

Université de Montréal

Interactions entre le thromboxane A₂, le facteur d'activation plaquettaire et le monoxyde d'azote dans la rétinopathie induite par l'oxygène chez le rat nouveau-né : implications dans la rétinopathie du prématuré

par
Martin Beauchamp

Département de pharmacologie
Faculté de médecine

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

Décembre 2004

© Martin Beauchamp, 2004



W
4
U58
2005
v.127

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Interactions entre le thromboxane A₂, le facteur d'activation plaquettaire et le monoxyde d'azote dans la rétinopathie induite par l'oxygène chez le rat nouveau-né : implications dans la rétinopathie du prématuré

présentée par :

Martin Beauchamp

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Eric Thorin
président rapporteur

Dr Sylvain Chemtob
directeur de recherche

Dr Ghassan Cordahi
membre du jury

Dr Haroutioun Hasséssian
examineur externe

Dr André Tremblay
représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Introduction : La vaso-oblitération est un aspect important de la rétinopathie induite par l'oxygène (OIR), un modèle de rétinopathie du prématuré. Le stress oxydant amène une synthèse abondante du thromboxane A₂ (TXA₂) et du facteur d'activation plaquettaire (PAF). De plus, durant la période périnatale, l'activité et l'expression des synthases de monoxyde d'azote (NOS) sont augmentées. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le TXA₂ et le PAF de même que la présence d'un stress nitrosatif puissent contribuer à la vaso-oblitération en causant directement la mort des cellules endothéliales (EC) rétiniennes.

Méthodes: Les expériences *in vivo* ont été faites en utilisant le modèle de OIR chez le rat nouveau-né. L'adénosine diphosphatase a été effectuée afin de quantifier la vascularisation rétinienne d'animaux traités avec différents antagonistes des récepteurs PAF et TP, de même qu'avec des inhibiteurs de NOS et des désactiveurs d'espèces oxygénées réactives (ROS). L'état redox de la rétine a été évalué en mesurant le glutathion réduit (GSH) et les produits du stress oxydant et nitrosatif, malondialdéhyde (MDA) et nitrotyrosine. Les expériences *ex vivo* ont été faites sur des microvaisseaux rétiniens de rats nouveau-nés et de porcelets, alors que les expériences *in vitro* ont été faites à l'aide de cultures de ECs provenant de microvaisseaux cérébraux porcins et humains. La viabilité cellulaire a été mesurée par la réduction du MTT par les cellules viables. La mort cellulaire a été étudiée par incorporation d'iodure de propidium (PI), essai TUNEL, relâche de LDH et utilisation d'inhibiteurs de caspases.

Résultats : La vaso-oblitération induite par l'oxygène est associée à une génération de TXA₂ et de PAF qui est prévenue par un inhibiteur de TX synthase ou un antagoniste de

TX synthase, mais aussi par un antagoniste du récepteur PAF. Les analogues de TXA₂ et PAF causent une mort en fonction de la dose et du temps des cellules endothéliales rétiniennes et cérébrales du raton et du porcelet, mais pas des autres types cellulaires. La mort induite par le PAF est précédée d'une augmentation des niveaux de TXA₂ et est prévenue par l'inhibition de la TX synthase. La eNOS, mais pas nNOS ou iNOS, a une activité et une expression augmentées durant la durée de l'hyperoxie. Ces changements sont associés à court terme (2 jours d'hyperoxie) avec une chute des niveaux de GSH et une augmentation de MDA et nitrotyrosine. Des bloqueurs de NOS et des antioxydants empêchent presque entièrement la vaso-oblitération. En revanche, durant une hyperoxie de 5 jours, alors que l'état redox revient vers un état réduit, le bloqueur de NOS aggrave la vaso-oblitération. L'expression de VEGFR-2 est respectivement augmentée à court terme et diminuée à plus long terme par l'inhibition de NOS. La mort cellulaire présente une forte incorporation de PI et une relâche de LDH se produisant tardivement (~18-24 h).

Conclusion : Ces résultats mettent en évidence un nouveau rôle pour le TXA₂ dans la vaso-oblitération induite par l'oxygène. Le TXA₂ et le PAF, par une synthèse de TXA₂, sont capables de déclencher directement et sélectivement la mort des cellules endothéliales rétiniennes et cérébrales. Le NO présente un effet biphasique sur la vascularisation rétinienne, dépendant de l'abondance des ROS produits par l'hyperoxie et la synthèse de TXA₂-PAF, qui selon l'état redox de la rétine favorise ou non la survie cellulaire par l'intermédiaire de l'expression de VEGFR-2. La mort cellulaire étudiée semble être intermédiaire entre l'apoptose et la nécrose.

Mots clés : vaso-oblitération, endothélium, rétine, nécrose, apoptose, peroxydation, synthèse du monoxyde d'azote, superoxyde, peroxynitrite, VEGF.

SUMMARY

Background : Vasoobliteration is an important event in oxygen-induced retinopathy (OIR), a model of retinopathy of prematurity. Because oxidant stress abundantly generates thromboxane A₂ (TxA₂) and platelet activating factor (PAF), and because nitric synthase (NOS) activity and expression is augmented during the perinatal period, we tested whether these vasoconstrictors and nitrosative stress play a role in retinal vasoobliteration of OIR and contribute to such vascular degeneration by direct endothelial cytotoxicity.

Methods : *In vivo* experiments were done using the rat pup model of OIR. Retinovascular density was calculated using the adenosine diphosphatase technique in animals treated with distinct TxA₂ and PAF receptor blockers as well as different NOS blockers and free radical scavengers. The redox state of the retina was assessed by measuring reduced glutathione (GSH), and oxidative and nitrosative products malondialdehyde (MDA) and nitrotyrosine. *Ex vivo* experiments were done on freshly isolated retinal microvessels from newborn rat and piglet. *In vitro* experiments were done using ECs cultures from brain microvessels of piglets and humans in response to stable TxA₂ and PAF analogues. ECs viability was determined by the reduction of the tetrazolium salt MTT by viable cells. Incorporation of propidium iodide (PI), TUNEL assay, release of LDH, caspase activation and phosphatidylserine exposure were also verified.

