogéniques ont été observés pour les PGs (Leffler, 1993; Peri, 1995; Busija, 1997). Nos résultats démontrent que l'expression génique de la eNOS, l'activité de NOS, ainsi que les niveaux de la PGE₂ dans les microvaisseaux cérébraux (150 µM) du porc sont plus élevés chez le nouveau-né que chez l'adulte (IV : Fig. 1).

Cette différence ontogénique en faveur d'une production accrue des PGs, de l'expression de la eNOS, ainsi que de l'activité de la NOS chez le nouveau-né est montré dans un autre tissu vasculaire, soit la

choroïde. L'expression et l'activité de la eNOS sont plus élevées dans la choroïde du nouveau-né que de l'adulte, et ces niveaux sont en corrélation avec ceux des PGs (V : Fig. 1). Des études démontrent que le NO et les PGs jouent des rôles semblables dans le contrôle des débits sanguins choroïdiens du nouveau-né (Chemtob, 1991; Hardy, 1996a). La choroïde est un tissu vasculaire non-neuronal dont sa principale fonction est de nourrir la rétine (Alm, 1972). L'oxygène et les nutriments sont principalement apportés à la rétine par la choroïde (Yu, 1996). L'augmentation de l'activité de la NOS et des niveaux des PGs dans la choroïde du nouveau-né maintient une circulation oculaire adéquate durant le développement des lits vasculaires rétiniens (Chemtob, 1991; Hardy, 1996a; Hardy, 1996b; Jacot, 1998). Cependant, la production élevée de NO et des PGs chez le nouveau-né contribue significativement à l'incapacité du nouveau-né d'autoréguler les débits sanguins choroïdiens durant des ajustements de pression de perfusion et en conséquence à maintenir constant un apport d'oxygène (Chemtob, 1991; Hardy, 1996a; Hardy, 1996b). L'incapacité de maintenir le débit sanguin constant lors de changements de pression de perfusion conduit fréquemment à une oxygénation excessive. Le facteur le plus important contribuant au développement de la rétinopathie du prématuré semble être l'apport excessif d'oxygène à la rétine (Flynn, 1992).

Régulation des NOS constitutives par les prostaglandines

Étant donné l'importance des NOS constitutives (n-et e-NOS) dans le développement du cerveau et de la vasculature, il est donc d'intérêt de comprendre les mécanismes de régulation responsables de l'augmentation des NOS durant la période périnatale. Suite à nos résultats qui montrent un parallélisme temporel entre les NOS constitutives et les

PGs, et que les PGs jouent un rôle dans la régulation de la NOS inducible (Radomski, 1990; Gaillard, 1992; Marotta, 1992; Raddassi, 1993; Aeberhard, 1995; Minghetti, 1997); nous avons proposé l'hypothèse que la production accrue des PGs durant la période périnatale contrôle l'expression des NOS dites constitutives (n- et e-NOS) lors du développement du cerveau et de la vasculature.

L'inhibition de la synthèse des PGs avec un bloqueur non sélectif (ibuprofène) ou sélectif de la COX-2 (nimesulide) réduit de façon similaire l'expression et l'activité de la nNOS dans le cerveau du rat (9 jours) et du porc (1-2 jours) nouveau-né à des valeurs comparables à celles de l'adulte (III : Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7). L'addition concomitante d'un analogue stable de la PGE₂ (16,16 diméthyl-PGE₂) renverse l'effet d'inhibition du nimesulide sur l'expression de la nNOS chez le nouveau-né; mais pas par des analogues de la PGI₂ (carbaprostacycline) ou de la PGD₂ (III : Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6). Nos résultats révèlent donc, un nouveau mécanisme par lequel la nNOS est régulée dans le cerveau durant la période périnatale. L'augmentation de la PGE₂ synthétisée par la COX-2 régule l'expression de la nNOS au cours du développement du cerveau.

Puisque la eNOS et les PGs jouent des rôles importants (Ohashi, 1998; Prado, 1992; Lo, 1996; Leffler, 1993; Peri, 1995; Busija, 1997) et des changements ontogéniques semblables dans la vasculature cérébrale, nous avons examiné si les PGs peuvent moduler la eNOS. À cette fin, nous avons inhibé la COX avec un bloqueur non sélectif (ibuprofène) et mesuré l'expression et l'activité de la eNOS. En bloquant la synthèse des PGs pendant 24 heures à l'aide de l'ibuprofène dans les vaisseaux sanguins cérébraux du porc nouveau-né, l'ARN messager de la eNOS, la production de nitrite et la NADPH diaphorase sont diminués (IV : Fig. 2,

Fig. 3; Fig. 4). Cet effet inhibiteur de la COX sur la eNOS est prévenu par 16,16-diméthyl PGE₂; mais pas par la carbaprostacycline ou la PGD₂ (IV : Fig. 2, Fig. 3; Fig. 4). Ces observations suggèrent une régulation de la eNOS effectuée par la PGE₂ dans la vasculature cérébrale du nouveau-né.

Bien que les niveaux de la PGE₂ soient élevés dans la choroïde du nouveau-né, ceux-ci ne sont pas impliqués dans la régulation de l'expression de la eNOS. C'est plutôt la PGD₂ qui contrôle l'expression de la eNOS dans la choroïde. L'inhibition de la synthèse des PGs par l'ibuprofène réduit l'expression de l'ARN messager de la eNOS ainsi que la production de nitrite dans la choroïde du porc nouveau-né à des valeurs comparables à celles de l'adulte (V : Fig. 2; Fig. 3). Les effets de l'ibuprofène sont renversés par la PGD₂; mais pas par la PGE₂ ou la PGI₂ (V : Fig. 2; Fig. 3). Ce qui suggère que la PGD₂ contribue à la régulation de la eNOS dans la choroïde du porcelet nouveau-né.

En conclusion, nos résultats démontrent une implication importante des PGs dans la régulation des NOS constitutives durant la période périnatale; et que dépendent du tissu, des PGs spécifiques agissent dans cette régulation. Dans le cerveau et la vasculature cérébrale, la PGE₂ régule l'expression de la n-et la e-NOS; tandis que dans la choroïde, la PGD₂ contrôle l'expression de la e-NOS.

Les récepteurs des prostaglandines dans la régulation des NOS constitutives

Les PGs dans le contrôle de l'expression des NOS constitutives exercent leurs actions en agissant sur des récepteurs spécifiques. Parmi les

différents types de récepteurs des PGs, les récepteurs EP₃ sont impliqués dans le contrôle de l'expression des NOS constitutives (n- et e-NOS) dans le cerveau et la vasculature cérébrale du nouveau-né. L'activation du récepteur EP₃ par des agonistes tels sulprostone et M&B 28, 767 renversent l'effet inhibiteur de l'ibuprofène sur l'expression et l'activité de la n- et la e- NOS (IV : Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6; V : Fig. 3). Ces observations furent confirmées par la technique de NADPH-diaphorase. L'expression de la NOS dans le cortex cérébral, majoritairement présent dans les neurones des couches profondes du cortex cérébral et des vaisseaux sanguins cérébraux est réduit par l'ibuprofène et le nimesulide, mais cet effet est renversé par le sulprostone (IV : Fig. 7; V : Fig. 4). La relation spatiale entre les neurones et les vaisseaux sanguins, avec le fait que le sulprostone module l'activité de NADPH diaphorase, suggèrent l'action de la PGE₂ via le récepteur EP₃ dans le développement neuronal et la régulation du débit sanguin cérébral. Nos résultats ont également démontré que 16,16-diméthyl PGE₂ et M&B 28,767 augmentent l'expression de la eNOS dans la vasculature cérébrale chez l'adulte (IV, Fig. 3).

Dans la choroïde, c'est l'action de la PGD₂ via son récepteur DP qui contribue à la régulation de l'expression de la eNOS. La diminution de la synthèse des PGs via l'utilisation d'un inhibiteur non sélectif de la COX (ibuprofène) ou un antagoniste spécifique des récepteurs DP de la PGD₂ (BW A868C) réduit l'ARN messager de la eNOS, la production de nitrite et l'activité de la NOS à des valeurs comparables à celles de l'adulte dans la choroïde du nouveau-né (IV : Fig. 2, Fig. 3). Cet effet inhibiteur est renversé par l'addition d'un agoniste de la PGD₂; mais pas par des analogues de la PGI₂ ou de la PGD₂ (IV : Fig. 2, Fig. 3). De plus, les niveaux élevés de la PGD₂ régule l'expression de la eNOS dans la choroïde du porc adulte. L'addition de la PGD₂ augmente l'ARN

messager de la eNOS ainsi que la production de nitrite dans la choroïde de l'adulte (V : Fig. 2). Cette effet est renversé par l'ajout de BW A868C avec la PGD₂ à des valeurs comparables au nouveau-né traité avec l'ibuprofène (V : Fig. 2). Ces résultats suggèrent que la PGD₂ via l'activation du récepteur DP est responsable des niveaux élevés des PGs dans la choroïde, laquelle joue un rôle dans la régulation de l'expression et de l'activité de la eNOS .

Les raisons de l'implication de récepteurs distincts au niveau de fonctions semblables dans différents tissus ne sont pas bien connues jusqu'à maintenant. Par contre, les nombreuses isoformes du récepteurs EP₃ couplées à une variété de voies de signalisation de transduction pourraient expliquer en partie les rôles des récepteurs des PGs dans la régulation des NOS constitutives. Les différentes isoformes du récepteur EP₃ couplés à des protéines G différentes, conduisent à plusieurs voies de signalisation. Par exemple, les isoformes couplées à la protéine régulatrice de type Gi conduisent à l'inhibition de la voie de signalisation de l'AC; tandis que les sous-unités couplées à la protéine régulatrice de type Gs induisent l'augmentation de l'AC (Namba, 1993).

Rôles physiologiques de la régulation des NOS constitutives par les prostaglandines dans le tonus vasomoteur et l'autorégulation

Par la suite, nous avons examiné si l'action des PGs (PGE₂ et PGD₂) en agissant via des récepteurs spécifiques (EP₃ et DP) contribuant à la régulation de l'expression des NOS constitutives (nNOS et eNOS) dans le cerveau et la vasculature se manifeste dans des événements physiologiques important tels le tonus vasomoteur et l'autorégulation.

Tonus Vasomoteur

Pour examiner la contribution relative des PGs dans le contrôle du tonus vasomoteur en réponse au NO endogène, nous avons utilisé des agents vasoactifs qui permettent de mesurer les réponses vasomotrices qui dépendent du NO. L'acétylcholine, la bradykinine et la substance P se sont avérés des facteurs importants dans le contrôle du tonus vasculaire; ceux-ci dilatent la plupart des vaisseaux sanguins, un effet qui est dépendant du NO (Kontos, 1990; Jansen, 1991; Rosenblum, 1993). L'effet de vasodilatation en réponse à la substance P est réduit chez le porcelet traité avec l'ibuprofène à des valeurs comparables à celles de l'adulte (IV : Fig. 5). Le traitement concomitant de l'ibuprofène avec un agoniste potentiellement spécifique au récepteur EP₃ (sulprostone) renverse l'effet inhibiteur de l'ibuprofène (IV : Fig. 5). Ainsi, ces études physiologiques confirment que les niveaux élevés de la PGE₂ dans la vasculature cérébrale en agissant via des récepteurs EP₃ jouent un rôle important dans le contrôle du tonus vasomoteur en réponse au NO endogène.

L'action de la PGD₂ via son récepteur DP contribuant à la régulation de l'expression de la eNOS dans la choroïde du nouveau-né joue aussi un rôle important au niveau du tonus vasculaire. Les réponses de vasorelaxation en réponse à l'acétylcholine, la bradykinine et la substance P sont diminuées chez le nouveau-né traité avec l'ibuprofène à des valeurs comparables à celles de l'adulte (V : Fig. 4). Cet effet inhibiteur de l'ibuprofène sur la vasorelaxation est renversé par le cotraitement avec un analogue de la PGD₂ (V : Fig. 4). Chez l'adulte traité avec la PGD₂, les réponses de vasorelaxation aux agents vasoactifs sont augmentées à celles du nouveau-né non-traité (V : Fig. 4).

Ainsi, ces études confirment que les niveaux élevés des PGs (notamment la PGE₂ et la PGD₂) en agissant via des récepteurs spécifiques (EP₃, DP) dans la régulation des NOS constitutives (n- et e-NOS) jouent un rôle important dans le contrôle du tonus vasomoteur.

Autorégulation

Durant une élévation de pression de perfusion, période où il y a une augmentation de l'apport d'oxygène, l'adulte est capable de limiter cet apport d'oxygène à la rétine grâce à une vasoconstriction adéquate de la choroïde (Yu, 1996). Cependant, chez le nouveau-né, l'apport d'oxygène demeure élevé puisque le débit sanguin choroïdien n'est pas autorégulé (Chemtob, 1991). Cette excès d'oxygène amené à la rétine peut résulter en la génération de métabolites de l'oxygène hautement réactifs qui peuvent être dommageables pour l'oeil et prédisposer au développement de la rétinopathie chez le nouveau-né (Shvedova, 1982; Flynn, 1992; McLeod, 1996). Donc, le débit sanguin choroïdien est autorégulé chez l'adulte (Kiel, 1992; Kiel, 1994; Yu, 1996), tandis que chez le nouveau-né, il ne l'est pas (Chemtob, 1991).

Puisque que le débit sanguin choroïdien du nouveau-né ne s'autorégule pas lors d'une augmentation de la pression de perfusion (Chemtob, 1991; Kiel, 1992; Kiel, 1994), et que l'absence d'autorégulation favorise une augmentation de l'activité de la eNOS (Hardy, 1996a; Hardy, 1996b) et des PGs (Abran, 1997; Hardy, 1998), nous avons examiné si l'action de la PGD₂ via son récepteur DP dans la régulation de la eNOS joue un rôle dans l'autorégulation des débits sanguins choroïdiens au niveau de la limite supérieure de la pression de perfusion oculaire (80 à 150 mmHg). Des porcelets traités avec un

inhibiteur de la COX (ibuprofène) ou d'un inhibiteur sélectif au récepteur DP (BW A868C) maintient constant le débit sanguin choroïdien sur un grand intervalle de pression de perfusion oculaire. L'effet de BW A868C sur le débit sanguin choroïdien est inversé par l'addition d'un analogue stable de la PGD₂; la choroïde du nouveau-né ne s'autorégule pas. L'addition d'un inhibiteur de la NOS, L-NMMA au cotraitement de l'ibuprofène et de la PGD₂ permet au débit sanguin choroïdien de demeurer constant au niveau de la limite supérieure de la pression de perfusion oculaire de 80 à 150 mm Hg (V : Fig. 5). Nos résultats laissent envisager que l'action des PGs via des récepteurs spécifiques contribuant à la régulation de l'expression des NOS constitutives joue un rôle important dans l'autorégulation des débits sanguins.