Results :Hyperoxia-induced retinal vasoobliteration in rat pups was associated with increased TxA₂ and PAF generation and was prevented by TxA₂ synthase inhibitor or TxA₂-receptor antagonist as well as PAF receptor blocker. TxA₂ and PAF mimetics caused a time- and concentration-dependent cell death of neuroretinovascular ECs from

newborn rats as well as piglets but not of other cell types. PAF-induced cell death was preceded by an increase in TXA₂ levels and was prevented by TXA₂ synthase inhibition. Endothelial NOS, but not nNOS or iNOS, expression and activity was increased throughout the exposure to hyperoxia. These changes were associated with an early (2 days hyperoxia) decrease in GSH, and an increase in MDA and nitrotyrosine. Antioxydant molecules and NOS blockers treatments nearly abolished the vasoobliteration. In contrast, during 5 days exposure to hyperoxia when the redox state rebalanced, NOS blocker treatment aggravated the vasoobliteration. Interestingly, VEGFR-2 expression was respectively increased by NOS inhibition after short-term (2 days) exposure to hyperoxia and decreased during the longer hyperoxia exposure. ECs death features high PI incorporation and a release of LDH which occur ~18-24 h following stimulus.

Conclusions: Taken together the data identify an important role for TxA₂ in vasoobliteration of OIR and unveil a so far unknown function for TxA₂ and PAF, through synthesis of TXA₂, in directly triggering neuroendothelial cell death of immature retinal and cerebral microvessels while the dual effect of NO on retinal vasculature, depending on the abundance of free radical in response to hyperoxia and PAF-TXA₂ synthesis, depends on the redox state of the retina and seems mediated at least in part by VEGFR-2. The ECs death seems to be intermediate between necrosis and apoptosis.

Key words: vasoobliteration, endothelium, retina, necrosis, apoptosis, peroxidation, nitric oxide synthase, superoxide, peroxynitrite, VEGF.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE PRÉSENTATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	vi
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES FIGURES	xvi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xx
REMERCIEMENTS	xxvi
DÉDICACE	xxvii
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION	1
Généralités	2
ANATOMIE DE L'ŒIL	3
Segment antérieur	3
Segment postérieur	4
La sclérotique.....	4
La choroïde ou choriocapillaire.....	4
Le corps vitré.....	5
La rétine	5
Vascularisation de la rétine	7
Types cellulaires rétiniens	7
Cellules de Müller, astrocytes et microglie.....	7
L'endothélium rétinien et la cellule endothéliale.....	9
Les péricytes.....	14
PHYSIOLOGIE DE LA CIRCULATION OCULAIRE	19

Circulation sanguine oculaire	19
Circulation rétinienne et choroïdienne.....	19
Régulation du débit sanguin oculaire	20
Réponse myogénique.....	21
Innervation.....	22
L'oxygène.....	22
Dioxyde de carbone.....	23
Facteurs endothéliaux.....	24
LA RÉTINOPATHIE DU PRÉMATURE	26
Pathogenèse	26
Développement normal de la vascularisation rétinienne	27
La néovascularisation rétinienne	29
VEGF.....	30
GH, IGF et somatostatine.....	31
Les intégrines.....	31
<i>Pigment epithelium-derived factor</i> , angiostatine et endostatine.....	32
La thrombospondine.....	33
<i>Platelet-derived growth factor</i> et <i>tumor necrosis factor</i>	33
La vaso-oblitération rétinienne	34
AGENTS VASOPRESSEURS DE LA VASCULARISATION RÉTINIENNE	50
L'oxygène et les radicaux libres	50
Le monoxyde d'azote	53
Les prostanoides	55
L'endothéline et l'angiotensine	59
Le facteur d'activation plaquettaire	60
LE THROMBOXANE A₂	62
Synthèse du thromboxane	62
La thromboxane synthase	63

Le thromboxane A₂	65
Le récepteur TP	68
Description du récepteur TP.....	68
Liaison ligand-récepteur et outils pharmacologiques.....	69
Régulation du récepteur TP	71
Désensibilisation et internalisation du récepteur TP.....	71
Régulation génique du récepteur TP.....	72
Activation du récepteur TP et signalisation	73
LE FACTEUR D'ACTIVATION PLAQUETTAIRE	78
Généralités	78
Synthèse du facteur d'activation plaquettaire	79
Production de lipides apparentés à PAF lors de stress oxydant.....	81
Régulations de PAF acétyltransférase et PAF acétylhydrolase.....	81
Le récepteur PAF	82
Régulation génique du PAFR	83
Désensibilisation du PAFR.....	84
Altérations génétiques du PAFR	85
Activation du PAFR	85
Antagonistes du PAFR	86
Rôles physiologiques de PAF	87
Interactions PAF/TXA₂	88
Le PAF et la mort cellulaire	91
LE MONOXYDE D'AZOTE ET LES RADICAUX LIBRES	94
Synthèse de NO	94
La NOS neuronale et la NOS endothéliale	95

La NOS inductible	95
Régulation de la synthèse de eNOS et nNOS	96
Antagonistes de NOS	96
Régulation de la localisation de eNOS	97
Le gène eNOS	98
Phénotype de la souris invalidée pour le gène eNOS	99
Rôle physiologiques du NO	99
Interactions entre le moxyde d'azote et le VEGF	100
Le monoxyde d'azote dans la rétine	101
Localisation de NOS.....	101
Rôle du NO dans la circulation choroïdienne et rétinienne.....	102
Rôle du NO dans la ROP	103
Phase vaso-oblitérative.....	104
Phase de néovascularisation.....	105
Les radicaux libres	105
Généralités	105
L'ion superoxyde	105
Le singulet oxygène	106
Le peroxyde d'hydrogène	106
Le radical hydroxyle	107
Composantes cellulaires affectées par les espèces oxygénées réactives	107
Systèmes antioxydants de la rétine	109
Interactions entre le monoxyde d'azote et les espèces oxygénées réactives	110
Le monoxyde d'azote en tant qu'antioxydant	112

LA MORT CELLULAIRE	115
Les termes « apoptose » et « nécrose »	115
L'apoptose	116
Mécanisme médié par l'interaction ligand-récepteur.....	118
Mécanismes mitochondriaux.....	118
Mécanisme médié par le réticulum endoplasmique.....	121
Autophagie	121
L'oncose	122
Alternatives à l'apoptose et à l'oncose	123
Méthodes de détection de la mort cellulaire	123
Mort cellulaire induite par le stress oxydant	125
CHAPITRE 2 – HYPOTHÈSE ET ÉTUDES EXPÉRIMENTALES	127
Formulation de l'hypothèse	128
Modèle expérimental	129
Les études expérimentales	130
CHAPITRE 3 - LES EFFETS DU MONOXYDE D'AZOTE SUR L'INTÉGRITÉ MICROVASCULAIRE SONT REDOX-DÉPENDANTS LORS DE LA RÉTINOPATHIE INDUITE PAR L'OXYGÈNE	134
Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen- induced retinopathy	135
Abrégé	136
Introduction	137
Matériels et méthodes	139
Résultats	145
Discussion	148
Figures	153

Remerciements	161
Références	161
CHAPITRE 4 - RÔLE DU THROMBOXANE DANS LA DÉGÉNÉRESCENCE MICROVASCULAIRE RÉTINIENNE LORS DE LA RÉTINOPATHIE INDUITE PAR L'OXYGÈNE	171
Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy	172
Abrégé	173
Introduction	174
Matériels et méthodes	175
Résultats	181
Discussion	185
Figures	190
Remerciements	199
Références	199
CHAPITRE 5 - LE FACTEUR D'ACTIVATION PLAQUETTAIRE LORS DE LA VASO-OBLITÉRATION RÉTINIENNE: IMPLICATIONS DANS LA RÉTINOPATHIE DU PRÉMATURE	208
Platelet-activating factor in retinal vasoobliteration: implications in retinopathy of prematurity	209
Abrégé	210
Introduction	211
Matériels et méthodes	212
Résultats	221
Discussion	225
Figures	230

Remerciements	241
Références	241
CHAPITRE 6 – DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES	252
Généralités	253
Mort induite par l'activation des récepteurs PAF et TXA₂	254
Rôle biphasique du monoxyde d'azote dans la vaso-oblitération	263
Conclusions	267
Perspectives futures	269
CHAPITRE 7 – BIBLIOGRAPHIE	272
ANNEXE 1 – ACCORD DES COAUTEURS	xxviii
ANNEXE 2 – AUTORISATION DES ÉDITEURS	xxxv
CURRICULUM VITAE	xxxviii

LISTE DES TABLEAUX**Chapitre 1**

Tableau I. Voie de signalisation des récepteurs prostanoides.....57

Tableau II. IC₅₀, sélectivité et structure de quelques inhibiteurs de NOS.....97

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1. Anatomie simplifiée de l'œil.....	3
Figure 2. Anatomie de la rétine nerveuse.....	6
Figure 3. Rétines montées à plat et colorées à l'ADPase.....	41
Figure 4. Synthèse des prostanoïdes.....	63
Figure 5. Structure du thromboxane A ₂	66
Figure 6. Structure du récepteur TXA ₂ humain.....	68
Figure 7. Structure du thromboxane et de quelques ligands du récepteur TP.....	70
Figure 8. Structure du facteur d'activation plaquettaire.....	78
Figure 9. Voie de synthèse <i>de novo</i> du PAF.....	80
Figure 10. Synthèse du PAF par la voie du remodelage.....	80
Figure 11. Structure du récepteur PAF.....	83
Figure 12. Structure de quelques antagonistes du récepteur PAF et leur IC ₅₀	86
Figure 13. Synthèse du NO par la NOS avec l'aide de ses cofacteurs.....	94
Figure 14. Production et destruction enzymatique des espèces oxygénées réactives (ROS) de la rétine.....	110
Figure 15. Interactions entre le monoxyde d'azote et les espèces oxygénées réactives.....	113
Figure 16. Morphologie de l'apoptose et de l'apoptose.....	116
Figure 17. Rôle de la mitochondrie lors de l'apoptose.....	120

Chapitre 3

- Figure 1. Les effets des antioxydants et de l'inhibition des synthèses du monoxyde d'azote lors de la vaso-oblitération induite par l'oxygène.....153
- Figure 2. Expression de eNOS, réactivité à la NADPH-d et la synthèse de nitrites dans le tissu rétinien sujet à l'hyperoxie.....155
- Figure 3. Niveaux de glutathion, malondialdéhyde et nitrotyrosine dans les rétines de rats exposés à l'hyperoxie.....157
- Figure 4. Modulation de l'expression des récepteurs VEGFR-1 et -2 dans la rétine par l'hyperoxie et l'inhibition des synthèses de monoxyde d'azote.....158
- Figure 5. Effets du NO sur l'intégrité de la vascularisation rétinienne durant une hyperoxie de court et long terme.....159

Chapitre 4

- Figure 1. Les effets de l'inhibiteur de la synthèse du thromboxane A₂ CGS-12970 et de l'antagoniste du récepteur du thromboxane A₂ CGS-22652 sur la vaso-oblitération induite par l'hyperoxie chez le rat.....190
- Figure 2. Les effets cytotoxiques du U-46619 sur des microvaisseaux neurorétiniens fraîchement isolés de rats et de porcs nouveau-nés.....192
- Figure 3. Les effets des mimétiques du TXA₂, U-46619 et I-BOP, sur la viabilité cellulaire en fonction du temps, de la concentration et de l'espèce de prostanoloïde. Spécificité cellulaire de ces effets.....193

Figure 4. Les effets du 8-iso-PGF _{2α} sur la génération de thromboxane et la mort des cellules endothéliales des microvaisseaux rétiens dépendant de TXA ₂	195
Figure 5. Les effets du U-46619 sur la condensation de la chromatine, l'incorporation de PI, la fragmentation de l'ADN et la relâche de la déshydrogénase lactique (LDH) par les cellules endothéliales vasculaires cérébrales de type porcin et la contribution des caspases à la mort cellulaire induite par le U-46619.....	196
Figure 6. Les effets du U-46619 sur différents types cellulaires endothéliaux humains.....	198

Chapitre 5.