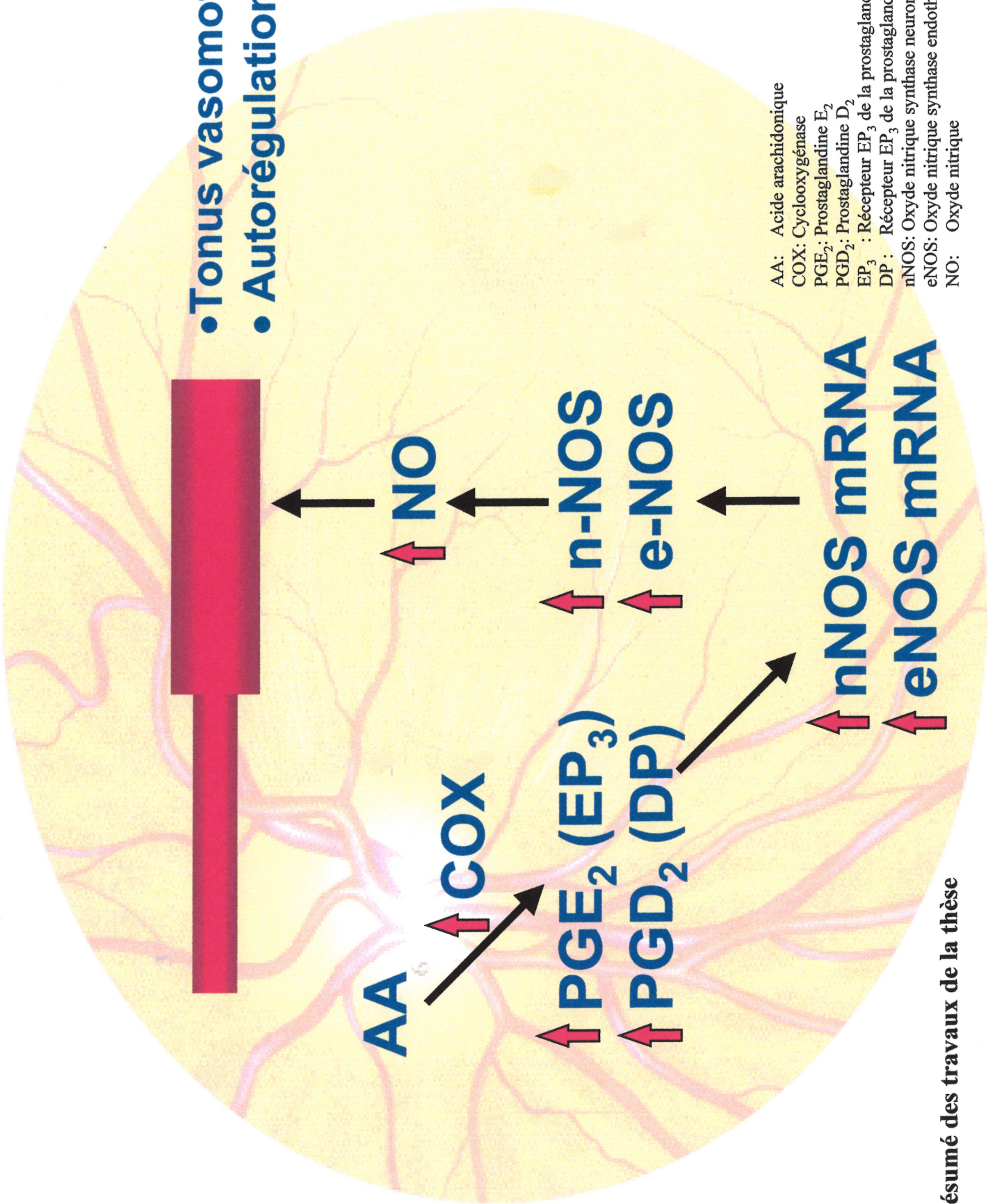
Les mécanismes d'actions possibles des prostaglandines dans la régulation des NOS constitutives

Bien que les mécanismes par lesquels les PGs régulent l'expression des NOS constitutives ne sont pas connus jusqu'à maintenant; certaines avancées peuvent être faites. Les gènes des NOS constitutives contiennent des sites de liaison pour les facteurs de transcription qui pourraient être activés par les PGs (Simonson, 1994; Weinreb, 1997; Paliogianni, 1994, 1996; Micali, 1996; Camandola, 1996). Par exemple, la PGE₂ en agissant via le récepteur EP₃ pourrait activer le facteur de transcription AP-1, lequel est régulé par la phosphorylation (Barchowski, 1995).

Des travaux récents faits dans notre laboratoire ont identifié la présence des récepteurs des PGs au niveau de l'enveloppe nucléaire dans de nombreux tissus et types cellulaires, lesquels jouent un rôle dans la

transcription des gènes (Bhattacharya, 1998; Bhattacharya, 1999). L'activation du récepteur EP₃ au niveau de noyaux isolés de cellules endothéliales de vaisseaux sanguins cérébraux, augmente la transcription des gènes de c-fos et iNOS, ainsi que la concentration intracellulaire de calcium. Il est possible, que des récepteurs EP₃ présents au niveau de la membrane nucléaire agissent sur la régulation de l'expression des NOS constitutives. En accord avec cette affirmation, la présence d'un transporteur des PGs (Kanai, 1995; Lu, 1996; Schuster, 1998) pourrait faciliter l'action intracellulaire des PGs au niveau du site nucléaire.

- Tonus vasomoteur
- Autorégulation



AA: Acide arachidomique
 COX: Cyclooxygénase
 PGE₂: Prostaglandine E₂
 PGD₂: Prostaglandine D₂
 EP₃ : Récepteur EP₃ de la prostaglandine E₂
 DP : Récepteur EP₃ de la prostaglandine E₂
 nNOS: Oxyde nitrique synthase neuronale
 eNOS: Oxyde nitrique synthase endothéliale
 NO: Oxyde nitrique

Figure 7. Résumé des travaux de la thèse

VII. APPLICATIONS CLINIQUES

Le NO est impliqué dans un grand nombre de fonctions physiologiques lors du développement du cerveau et de la vasculature incluant, la synaptogénèse, le raffinement des connexions, le tonus vasomoteur et le contrôle de la circulation sanguine. L'augmentation de NO durant la période périnatale pourrait être nécessaire afin de maintenir l'apport d'oxygène au cerveau du nouveau-né lorsque les contractions utérines lors du travail diminuent l'oxygénation foetale. De plus, le NO pourrait jouer un rôle chez le nouveau-né naît prématurément. La survie croissante du nouveau-né de très faible poids fait que ce dernier doit faire face à une pression sanguine augmentée, qui peut conduire à deux pathologies vasculaires importantes : l'hémorragie intraventriculaire et à la rétinopathie. Les répercussions de ces pathologies sont le retard mental, la paralysie cérébrale et plusieurs problèmes visuels incluant la cécité.

Étant donné l'importance de NO dans le développement du cerveau et de la vasculature, il est donc d'intérêt de comprendre les mécanismes de régulation de la NOS durant la période périnatale. Nos études ont démontré un rôle important des PGs dans la régulation des NOS constitutives durant la période périnatale, et que cette régulation par les PGs se manifeste dans des événements physiologiques importants tels le tonus vasomoteur et l'autorégulation. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation des NOS et particulièrement dans ce contexte via les PGs, peut éventuellement conduire à la prévention de certaines pathologies rencontrées chez le nouveau-né.

Du point de vue thérapeutique, nos résultats permettent de spéculer sur des considérations futures. L'inhibition des NOS avec des bloqueurs non sélectifs ou sélectifs des NOS constitutives n'est

probablement pas la solution idéale durant la période périnatale pour protéger le nouveau-né contre plusieurs contraintes. Le nouveau développement d'inhibiteurs pour la COX ou des récepteurs de PGs est encore plus prometteur.

VIII. DIRECTIONS FUTURES

Par les travaux de cette thèse, nous avons mis en évidence le rôle des PGs dans la modulation de l'expression des NOS constitutives dans la période périnatale ainsi que leurs conséquences physiologiques. Nos travaux ont montré que des PGs différentes, notamment la PGE₂ et la PGD₂ via des récepteurs spécifiques (EP₃ pour PGE₂ et DP pour PGD₂) exercent des effets sur la régulation à la hausse des NOS constitutives, au niveau cérébral (cerveau vaisseaux cérébraux) et périphérique (choroïde) respectivement. Cette régulation se manifeste dans des événements physiologiques importants dont le tonus vasomoteur et l'autorégulation.

Toutefois, les mécanismes par lesquels les PGs peuvent induire l'expression des NOS constitutives demeurent inconnus. Basé sur des évidences qui démontrent l'existence d'un transporteur des PGs et la présence des récepteurs des PGs au niveau de la membrane nucléaire, il est possible que des récepteurs nucléaires induisent la régulation de l'expression des NOS constitutives. Étant donné que le calcium nucléaire est impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions nucléaires dont entre autre, la régulation de l'expression des gènes, il est possible que des canaux ioniques nucléaires modulent l'entrée de calcium. Des changements dans la concentration du calcium nucléaire pourrait influencer la régulation de l'expression des NOS constitutives.