Figure 1. Les effets de H ₂ O ₂ et de l'hyperoxie sur les niveaux de PAF et les effets des antagonistes du récepteur de PAF sur les changements de densité vasculaire rétinienne induits par l'hyperoxie.....	230
Figure 2. Les effets de l'administration systémique d'un antagoniste du PAF, le BN52021, sur la vaso-oblitération induite par une exposition des rats à 80% d'oxygène pour une période de P5 à P14.....	232
Figure 3. Les effets cytotoxiques du C-PAF sur des microvaisseaux rétiens fraîchement isolés provenant de rats âgés de 12 à 14 jours et de porcs âgés de 1 à 3 jours.....	234
Figure 4. Les effets concentration et temps-dépendant du C-PAF sur des cultures cellulaires endothéliales microvasculaires rétiniennes	

porcines.....	236
Figure 5. Caractérisation de la cytotoxicité endothéliale rétinovasculaire induite par le C-PAF.....	238
Figure 6. Les effets du C-PAF sur la génération de thromboxane et la mort des cellules endothéliales des microvaisseaux réiniens dépendant de TXA ₂	240

LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

µg – Microgramme

µL – Microlitre

µm – Micron

1400W - *N- [3-(Aminomethyl)benzyl]acetamide dihydrochloride*

7-NINa - 7-nitroindazole sodium

AA – Acide arachidonique

ADP – Adénosine diphosphate

AEC – Cellules endothéliales aortiques

Ang II – Angiotensine II

ANOVA – Analyse de la variance

ASA - Acide acétylsalicylique

ATP – Adénosine triphosphate

BEC – Cellules endothéliales cérébrales

BHT - Butylhydroxytoluène

CaCl₂ - Chlorure de calcium

cAMP – Adénosine monophosphate cyclique

cGMP – Guanosine monophosphate cyclique

Ci – Curie

cm – Centimètre

CO₂ – Dioxyde de carbone

COX – Cyclooxygénase

cPLA₂ – Phospholipase A₂ cytosolique

Cu - Cuivre

CuDIPS - *copper [II] [3,5-diisopropylsalicylate acid]₂*

DEC – Cellules endothéliales dermales

DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO – Diméthyl sulfoxyde

DNA – Acide désoxyribonucléique

dUTP – Désoxyuridine triphosphate

EC – Cellule endothéliale

EDTA - Acide éthylène diamine tétra acétique

EGTA - Acide bis (amino-éthyl) glycol éther NNN'N' tétracétique

eNOS - NOS endothéliale

FeTPPS - *iron III porphyrin 5,10,15,20-tetrakis[4-sulfonatophenyl]prophyrinato iron chloride*

FITC – Fluorescéine isothiocyanate

g – Accélération de la pesanteur

GDP – Guanosine-diphosphate

GFAP – Protéine gliale fibrillaire acide

GSH - Glutathion réduit

GPx – Glutathion peroxydase

GTP – Guanosine-triphosphate

H₂O - Eau

H₂O₂ – Peroxyde d'hydrogène

HBSS – Solution saline de Hanks

HCl – Chlorure d'hydrogène

HPLC - Chromatographie liquide à haute performance

I-BOP – 1*S*-[1 α , 2 α , (*Z*),3 β (1*E*,3*S*^{*}),4 α]]-7-[3- [3-hydroxy-4-(4-iodophenoxy)-1-butenyl]-7-oxabicyclo[2.1.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid

iNOS - NOS inductible

Iso-PG – Isoprostane

KCl - Chlorure de potassium

kg – Kilogramme

KH₂PO₄ - Phosphate monopotassique

KNO₂ - Nitrite de potassium

LDH – Déshydrogénase lactique

L-NA - N-nitro-L-arginine

M – Molaire

MDA - Malondialdéhyde

mg - Milligramme

MgCl₂ - Chlorure de magnésium

MgSO₄ - Sulfate de magnésium

ml – Millilitre

mM – Millimolaire

mmol – Millimole

MTT – 3-(4,5-dimethyl thiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

N₂ - Molécule d'azote

NaCl - Chlorure de sodium

NADH – Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH - Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NADPH-d - NADPH diaphorase

NaHCO₃ - Bicarbonate de sodium

NF-κB - Facteur nucléaire kappa B

nm - Nanomètre

nM – Nanomolaire

nNOS - NOS neuronale

NO – Monoxyde d'azote

NO₂⁻ - Nitrite

NOS - Synthase de monoxyde d'azote

O₂ - Oxygène

O₂⁻ - Anion superoxyde

OIR – Rétinopathie induite par l'oxygène

P – Journée postnatale

P – Seuil de l'épreuve de signification statistique

PAF – Facteur d'activation plaquettaire

PBS – Solution saline de tampon phosphate

pg – Picogramme

PG – Prostaglandine

PGI₂ - Prostacycline

pH – Potentiel d'hydrogène

PI – Iodure de propidium

PO₂ – Pression partielle d'oxygène

PUFA – *Polyunsaturated fatty acid*, acide gras polyinsaturé

PVDF - Polyvinylidene difluoride

ROP – Rétinopathie du prématuré ou rétinopathie obstructive proliférative

ROS – *Reactive oxygen species*, espèces oxygénées réactives

RNS – *Reactive nitrogen species*, espèces nitrogénées réactives

Rpm – Radian par minute

SDS - *Sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE - Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

SE – Erreur type

SEM – Erreur type sur la moyenne

SOD - Superoxyde dismutase

t_{1/2} – Demi-vie

TBA - Acide thiobarbiturique

TBS - *Tris buffered saline*

TRIM: 1-(2-trifluorométhylphényl) imidazole

TTBS - *Tris buffered saline* contenant du tween

TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*

TX – Thromboxane

UVEC – Cellules endothéliales vasculaires ombilicales

v/v - Volume pour volume

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*, facteur de croissance endothélial vasculaire

Zn – Zinc

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le Dr Sylvain Chemtob qui m'a accueilli dans son laboratoire en janvier 1999 et m'a permis de me joindre à une merveilleuse équipe. Je le remercie également pour son support et pour avoir cru en mes capacités d'aller jusqu'au bout.