On sait que les niveaux des PGs synthétisés par la COX sont élevés durant la période périnatale, et que ceux-ci modulent l'expression des NOS constitutives; mais on ne sait pas ce qui est à l'origine de l'augmentation des PGs. Pour mieux comprendre l'origine de cette augmentation, il s'avère utile de regarder les précurseurs dans la biosynthèse des PGs.

Si les PGs stimulent l'expression des NOS constitutives durant la période périnatale, les NOS pourraient également réguler les PGs. Afin de vérifier cette hypothèse, on pourrait moduler de façon pharmacologique les NOS constitutives par des inhibiteurs ou des donneurs de NO.

Les résultats de ces recherches futures, combinés aux nôtres, permettront éventuellement une meilleure compréhension de la régulation des NOS constitutives durant la période périnatale.

IX. BIBLIOGRAPHIE :

Aaslid R, Lindegaard KF, Soeteberg W, Nornes H (1989) Cerebral autoregulation dynamics in humans. *Stroke* 20: 45-52.

Abramovitz M, Boie Y, Nguyen T, Rushmore TH, Bayne MA, Metters KM, Slipetz DM, Grygorczyk R (1994) Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J Biol Chem* 269: 2632-2636.

Abran D, Varma DR, Li DY, Chemtob S (1994) Reduced responses of retinal vessels of the newborn pig to prostaglandins but not to thromboxane. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 168-173.

Abran D, Li DY, Varma DR, Chemtob S (1995) Characterization and ontogeny of PGF_{2α} and PGE₂ receptors in the retinal vasculature of pigs. *Prostaglandins* 50: 253-268.

Abran D, Dumont I, Hardy P, Peri KG, Li DY, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S (1997) Characterization and regulation of prostaglandin E₂ receptor and receptor coupled functions in the choroidal vasculature of the pig during development. *Circ Res* 80: 463-472.

Adachi T, Inanami O, Sato A (1992) Nitric oxide (NO) is involved in increased cerebral cortical blood flow following stimulation of the nucleus basalis of Meynert in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 139: 201-204.

Adam M, Boie Y, Rushmore TH, Muller G, Bastien L, McKee K, Metters KM, Abramovitz M (1994) Cloning and expression of three isoforms of

the human EP₃ prostanoid receptor. *FEBS Lett* 338: 170-174.

Aeberhard EE, Henderson SA, Arabolos NS, Griscavage JM, Castro FE, Barret CT and Ignarro LJ (1995) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 208:1053-1059.

Akgoren N, Fabricius M, Lauritzen M (1994) Importance of nitric oxide for local increases of blood flow in rat cerebellar cortex during electrical stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5903-5907.

Alm A, Bill A (1972) The oxygen supply to the retina. I. Effects of changes in intraocular and arterial blood pressures, and in arterial PO₂ and PCO₂ on the oxygen tension in the vitreous body of the cat. *Acta Physiol Scand* 84: 261-274.

An S, Yang J, Goetzl EJ (1993) Cloning and expression of the EP₂ subtype of human receptors for prostaglandin E₂. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 263-270.

Andrew PJ, Mayer B (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Res* 43: 521-531.

Aoki C, Rhee J, Lubin M, Dawson TM (1997) NMDA-R1 subunit of the cerebral cortex co-localizes with neuronal nitric oxide synthase at pre- and postsynaptic sites and in spines *Brain Res* 750: 25-40.

Audoly L, Breyer RM (1997) The second extracellular loop of the prostaglandin EP₃ receptor is an essential determinant of ligand selectivity. *Mol Pharmacol* 51: 61-68.

Bandstra ES, Montalvo BM, Goldberg RN Pacheco I, Ferrer PL, Flynn J, Gregorios JB, Bancalari E (1988) Prophylactic indomethacin for prevention of intraventricular hemorrhage in premature infants. *Pediatrics* 82: 533-542.

Bastien L, Sawyer N, Grygorczyk R, Metters KM, Adam M (1994) Cloning functional expression and characterization of the human prostaglandin E₂ receptor EP₂ subtype. *J Biol Chem* 269: 11873-11877.

Baumbach GI, Heistad DD (1985) Regional, segmental, and temporal heterogeneity of cerebral vascular autoregulation. *Ann Biomed Eng* 13: 303-310.

Bhat GK, Mahesh VB, Lamar CA, Ping L, Aguan K, Brann DW (1995) Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and colocalization with N-methyl D-aspartate receptors. *Neuroendocrinology* 62: 187-197.

Bhattacharya M, Peri K, Ribeiro-da-Silva A, Almazan G, Schichi S, Hou X, Varma D, Chemtob S (1999) Localization of prostaglandin E₂ receptors EP₃ and EP₄ in the nuclear envelope. *J Biol Chem* 274: 15719-15724.

Bhattacharya M, Peri KG, Almazan G, Ribeiro-da-Silva A, Shichi H, Durocher Y, Abramovitz M, Hou X, Varma DR and Chemtob S (1998) Nuclear localization of prostaglandin E₂ receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15792-15799.

Boie Y, Sawyer N, Slipetz DM, Metters KM, Abramovitz M (1995) Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptors. *J Biol Chem* 270: 18910-18916.

Boie Y, Stocco R, Sawyer N, Slipetz DM, Ungrin MD, Neuschafer-Rube F, Puschel GP, Metters KM, Abramovitz M (1997) Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 340: 227-241.

Brannon TS, North AJ, Wells LB, Shaul PW (1994) Prostacyclin synthesis in ovine pulmonary artery is developmentally regulated by changes in cyclooxygenase-1 gene expression. *J Clin Invest* 93: 2230-2235.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P450 reductase. *Nature* 351:714-718.

Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH (1992) Nitric oxide synthase regulatory sites: phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase: identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 267: 10976-10981.

Bredt DS, Snyder SH (1994a) Nitric oxide: A physiological messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 63: 175-195.

Bredt DS, Snyder SH (1994b) Transient nitric oxide neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory bulb. *Neuron* 13:301-314.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS (1996a) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84: 757-767.

Brenman JE, Christopherson KS, Craven SE, McGee AW, Brecht DS (1996b) Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci* 16: 7407-7415.

Brenman JE, Brecht DS (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol* 7: 374-378.

Breyer RM, Emeson RB, Tarnig JL, Breyer MD, Davis LS, Abromson RM, Ferrenbach SM (1994) Alternative splicing generates multiple isoforms of a rabbit prostaglandin E2 receptor. *J Biol Chem* 269: 6163-6169.

Busija DW (1997) Eicosanoids and cerebrovascular control, in *Primer on Cerebrovascular Disease* (Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesj BK and Weir B eds) pp 93-96, Acad Press, New York.

Buttery LDK, Springall DR, Dacosta FAM, Oliveira H, Hislop AA, Haworth SG, Polak JM (1995) Early abundance of nerves containing NO synthase in the airways of newborn pigs and subsequent decrease with age. *Neurosci Lett* 201: 219-222.

Camandola S, Leonarduzzi G, Musso T, Varesio L, Carini R, Scavazza A, Chiarotto E, Baeuerle PA, Poli G (1996) Nuclear factor kB activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res*

Commun 229: 643-647.

Campbell WB (1990) Lipid-derived autocooids: eicosanoids and platelet activating factor. *In the Pharmacological Basis of Therapeutics* (Edited by Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P) p. 600. Pergamon Press, New York.

Crain B, Cotman C, Taylor D, Lynch G (1973) A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res* 63: 195-204.

Ceccatelli S, Grandison L, Scott RE, Pfaff DW, Kow LM (1996) Estradiol regulation of nitric oxide synthases mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 64: 357-363.

Chemtob S, Aranda JV, Varma DR (1989) Effects of prostaglandins on isolated internal carotid and basilar arteries from newborn and adult pigs. *Pediatr Rev Commun* 4: 101-109.

Chemtob S, Beharry K, Rex J, Varma DR, Chemtob S (1990) Changes in cerebrovascular prostaglandins and thromboxane, as a function of systemic blood pressure: Cerebral blood flow autoregulation of the newborn. *Circ Res* 67: 674-680.

Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, Aranda JV (1991) Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1799-1807.

Chemtob S, Li DY, Abran D, Hardy P, Peri KG, Varma DR (1996) The

role of prostaglandin receptors in regulating cerebral blood flow in the perinatal period. *Acta Paediatrica* 85: 517-524.

Chun JJM, Shatz CJ (1989) Interstitial cells of the adult neocortical white matter are the remnant of the early generated subplate neuron population. *J Comp Neurol* 282: 555-569.

Coleman RA (1987) in *Prostaglandins and related substances: a practical approach* Benedetto C, McDonald-Gibson RG, Nigam S, Slater TF, Eds. (IRL Press Ltd., Oxford, U.K) pp. 267-278.

Coleman RA, Kennedy I, Humphrey PPA, Bunce K, Lumley P (1990) in *Membranes and receptors* Sammes PG, Taylor JB, Eds. (Pergamon Press, Oxford, U.K) vol 3, pp. 644-714.

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S (1994) International Union of Pharmacology. Classification of prostanoid receptor: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46: 205-229.

Cramer KS, Sur M (1996) The role of NMDA and nitric oxide in retinogeniculate development. *Progress in Brain Res* 108: 235-244.

Danesch U, Weber P, Sellmayer A (1994) Arachidonic acid increases c-fos and Erg-1 mRNA in 3T3 fibroblasts by formation of prostaglandin E₂ and activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 269: 27258-27263.

Dawson TM, Snyder SH (1994) Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14: 5147-5159.

Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH (1994) Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4214-4218.

Dohlman HG, Thorner MG, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60: 653-688.

Eliasson MJ, Backshaw S, Schell MJ, Snyder SH (1997) Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localization in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3396-340.

Faraci FM, Brian JE (1994) Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 25: 692-703.

Flynn JT, Bancalari E, Snyder ES, Goldberg RN, Feuer W, Cassady, Schiffman J, Feldman HI, Bachynski B, Buckley E, Roberts J, Gilling D. (1992) A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 326: 1050-1054.

Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* 50: 1321-1332.

Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H (1998) Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS 1 and NOS III). *FASEB J* 12: 773-790.

Funk CD, Furci L, FitzGerald GA, Grygorczyk R, Rocette C, Bayne MA,

Abramovitz M, Adam M and Metters KM (1993) Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP₁ subtype. *J Biol Chem* 268:26767-26772.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 373-376.

Gaillard T, Mulsch A, Klein H and Decker K (1992) Régulation by prostaglandin E₂ of cytokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages. *Biol Chem* 373:897-902.

Galea E, Reis DJ, Xu H, Feinstein DL (1995) Transient expression of calcium-independent nitric oxide synthase in blood vessels during brain development. *FASEB J* 9: 1632-1637.

Garcia Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci* 93: 6448-6453.

Garcia Cardena G, Martasek P, Masters BS (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272: 25437-25440.

Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR (1993) Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 522-526.

Ghosh DK, Abu-Soud HM, Stuehr DJ (1996) Domains of macrophage NO synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. *Biochemistry* 35: 1444-1449.

Giles H, Leff P (1988) The biology and pharmacology of PGD₂. *Prostaglandins* 35: 277-300.

Gnanapandithen K, Chen Z, Kau CL, Gorczynski RM, Marsden PA (1996) Cloning and characterization of murine endothelial constitutive nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta* 1308: 103-106.

Goetz RM, Morano I, Calovini T, Studer R, Holtz J (1994) Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 905-910.

Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA (1994) Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS 1). *J. Biol Chem* 269: 33082-33090.

Hardy P, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, Chemtob S (1996a) Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interactions with prostaglandins. *Pediatr Res* 39: 487-493.

Hardy P, Peri KG, Lahaie I, Varma DR, Chemtob S (1996b) Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circ Res* 79: 504-511.

Hardy P, Varma DR, Chemtob S (1997) Control of cerebral blood flow

and ocular blood flow autoregulation in neonates. In: Koren G, Bailey B, ed. *Pediatric Clinic of North America: New Frontiers in Pediatric Drug Therapy* : Philadelphia: W.B. Saunders.

Hardy P, Bhattacharya M, Abran D, Peri KG, Asselin P, Varma DR, Chemtob S (1998) Increases in retinovascular prostaglandin receptor functions by cyclooxygenase-1 and -2 inhibition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1888-1898.

Hayashi S, Park MK, Kuehl TJ (1985) Relaxant and contractile responses for prostaglandins in premature, newborn, and adult baboon cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 233: 628-635.

Hellerman GR, Solomonson LP (1997) Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272: 12030-12034.

Hirata M, Kakizuka A, Aizawa M, Ushikubi F, Narumiya S (1994) Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11192-11196.

Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa (1999) Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP (2) *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10501-10506.

Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Watabe A, Irie A, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A (1993) Cloning and expression of a cDNA for

mouse prostaglandin E receptor EP₂ subtype. *J Biol Chem* 266: 7759-7762.

Huang C, Tai HH (1995) Expression and site-directed mutagenesis of mouse prostaglandin E2 receptor EP3 subtype in insect cells *Biochem J* 307: 493-498.

Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH, Fishman MC (1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75: 1273-1286.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995a) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242.

Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1994) Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265: 1883-1885.

Hutchinson AA, Ogletree MI, Palmer CJH (1985) Plasma 6-keto-PGF_{1a} and thromboxane B₂ in sick pre term neonates. *Prostaglandins Leuko Med* 18: 163-181.

Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA (1994) Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 175-192.

Irikura K, Huang PL, Ma J, Lee WS, Dalkara T, Fishman MC, Dawson TM, Snyder SH, Moskowitz MA (1995) Cerebrovascular alterations in mice lacking neuronal nitric oxide synthase gene expression *Proc Nat*

Acad Sci USA 92: 6823-6827.

Ito S, Narumiya S, Hayaishi O (1989) Prostaglandin D₂: a biochemical perspective. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 37: 219-234.

Jacot JL, O'Neill JT, Scnadling DM, West SD, McKenzie JE (1998) Nitric oxide modulation of retinal, choroidal, and anterior uveal blood flow in newborn piglets. *J Ocul Pharmacol Ther* 14: 473-489.

Jaffrey SR, Snowman AM, Eliasson MJ, Cohen NA, Snyder SH (1998) CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron* 20: 115-124.

Jaffrey SR, Snyder SH (1996) PIN: an associated protein inhibitor neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1996: 274: 774-77.

Jansen I, Alafaci C, Culloch J, Uddman R, Edvinsson L (1991) Tachykinins (substance P and neurokinin B) in the cerebral cortex circulation: Vasomotor responses in vitro and in situ. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 567-575.

Janssens SP, Shimouchi A, Quetermous T, Bloch DB, Bloch KD (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 14519-14522.

Johnson PC (1980) The myogenic response., in Bohr DF, Somlyo AP, Sparks H (eds) *Handbook of Physiology: The Cardiovascular System*. Baltimore, Waverley Press. pp 409-442.

Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW and Schuster VL

(1995) Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 268:866-869.

Katoh H, Negishi M, Ichikawa A (1996) Prostaglandin E receptor EP₃ subtype induces neurite retraction via small GTPase Rho. *J Biol Chem* 271: 29780-29784.

Katsuyama T, Nishigaki N, Sugimoto Y, Morimoto K, Negishi M, Narumiya S and Ichikawa A (1995) The mouse prostaglandin E receptor EP₂ subtype: cloning expression and Northern blot analysis. *FEBS Lett* 372:151-156.

Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P (1996) 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.

Keilhoff G, Seidel B, Noack H, Tischmeyer W, Stanek D, Wolf G (1996) Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. *Neuroscience* 75: 1193-1201.

Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S, Guan Y, Coffee K, Funk CD, Magnuson MA, Oates JA, Breyer MD, Breyer RM (1999) Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP₂ receptor. *Nat Med* 5: 217-220.