Je remercie les organismes subventionnaires qui m'ont supporté financièrement durant ma formation :

La Fondation de l'Hôpital Ste-Justine (1999-2002)

La Fondation du monoxyde d'azote (2000)

Instituts de recherche en santé du Canada (2002-2005)

Je voudrais exprimer au Dr Daya R. Varma toute ma gratitude pour les précieux conseils qu'il m'a prodigués durant l'écriture des trois manuscrits qui composent cette thèse.

Je voudrais remercier tous les membres du laboratoire particulièrement ceux et celles qui ont parfois dû endurer mon humeur pas toujours au beau fixe. Des mercis particuliers vont à Mme Hendrika Rietveld-Fernandez qui a toujours été là lorsque j'avais besoin d'aide ainsi qu'aux Drs Fernand Gobeil jr, Sylvie G. Bernier et Florian Sennlaub pour leurs suggestions et discussions critiques qui ont toujours su me faire progresser.

Finalement, je voudrais remercier ma famille : mes soeurs Sophie et Amélie, mon frère Eric, mes grands-parents maternels et paternels, mais surtout mes parents Yvon et Jocelyne qui n'ont jamais cessé de m'encourager à continuer. Un merci additionnel va à ma mère qui a eu la patience et la gentillesse de corriger la syntaxe du manuscrit. Enfin, je remercie ma copine Julie, sans qui je n'aurais jamais eu le courage de terminer.

Cette thèse est dédiée à la mémoire de Pierre Nadon (1945-2005)

CHAPITRE 1

Introduction

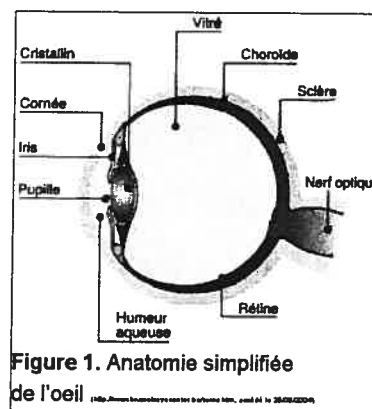
Généralités

La rétinopathie du prématuré (ROP) est une maladie qui a vu son incidence augmenter au cours des dernières décennies malgré et, ironiquement, peut-être même à cause de l'efficacité des techniques médicales utilisées qui permettent de sauver des enfants d'âge gestationnel et de poids de plus en plus bas. Malgré que la ROP soit la deuxième cause de cécité dans la population adulte, après les rétinopathies diabétiques, la pathogenèse de cette maladie est mal connue. Brièvement, cette maladie est d'abord caractérisée par un apport accru en oxygène à la rétine favorisant un arrêt de la croissance normale et une vaso-oblitération (dégénérescence) de la microvascularisation rétinienne. La dégénérescence microvasculaire est responsable d'une ischémie, qui à mesure que l'apport en oxygène diminue, favorisera le développement de la phase clinique de la maladie : la néovascularisation pré-rétinienne. Cette dernière est la conséquence du développement anarchique de la vascularisation rétinienne qui ira même jusqu'à traverser la membrane limitante interne et envahir le corps vitré. Cette angiogenèse incontrôlée peut occasionner des déficits oculaires mineurs, mais peut aussi aller jusqu'au décollement de la rétine et la cécité. Cette thèse s'attardera à décrire une phase encore mal connue de la maladie, soit celle de la **vaso-oblitération**. Souvent appelés à agir en aval de la vaso-oblitération, les cliniciens ne sont habituellement pas témoins de ce phénomène et sont souvent appelés à traiter les conséquences de la néovascularisation. Il nous est permis de penser qu'une meilleure compréhension des événements se produisant en amont de la néovascularisation rétinienne nous permettra d'envisager la possibilité de traitements prophylactiques, afin d'éviter la vaso-oblitération rétinienne et la ROP. L'introduction qui suit permettra au lecteur de se familiariser avec les phénomènes et les

principaux éléments impliqués dans la vaso-oblitération et la rétinopathie induite par l'oxygène caractérisées dans les chapitres 3, 4 et 5 de cette thèse.

ANATOMIE DE L'ŒIL

L'œil se divise en deux segments, le segment antérieur et le segment postérieur. Le segment antérieur contient l'humeur aqueuse et le segment postérieur contient le corps vitré (Fig. 1). À moins que cela ne soit précisé, les paragraphes suivants décrivent l'anatomie de l'œil humain adulte. Les données relatives aux calibres



des vaisseaux sont sensiblement les mêmes pour les nouveau-nés.

Segment antérieur

Le segment antérieur comprend la cornée qui est très riche en terminaisons nerveuses, mais presque entièrement avasculaire. Le tissu est nourri par diffusion de l'humeur aqueuse et par les larmes. Son intégrité et sa transparence sont assurées ses épithéliums externe et interne qui la protègent de l'abrasion et préservent sa transparence, obtenue par la disposition régulière des fibres de collagène, en expulsant les ions sodium dans le globe oculaire. En plus de la cornée, le segment antérieur comprend la chambre antérieure qui est la cavité de l'œil remplie par l'humeur aqueuse sécrétée par l'iris et le corps ciliaire, limitée en avant par la face postérieure de la cornée et en arrière par l'iris ainsi que la face antérieure du cristallin. L'iris qui est le diaphragme devant le cristallin alors que le corps ciliaire représente l'appareil de sustentation du cristallin qui lui permet de réguler le degré de courbure pour une meilleure adaptation à la vision de loin et de

proche et finalement le cristallin est la lentille biconvexe formée de fibres épithéliales allongées associées en lamelles.

Segment postérieur

Le segment postérieur comprend la sclérotique, la choroïde, le corps vitré et la rétine. Comme l'essentiel des travaux de recherche a porté sur la rétine et sa vascularisation, un accent particulier sera mis sur la rétine.