Kerwin JF, Lancaster JR, Feldman PL (1995) Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 38: 4343-4362.

Kiel JW, Shepherd AP (1992) Autoregulation of choroidal blood flow in

the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2399-2410.

Kiel JW (1994) Choroidal myogenic autoregulation and intraocular pressure. *Exp Eye Res* 58: 529-544.

Klatt P, Pfeiffer S, List BM, Lehner D, Glatter O, Bachinger HP, Werner ER, Schmidt K, Mayer B (1996) Characterization of heme-deficient neuronal nitric oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 271: 7336-7342.

Kornau HC, Seeburg PH, Kennedy MB (1997) Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain protein. *Curr Opin Neurobiol* 7: 368-373.

Knowles RG (1994) Nitric oxide synthases in mammals (1994) *Biochem J* 298: 249-258.

Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston, Sugar-Bajer D, Stamler JS (1993) Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 371-377.

Kontos HA, Wei EP, Kukreja RC, Ellis EF, Hess ML (1990) Differences in endothelium-dependent cerebral dilatation by bradykinin and acetylcholine. *Am J Physiol* 258: H1261-H1266.

Kotani M, Tanaka I, Ogawa Y, Usui T, Tamura N, Mori K, Narumiya S, Yoshimi T, Nakao K (1997) Structural organization of the human prostaglandin EP3 receptor subtype gene. *Genomics* 40: 425-434.

Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum B, Lim RW, Herschman (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266: 12866-12872.

Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T (1992) Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6348-6352.

Lancaster JR (1994) Stimulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8137-8141.

Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW (1997) Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 17: L119-L126.

Laubach VE, Sheseley EG, Smithies O, Sherman PA (1995) Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10688-10692.

Leffler CW, Armstead WM and Shibata M (1993) Role of eicosanoids in cerebral hemodynamics, in *Regulation of Cerebral Blood Flow* (Phyllis JW ed) pp 297-313, CRC Press, Boca Raton.

Leffler CW, Busija DW (1985a) Prostanoids in cortical subarachnoid cerebrospinal fluid and pial arterial diameter in newborn pigs. *Circ Res* 57: 689-694.

Leffler CW, Busija DW (1985b) Arachidonate metabolism on the

cerebral surface of newborn pigs. *Prostaglandins* 30: 811-817.

Leffler CW, Busija DW, Beasley DG, Fletcher M (1986) Maintenance of cerebral circulation during hemorrhagic hypotension in newborn pigs: Role of prostanoids. *Circ Res* 59: 562-567.

Leffler CW, Busija DW (1987) Prostanoids and pial arteriolar diameter in hypotensive newborn piglets. *Am J Physiol* 252: H687-H691.

Lennon AM, Francon J, Fellous A, Nunez J (1980) Rat, mouse, and guinea pig brain development and microtubule assembly. *J Neurochem* 35: 804-815.

Li D-Y, Abran D, Peri KG, Varma DR, Chemtob S (1996) Inhibition of prostaglandin synthesis in newborn pigs increases cerebral microvessel PGE₂ and PGF_{2 α} receptors, their second messengers and vasoconstrictor response to adult levels. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 370-377.

Li DY, Hardy P, Abran D, Martinez-Bermudez AK, Guerguerian AM, Bhattacharya M, Almazan G, Menezes R, Peri KG, Varma DR, Chemtob S (1997) Key role for cyclooxygenase-2 in PGE₂ and PGF_{2 α} receptor regulation and cerebral blood flow of the newborn. *Am J Physiol* R1287-R1290.

Lizasoain I, Weiner CP, Knowles RG, Moncada S (1996) The ontogeny of cerebral and cerebellar nitric oxide synthase in the guinea pig and rat. *Pediatr Res* 39: 779-783.

Lo EH, Hara H, Rogowska J, Trocha M, Pierce AR, Huang PL, Fishman MC, Wolf GL, Moskowitz MA (1996) Temporal correlation mapping

analysis of the hemodynamic penumbra in mutant mice deficient in endothelial nitric oxide synthase gene expression. *Stroke* 27: 1381-1385.

Lu R, Kanai N, Bao Y and Schuster VL (1996) Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA (hPGT). *J Clin Invest* 98:1142-1149.

MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N (1995) Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81: 641-650.

MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, Shaul PW (1997) Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res* 81: 355-362.

Marotta P, Sautebin L, and Rosa MDi (1992) Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line. *Br J Pharmacol* 107:640-641.

Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268: 17478-17488.

McGowan JE, McGowan JC III, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (1994) Effect of cyclooxygenase inhibition on brain cell membrane lipid peroxidation during hypoxia in newborn piglets. *Biol Neonate* 66:367-375.

McLeod DS, Brownstein R and Luty GA (1996) Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 300-311.

Meng W, Ma J, Ayata C, Hara H, Huang PL, Fishman MC, Moskowitz MA (1996) Acetylcholine dilates pial arterioles in endothelial and neuronal nitric oxide synthase knockout mice by nitric oxide-dependent mechanisms. *Am J Physiol* 271: H1145-H1150.

Ment LR, Duncan CC, Ehrenkranz RA, Kleinman CS, Taylor KJ, Scott DT, Gettner P, Sherwonit E, Williams J (1988) Randomized low-dose indomethacin trial for prevention of intraventricular hemorrhage in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 112: 948-955.

Ment LR, Oh W, Ehrenkranz RA, Phillip AG, Vohr B, Allan W, Makuch RW, Taylor KJ, Schneider KC, Katz KH (1994) Low dose indomethacin and prevention of intraventricular hemorrhage: A multicenter trial. *Pediatrics* 93: 543-550.

Micali A, Medici N, Sottile A, Venza M, Venza I, Nigro V, Puca GA, Teti D (1996) Prostaglandin E₂ induction of binding activity to CRE and AP-2 elements in human T lymphocytes. *Cell Immunol* 174: 99-105.

Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, D'Agostino P, De Nucci G, Cillari E (1995) Prostaglandin E₂ regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins* 49: 105-115.

Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, Créminon C, Maclouf J, Levi G (1997) Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat

microglial cultures is downregulated by exogenous prostaglandin E₂ and cyclooxygenase inhibitors. *Glia* 19: 152-160.

Mitchell MD, Lucas A, Etches PC, Brunt JD, Turnbull AC (1978) Plasma prostaglandin levels during early neonatal life following term and preterm delivery. *Prostaglandins* 16: 319-326.

Mitrovic N, Schachner M (1996) Transient expression of NADPH diaphorase activity in the mouse whisker to barrel field pathway. *J Neurocyt* 25: 429-435.

Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, Hattori R, Aoyama T, Yamamoto Y, Doi Y, Ogoshi S, Hashimoto K, Kawai C, Sasayama S, Shizuta Y (1994) Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Eur J Biochem* 223: 719-726.

Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn K, Clapp WI, Wilcox CS, Kone BC (1994) Differential expression and induction of mRNA encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int* 46: 653-665.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1990) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.

Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012.

Moncada S (1997) Nitric oxide in the vasculature: Physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 811: 60-67.

Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL (1995) Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270: 10902-10908.

Morris SM, Billiar TR (1994) New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J Physiol* 266: E829-839.

Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O (1976) Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 251: 2629-2636.

Myers PR, Minor RL Jr, Guerra RJ, Bates JN, Harrison DG (1990) Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345: 161-163.

Myers SI, Turnage RH, Bartula L, Kalley B, Meng Y (1996) Estrogen increases male rat aortic endothelial (RAEC) PGI₂ release. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 54: 403-409.

Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 1396-1402.

Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 316: 175-180.

Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, Irie A, Ushikubi F, Kakizuka A, Ito

A, Ichikawa A, Narumiya S (1993) Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP₃ determines G-protein specificity. *Nature* 365: 166-170.

Namba T, Oida H, Sugimoto Y, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A (1994) cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem* 269: 9986-9992.

Narumiya S (1996) Prostanoid receptors and signal transduction. *Prog Brain Res* 113: 231-241.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties and function. *Physiological Reviews* 79: 1193-1225.

Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A (1993a) Prostanoid receptors and their biological actions. *Prog Lipid Res* 32: 417-434.

Narumiya Y, Sugimoto Y, Ushikubi, F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79: 1193-1226.

Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa (1993) Prostanoid receptors and their biological actions. *Prog Lipid Res* 32: 417-432.

Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A (1995) Prostaglandin E receptors *J Lipid Mediat Cell Signal* 12: 379-391.

Neugarten J, Ding Q, Friedman A, Lei J, Silbiger S (1997) Sex hormones and renal nitric oxide synthases. *J Am Soc Nephrol* 8: 1240-1246.

Neuschafer-Rube F, Hanecke K, Blascheke V, Jungermann K, Puschel GP (1997) The C-terminal domain of the Gs-coupled EP₄ receptor confers agonist dependent coupling to control to Gi but no coupling to Gs in a receptor hybrid with the Gi-coupled EP₃ receptors. *FEBS Lett* 401: 185-190.

Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert JN, Hicks E, Coffman TM, Anderson PA, Malouf NN, Koller BH (1997) The prostaglandin receptor EP₄ triggers remodeling of the cardiovascular system at birth. *Nature* 390: 78-81.

Nielsen PJ, Nyborg NCB (1990) Contractile and relaxing effects of arachidonic acid derivative on isolated bovine retinal resistance arteries. *Exp Eye Res* 50: 305-311.

North AJ, Star RA, Brannon TS, Ujiie K, Wells LB, Lowenstein CJ, Snyder SH, Shaul PW (1994) Nitric oxide synthase type 1 and type III gene expression are developmentally regulated in rat lung. *Am J Physiol* 266: L635-L641.

Northington FJ, Koehler RC, Traystman RJ, Martin LJ (1996) Nitric oxide synthase 1 and nitric oxide synthase 3 protein expression is regionally and temporally regulated in fetal brain. *Dev Brain Res* 95: 1-14.

Northington FJ, Tobin JR, Harris AP, Traystman RJ and Koehler RC (1997) Developmental and regional differences in nitric oxide activity and blood flow in the sheep brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:109-115.

O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel

ER, Fishman MC (1994) Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 265: 542-546.

Ohashi Y, Kawashima S, Hirata Ki, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, Sakoda T, Kurihara H, Yazaki Y, Yokoyama Y (1998) Hypotension and reduced nitric oxide elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 102: 2061-2071.

Ogilvie O, Schilling K, Billingsley M, Schmidt H (1995) Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type 1 during synaptogenesis. *FASEB* 9: 799-806.

Ogura T, Yokoyama T, Fujisawa H, Kurashima Y, Esumi H (1993) Structural diversity of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun Res Commun* 193: 1014-1022.

Okuda-Ashitaka E, Sakamoto K, Ezashi T, Miwa K, Ito S and Hayaishi O (1996) Suppression of prostaglandin E receptor signaling by the variant form of EP₁ subtype. *J Biol Chem* 271:31255-31261.

Paliogianni F, Boumpas DT (1994) Prostaglandin E₂ inhibits the nuclear transcription of the 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.

Paliogianni F, Hama N, Mavrothalassitis GJ, Thyphronitis G, Boumpas DT (1996) Signal requirements for interleukin 4 promoter activation in human T cells. *Cell Immunol* 168: 33-38.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.

Park MK, Kuehl TJ, Hayashi S (1987) Differential effects of prostaglandins on mesenteric and cerebral arteries isolated from premature newborn baboons. *Eur J Pediatr* 146: 61-62.

Peri KG, Hardy P, Li DY, Varma DR and Chemtob S (1995) Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem* 270:24615-24620.

Perlman JM, Goodman S, Kreusser KL, Volpe JJ (1985) Reduction in intraventricular hemorrhage by elimination of fluctuating cerebral blood flow velocity in preterm infants with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 313: 1353-1357.

Pickard J, Tamura A, Stewart M, McGeorge A, Fitch W (1980) Prostacyclin, indomethacin and the cerebral circulation. *Brain Res* 197: 425-431.

Pierce KL, Gil DW, Woodward DF, Regan JW (1995) Cloning of human prostanoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16: 253-256.

Ponting CP, Phillips C, Davies KE, Blake DJ (1997) PDZ domains targeting signalling molecules to sub membranous sites. *Bioassays* 19: 469-479.

Prado R, Watson BD, Kuluz J and Dietrich WD (1992) Endothelium-

derived nitric oxide synthase inhibition: Effects on cerebral blood flow, pial diameter artery, and vascular morphology in rat. *Stroke* 8:1118-1123.

Presta A, Siddhanta U, Wu C, Sennequier N, Huang L, Abu-Soud HM, Erzurum S, Stuehr DJ (1998) Comparative functioning of dihydro- and tetrahydrobiopterins in supporting electron transfer, catalysis and subunit dimerization in inducible NO synthase. *Biochemistry* 37: 298-310.

Raddasi K, Petit JF and Lemaire S (1993) LPS-induced activation of primed murine peritoneal macrophages is modulated prostaglandins and cyclic nucleotides. *Cell Immunol* 149:50-64.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S (1990) Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 10043-10047.

Rao CV, Mitra S (1979) Gonadotropin and prostaglandins binding sites in nuclei of bovine corpora lutea. *Biochim Biophys Acta* 584: 454-466.

Raszkievicz JL, Linville DG, Kerwin JF, Wagenaar F, Arneric SP (1992) Nitric oxide synthase is critical in mediating basal forebrain regulation of cortical cerebral circulation. *J Neurosci Res* 33: 129-135.

Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, Fairbairn CE, Kedzie KM, Woodward DF, Gil DW (1994) Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP₂ subtype. *Mol Pharmacol* 46: 213-220.

Renaud JP, Boucher JL, Vadon S, Delaforge M, Mansuy D (1993)

Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of N^ω-hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in NO synthases of a sequence very similar to the heme-binding sequence in P450s. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 53-60.

Riche D, Foutz AS, Denavitsaubie M (1995) Developmental changes of NADPH-diaphorase neurons in the forebrain of neonatal and adult cat. *Dev Brain Res* 89: 139-145.

Robinson F, Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL, Sinclair SH (1986) Retinal blood flow autoregulation in response to an acute increase in blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 722-726.

Rosenblum WI, Shimizu T, Nelson GH (1993) Endothelium-dependent effects of substance P and calcitonin gene related peptide on mouse pial arterioles. *Stroke* 24: 1043-1048.

Roskams AJ, Bredt DS, Dawson TM, Ronnet GV (1994) Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. *Neurons* 13 : 289-299.

Samama B, Chateau D, Boehm N (1995) Expression of NADPH diaphorase in the rat forebrain during development. *Neurosci Lett* 184: 204-207.

Sando T, Usui T, Tanka I, Mori K, Sasaki Y, Fakuda Y, Namba T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Narumiya S, Nakao K (1994) Molecular cloning and expression of rat prostaglandin E receptor EP₂ subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1329-1333.

Savarese TM, Fraser CM (1992) In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J* 283: 1-19.

Schepens J, Cuppen E, Wieringa B, Hendriks W (1997) The neuronal nitric oxide synthase PDZ motif binds to -G(D,E) XV carboxyterminal sequences. *FEBS Lett* 409: 53-56.

Schievella AR, Regier MK, Smith WL, Lin LL (1995) Calcium mediated translocation of cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 30749-30754.

Schuster VL (1998) Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* 60:221-242.

Sessa WC (1994) The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 31: 131-143.

Shvedova AA, Alekseeva OM, Kuliev IYA (1982) Damage of photoreceptor membrane lipids and proteins induced by photosensitized generation of singlet oxygen. *Curr Eye Res* 2: 683-689.

Sennequier N, Stuehr DJ (1996) Analysis of substrate-induced electronic, catalytic, and structural changes in inducible NO synthase. *Biochemistry* 35: 5883-5892.

Sessa WC, Garcia Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock JS, Bradley J, Thiru S, Braverman IM, Desai KM (1995) The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 270: 17641-17644.

Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ (1992) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267: 15274-15276.

Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ (1996) Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271: 6518-6522.

Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O (1995) Elevated blood pressure in mice lacking the gene for endothelial NOS. *Nature* 373: 13176-13181.

Silvagno F, Xia H, Bredt DS (1996) Neuronal nitric oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 271: 11204-11208.

Simonson MS, Herman WH, Dun MJ (1994) PGE₂ induces c-fos expression by a cAMP-independent mechanism in glomerular mesangial cells. *Exp Cell Res* 215: 137-144.

Smith WL, Garavito M, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271: 33157-33160.

Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL (1998) Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 273: 9886-9893.

Stuehr DJ (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthases.

Ann Rev Pharmacol Toxicol 37: 339-359.

Suba EA, Roth BL (1987) Prostaglandins activate phosphoinositide metabolism in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 136: 325-332.

Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi T, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S (1993) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₃ subtype. *J Biol Chem* 267: 6463-6466.

Suzuki N, Gotoh F, Gotoh J et al (1991) Evidence for in vivo cerebrovascular neurogenic vasodilatation in the rat. *Clin Auton Res* 1: 23-26.

Symon L, Dorsch NWC (1973) A study of regional autoregulation in the cerebral circulation to increased perfusion pressure in normocapnia and hypercapnia. *Stroke* 4: 139-147.

Tacheuki K, Abe T, Takahashi N, Abe K (1993) Molecular cloning and intrarenal localization of rat prostaglandin E₂ receptor EP₃ subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 885-891.

Tesuka T, Daphna-Iken D, Srivastava SK, Baier LD, DuMaine J, Morrison AR (1994) Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: Prostaglandin E₂ negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12168-12172.

Tilley SL, Audoly LP, Hicks EH, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, Koller BH (1999) Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the prostaglandin EP₂ prostaglandin E₂ receptor. *J Clin Invest* 103: 1539-1545.

Toh H, Ichikawa A, Narumiya S (1995) Molecular evolution of receptors for eicosanoids. *FEBS Lett* 361: 17-21.

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

Van Der Ouderra FJ, Buytenhek M, Nugteren DH, Van Dorp DA (1977) Purification and characterization of prostaglandin synthetase from sheep vesicular glands. *Biochem Biophys Acta* 487: 315-331.

Van Eden CG, Steinbusch HWM, Rinkens A, De Vente J (1996) Developmental pattern of NADPH diaphorase activity and nitric oxide stimulated cGMP immunoreactivity in the frontal rat cortex and its role in functional recovery from aspiration lesions. *J Chem Neuroanat* 10: 279-286.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 97-120.

Vasseaux G, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R (1992) Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation; its dual role as a cAMP- and Ca(2+)-elevating agent. *J Biol Chem* 267: 11092-11097.

Venema RC, Nishida K, Alexander RW, Harrison DG, Murphy TJ (1994) Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta* 1218: 413-420.

Venema RC, Sayegh HS, Kent JD, Harrison DG (1996) Identification,

characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases *J Biol Chem* 271: 6435-6440.

Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JM, Venema VJ (1997a) Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem* 272: 1276-1282.

Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC (1997b) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding /inhibitory domain. *J Biol Chem* 272: 28187-28190.

Wagerle LC, Kumar SP, Delivoria-Papadopoulos M (1986) Effect of sympathetic nerve stimulation on cerebral blood flow in newborn piglets. *Pediatr Res* 20: 131-135.

Wagerle LC, Moliken W, Russo P: Nitric oxide and beta-adrenergic mechanisms modify contractile response to norepinephrine in ovine fetal and newborn cerebral arteries. *Pediatr Res* 38: 237-242.

Wang Y, Marsden PA (1995) Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Advances in Pharmacology* 34: 71-90.

Wang Y, Newton DC, Marsden PA. (1999) Neuronal NOS: Gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Critical Reviews in Neurobiology* 13: 21-43.

Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S,

Narumiya S, Ichikawa A (1993) Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* 268: 20175-20178.

Wei XQ, Charles IG, Smith A., Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375: 408-411.

Weiner CP, Knowles RG, Moncada S (1994) Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 171: 838-843.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994a) Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5212-5216.

Weinreb M, Rutledge SJ, Rodan GA (1997) Systemic administration of an anabolic dose of prostaglandin E2 induces early-response genes in rat bones. *Bone* 20: 347-353.

White RP, Hagen AA (1982) Cerebrovascular actions of prostaglandins. *Pharma Ther* 18: 313-331.

Wu HH, Williams CV, McLoon SC (1994) Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development. *Science* 265: 1593-1596.

Williams CV, Nordquist D, McLoon SC (1994) Correlation of nitric oxide synthase expression with changing patterns of axonal projections in the developing visual system. *J Neurosci* 14: 1746-1755.

Wise H, Jones RL (1996) Focus on prostacyclin and its novel mimetics. *Trends Pharmacol Sci* 17: 17-21.

Wu HH, Waid DK, Mcloon SC (1996) Nitric oxide and the developmental remodeling of retinal connections in the brain. *Progress in Brain Res* 108: 273-286.

Xiao Z, Zhang Z, Diamond SL (1997) Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium activated. *J Cell Physiol* 171: 205-211.

Xu DL, Martin PY, St John J, Tsai P, Summer SN, Ohara M, Kim JK, Schrier RW (1996) Upregulation of endothelial and neuronal constitutive nitric oxide synthase in pregnant rats. *Am J Physiol* 271: R1739-R1745.

Yagamata K, Andreasson KI, Kaufman CA, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11: 371-386.

Yagamata K, Andreasson KI, Kaufman WE, Barnes CA (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons; regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11: 371-386.

Yu DY, Cringle SJ, Alder VA, Su E-N, Yu PK (1996) Intraretinal oxygen distribution and choroidal regulation in the avascular retina of guinea pigs. *Am J Physiol* 270: H965-H973.

Zhang J, Snyder SH (1995) Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 213-233.

Zhang J, Patel JM, Block ER (1997) Molecular cloning, characterization and expression of a nitric oxide synthase from porcine pulmonary artery endothelial cells. *Comp Biochem Physiol* 116: 485-491.

X. CURRICULUM VITAE

Najarian T, Marrache AM, **Dumont I**, Hardy P, Beauchamp M, Hou X, Peri KG, Gobeil F Jr, Varma DR, Chemtob S (2000) Prolonged hypercapnia -evoked cerebral hyperemia via K^+ channel and PGE_2 dependent endothelial nitric oxide synthase induction *Circ Res* (sous presse)

Hardy P, **Dumont I**, Bhattacharya M, Hou X, Lachapelle P, Varma DR, Chemtob S (2000) Oxydants, nitric oxide and prostanoids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy. *Cardiovasc Res* 47: 489-509. Review.

Dumont I, Hardy P, Peri KG, Hou X, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S (2000) Regulation of endothelial nitric oxide synthase by PGD_2 in the developing choroid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H60-66.

Dumont I, Hou X, Hardy P, Peri KG, Beauchamp M, Najarian T, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S (1999) Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vessels of newborn pig by prostaglandin E_2 . *J Pharmacol Exp Ther* 291: 627-633.

Hardy P, Nuyt AM, **Dumont I**, Peri KG, Hou X, Varma DR, Chemtob S (1999) Developmentally increased cerebrovascular NO in newborn pigs curtails cerebral blood flow autoregulation. *Pediatr Res* 46: 375-382.

Fortin S, Chabli A, **Dumont I**, Shumikhina S, Itaya SK, Molotchnikoff S (1999) Maturation of visual receptive field properties in the rat superior colliculus. *Brain Res Dev Brain Res* 112: 55-64.

Dumont I, Peri KG, Hardy P, Hou X, Martinez-Bermudez AK, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S (1998) PGE₂, via EP₃ receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period. *Am J Physiol* 275: R1812-R1821.

Abran D, **Dumont I**, Hardy P, Peri KG, Li DY, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S (1997) Characterization and regulation of prostaglandin E₂ receptor and receptor-coupled functions in the choroidal vasculature of the pig during development. *Circ Res* 80: 463-472.