La sclérotique

Blanc de l'œil dans sa partie la plus antérieure, c'est la tunique fibreuse qui donne, avec les pressions intraoculaires, sa forme et protège l'œil. Elle permet un solide ancrage aux muscles extrinsèques de l'œil.

La choroïde ou choriocapillaire

La choroïde est une membrane hautement vascularisée qui forme les cinq sixièmes postérieurs de la tunique vasculaire. Sa pigmentation à l'intérieur de l'œil empêche la diffusion et la réflexion de la lumière. La choroïde s'étend postérieurement du nerf optique à l'*ora serrata*, antérieurement. Les artères ciliaires longues et courtes donnent naissance au lit capillaire uvéal (l'iris, le corps capillaire et la choroïde). Les capillaires de la choroïde se lient étroitement à la membrane de Bruch, qui se situe entre la choriocapillaire et l'épithélium pigmentaire de la rétine. Les capillaires de la choroïde sont les plus grands (20-40 μm) et les plus denses dans l'organisme. L'endothélium est fenestré au contraire de celui de la rétine. Le flux passant par ce lit capillaire est très important (1,4 à 1,7 ml/min/g de tissu comparé à environ 0,078 ml/min/g de tissu dans la rétine) (Bill, 1981). Il fournit des nutriments à toutes les tuniques vasculaires

particulièrement aux couches du tiers externe de la rétine qui dépend de la diffusion de l'oxygène, notamment la couche de photorécepteurs qui est dépourvue de capillaires et dont les besoins en oxygène sont parmi les plus grands de l'organisme. Le sang est drainé par des veinules qui se réunissent pour former quatre veines vortiqueuses.

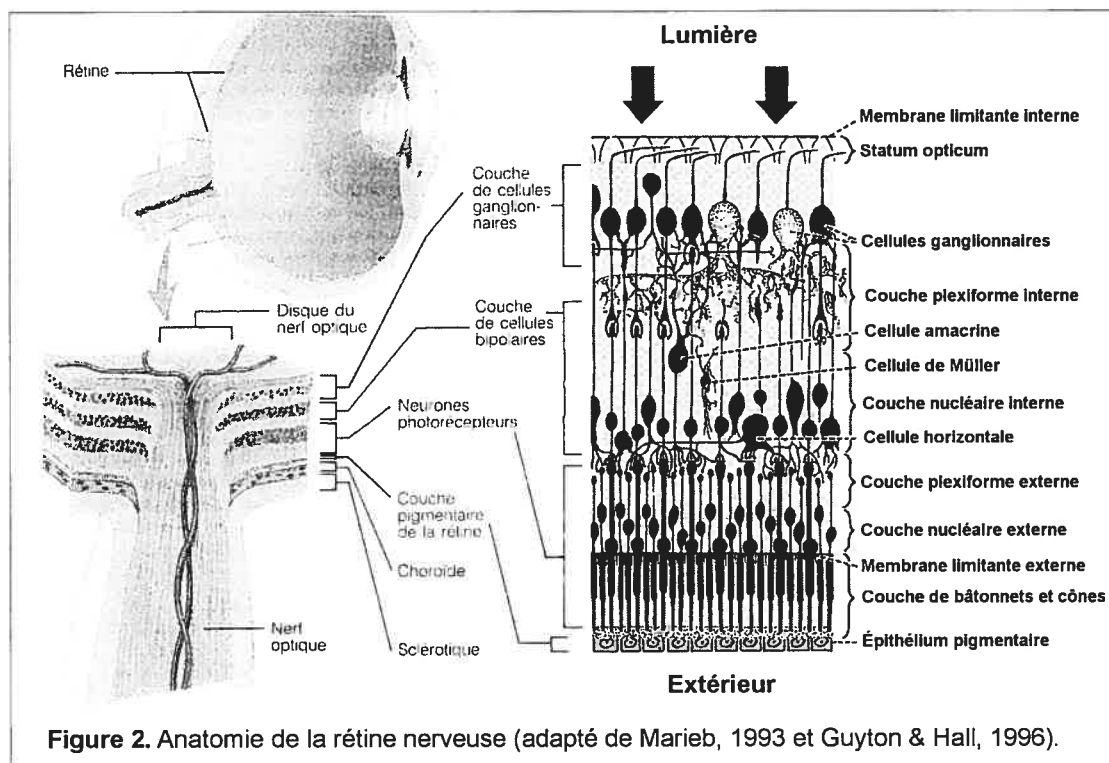
Le corps vitré

Le corps vitré, contenu dans une enveloppe transparente appelée la hyaloïde, occupe environ les deux tiers du volume du globe, est un tissu mésenchymateux formé d'une trame de fibrilles de collagène contenue dans un liquide visqueux analogue à l'humeur aqueuse et formé d'eau à plus de 99 %; l'autre constituant majeur est l'acide hyaluronique qui, associé à des protéines, est responsable de sa viscosité. Cette substance gélatineuse et transparente remplit l'espace compris entre la rétine et la face postérieure du cristallin. En plus de transmettre la lumière, le corps vitré soutient la face postérieure du cristallin, presse la couche nerveuse de la rétine contre sa couche pigmentaire et participe à la pression intra-oculaire. Plusieurs substances, telles que les prostaglandines (PG), sont des substrats pour un transport actif entre le corps vitré et la circulation rétinienne via la barrière hémato-oculaire (Bito et Salvador, 1972; Bito, 1977; Bito et Wallenstein, 1977), permettant ainsi l'élimination de substances potentiellement toxiques.

La rétine

La rétine neurosensorielle est constituée de différents types de neurones permettant le traitement et le transfert de l'information visuelle (Fig. 2, page 6). Les photorécepteurs (1^{er} neurone) sont le point de départ de l'information visuelle. Ils comprennent les bâtonnets et les cônes, sont formés de deux parties : les segments

externes et internes qui sont le siège de la transduction visuelle, et la couche nucléaire externe, qui abrite les corps et les noyaux des photorécepteurs et conduit le signal électrique jusqu'à la couche plexiforme externe. L'information est alors transmise aux cellules bipolaires (2^e neurone), dont les noyaux forment la population majoritaire neuronale de la couche nucléaire interne, avec les cellules horizontales et amacrines. Ces deux autres types de neurones permettent de moduler la transmission de l'information au niveau des cellules bipolaires. Dans la couche plexiforme interne, les cellules bipolaires forment des synapses avec les cellules ganglionnaires (3^e neurone) dont les axones se regroupent pour former le nerf optique, qui transmet l'influx nerveux jusqu'aux corps genouillés latéraux du cerveau.



Vascularisation de la rétine

Le réseau sanguin de la rétine dérive de l'artère ophtalmique, une branche de la carotide interne. L'artère ophtalmique se divise en plusieurs branches, dont l'artère centrale rétinienne et les artères ciliaires. L'artère centrale rétinienne passe au milieu du nerf optique dans l'intérieur de l'œil où elle se divise en quatre branches, pour ensuite se diviser en artérioles et en capillaires formant le lit capillaire rétinien. Les branches de l'artère centrale rétinienne sont des artères terminales. Il n'existe aucune anastomose entre elles ou encore avec le lit capillaire de la choroïde. Les capillaires rétiniens comptent parmi les plus petits de l'organisme (3,5 à 6 μm) et forment deux couches de vaisseaux, une superficielle dans la couche des cellules ganglionnaires et une profonde dans la couche nucléaire interne. Les vaisseaux rétiniens irriguent les deux tiers de la rétine interne. Les cellules endothéliales rétiniennes forment des *zonulae occludent*, entourées par une épaisse membrane basale, par des péricytes (en nombre identique aux cellules endothéliales) et par les extensions des astrocytes. L'ensemble forme la barrière hémato-oculaire interne. La fovéa de la macula n'a pas de capillaires rétiniens et est ainsi uniquement nourrie par la choroïde. La veine centrale rétinienne quitte finalement l'œil, en se liant à l'artère par le nerf optique (Forrester *et al.*, 1996).

Types cellulaires rétiniens

Cellules de Müller, astrocytes et microglie

Les cellules de Müller, qui traversent la rétine dans presque toute son épaisseur (mis à part les segments externes), représentent le type glial le plus abondant. Leurs noyaux forment, avec ceux des cellules bipolaires, amacrines et horizontales, la couche nucléaire interne. Les cellules de Müller sont particulièrement riches en glycogène et en

réticulums endoplasmiques lisses. Leur rôle exact est encore mal déterminé, mais elles ont à la fois un rôle de soutien et un rôle métabolique. En effet, l'analyse de leur contenu enzymatique a permis d'identifier certaines fonctions cellulaires comme la régulation du métabolisme glucidique de la rétine, la dégranulation de neurotransmetteurs rétiniens, notamment le GABA, le contrôle de la concentration en glutamate, qui est libéré par les neurones ou encore la régulation du taux de potassium (Newman et Reichenbach, 1996).

Les astrocytes, retrouvés dans la couche des fibres optiques, se divisent en deux variétés : les astrocytes allongés et les astrocytes stellaires. Les multiples prolongements des astrocytes stellaires s'insinuent entre les constituants neuronaux et entrent en contact avec les péricytes des vaisseaux sanguins sans avoir, pour la plupart, un contact avec les autres cellules gliales. Ils pourraient donc jouer un rôle de transfert métabolique entre la circulation et les neurones rétiniens. Ces astrocytes sont d'ailleurs absents de la fovéa centrale, région centrale de la rétine, dépourvue de vaisseaux sanguins.

Les cellules de la microglie se retrouvent essentiellement dans les couches plexiformes de la rétine. Elles peuvent migrer librement pour exercer une fonction phagocytaire au sein du tissu neurosensoriel (Forrester *et al.*, 1996).

Face aux photorécepteurs se trouvent les cellules épithéliales pigmentées, reposant sur la membrane de Bruch et la choriocapillaire. Elles forment un épithélium uni stratifié, cubique d'une seule couche de cellules polygonales, unies étroitement entre elles par des jonctions intercellulaires serrées. Cet épithélium constitue, avec la choriocapillaire, la barrière hémato-rétinienne externe. Les microvillosités apicales de ces cellules épithéliales pigmentées s'insinuent entre les articles externes des photorécepteurs et phagocytent les débris des disques membranaires des bâtonnets. Ces cellules sont

également impliquées dans le recyclage du rétinol qui est indispensable à la transduction visuelle dans les segments externes des photorécepteurs (Forrester *et al.*, 1996).

L'endothélium rétinien et la cellule endothéliale

Tel que mentionné plus haut, les capillaires rétiniens forment les vaisseaux les plus petits de l'organisme. Interface entre le sang et l'espace interstitiel, l'endothélium de ces capillaires est formé par une fine monocouche de cellules squameuses tapissant sa face luminale : les cellules endothéliales. Commune à tous les endothéliums, la cellule endothéliale a plusieurs fonctions qui ne sont pas exclusives à l'endothélium rétinien. La cellule endothéliale joue d'abord un rôle très important en tant que barrière entre le sang et le milieu interstitiel. Trois types de jonctions existent entre les cellules endothéliales dont l'architecture dictera la fonction, les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes (Dejana *et al.*, 1995; Schnittler, 1998). Tout comme c'est le cas de l'endothélium des capillaires cérébraux, l'endothélium rétinien ne possède pas de fentes intercellulaires et les cellules endothéliales sont jointes entre elles par des jonctions serrées de façon à limiter les échanges entre le sang et le liquide interstitiel (Marieb et Laurendeau, 1993; Cunha-Vaz, 2004). Le développement de la barrière hémato-oculaire interne est associé à l'expression de molécules d'adhésion par les astrocytes et est associé à la maturité de la vascularisation rétinienne (Janzer et Raff 1987; Gardner *et al.*, 1997; Gerhardt *et al.*, 1999; Provis 2001). Chez le rat nouveau-né, la rétine est avasculaire, en conséquence, la barrière hémato-oculaire interne arrive à maturité entre la 11^{ème} journée postnatale (P)11 et P13, ce qui correspond au moment où l'animal ouvre les yeux (Zeng *et al.*, 2000).

De loin, la fonction la plus importante de l'endothélium, est sa participation à la régulation des débits sanguins. La vascularisation rétinienne est dépourvue ou a très peu d'innervation autonome (Latties, 1967). Il devient donc primordial que la cellule endothéliale rétinienne, notamment par des récepteurs à sa membrane cytoplasmique et par son cytosquelette, détecte les changements externes et médie la transmission des signaux intracellulaires menant à la synthèse d'autacoïdes modulant la réponse myogénique des péricytes ou des cellules musculaires lisses qui jouxtent les cellules endothéliales dans sa partie abluminale. On note la présence de plusieurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales rétiniennes et des cellules musculaires lisses/péricytes et un effet de la part de plusieurs agents pharmacologiques endogènes. On remarque très peu de récepteurs α_1 -adrénergiques et β_2 -adrénergiques (Hoste *et al.*, 1989; Hoste *et al.*, 1990; Nielsen et Nyborg, 1990; Yu *et al.*, 1992; Su *et al.*, 1995); il y a cependant des récepteurs à l'histamine H_1 sur la cellule endothéliale et H_2 sur les cellules musculaires lisses (Yu *et al.*, 2003) dont l'effet de la stimulation diffère selon la géographie vasculaire : dilatation sur l'artériole rétinienne et contraction sur l'artère ciliaire postérieure (Yu *et al.*, 2003). La dopamine produit une réponse par une interaction avec les récepteurs α -adrénergiques et 5-HT (sérotonine) et médie une contraction sur la vascularisation rétinienne qui est moins importante que sur la vascularisation cérébrale; les PGs et ses analogues, $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 , 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$ et thromboxane (TX) A_2 provoquent une contraction via les récepteurs FP, EP et TP présents sur les cellules endothéliales et musculaires lisses; l'endothéline-1 (ET) qui est le vasoconstricteur oculaire connu le plus puissant (Nyborg *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1993) est synthétisé par la cellule endothéliale et agit de façon autocrine ou paracrine sur des récepteurs ET_B

sur la cellule endothéliale et ET_A sur la cellule musculaire lisse (Masaki et Yanagisawa, 1992). L'ET-1 est produit en réponse au stress physique et chimique notamment, les forces de cisaillement, la thrombine, l'adrénaline et l'angiotensine II (Ang II) (Michiels, 2003). De son côté, l'Ang II peut agir directement sur le muscle lisse (Su *et al.*, 1995) via le récepteur AT₁ et causer une constriction.

Outre les constricteurs, plusieurs vasodilatateurs sont synthétisés dans la vascularisation rétinienne et agissent au niveau de l'endothélium. Le plus important est sans doute le monoxyde d'azote (NO) synthétisé par la cellule endothéliale et favorisant une relaxation du muscle lisse via un mécanisme dépendant de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP). La production de NO sert souvent de mécanisme de rétroaction négative en réponse à une contraction à ET-1 (Yu *et al.*, 2003) ou au TXA₂. L'adénosine relâchée par le tissu ischémique dans l'espace extraluminale (Rudolphi *et al.*, 1992a; Sciotti et Van Wylen, 1993) viendrait, par son effet dilatateur, limiter les dommages causés par les acides aminés excitateurs comme le glutamate et l'aspartate (Rudolphi *et al.*, 1992b; Sciotti *et al.*, 1992). Cet effet serait produit par une action au niveau des récepteurs A₂ de l'adénosine à la surface musculaire lisse, puisque l'injection intraluminale dans un système isolé n'a aucun d'effet (Yu *et al.*, 2003). Finalement, la prostacycline (PGI₂) synthétisée par l'endothélium et les cellules musculaires lisses agit via le récepteur IP entraînant une production de d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) et une production de NO menant à une relaxation et une vasodilatation.

Plusieurs autres fonctions importantes sont remplies par les cellules endothéliales : la vasculogénèse et la néovascularisation, un rôle de barrière entre le milieu sanguin et interstitiel, la coagulation et la fibrinolyse, réaction inflammatoire.

Comme nous le verrons plus loin (VEGF, page 30 et chap. 3), le facteur vasculaire de croissance endothéliale (VEGF) est le facteur endothélial le plus important dans la formation de nouveaux vaisseaux (Ferrara, 2000; Larrivée et Karsan, 2000; Ferrara *et al.*, 2003), non seulement au stade fœtal, mais aussi au stade adulte comme c'est le cas dans le cerveau (Rosenstein *et al.*, 1998; Proescholdt *et al.*, 1999). Pathologiquement, le VEGF joue aussi un rôle substantiel dans la néovascularisation tumorale (Ferrara *et al.*, 2003) ou celle observée dans la ROP (Smith, 2004). Le gène de VEGF contient un site de liaison pour le *hypoxia-induced factor-1* (HIF)-1 lui servant de détecteur à oxygène et module son expression (Semenza, 2000). Le VEGF agit donc comme un facteur de survie, par ses capacités à stimuler l'angiogenèse, lors de la phase de vaso-oblitération rétinienne (Rosenstein *et al.*, 1998; Larrivee et Karsan, 2000); combiné à l'hypoxie, il devient néfaste dans la phase ischémique et provoque la croissance anormale de la vascularisation observée dans la néovascularisation (Smith, 2004). Le VEGF agit via trois récepteurs appelés VEGFR-1 ou Flt-1, VEGFR-2 ou Flk-1/KDR et VEGFR-3 (Michiels, 2003). VEGFR-1 et -2 produisent l'essentiel des effets vasculaires de VEGF et se retrouvent à la surface des cellules endothéliales. De plus, VEGFR-1 se retrouve sur les astrocytes du cerveau (Krum et Rosenstein, 1998; Krum *et al.*, 2002) et de la rétine (Stone *et al.*, 1996). La liaison du ligand à son récepteur active des domaines tyrosine kinase déclenchant une cascade de signalisation intracellulaire modulant différents effets : augmentation de la perméabilité vasculaire, prolifération, migration et survie cellulaires (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara et Davis-Smyth, 1997; Griffioen et Molema, 2000; Larrivee et Karsan, 2000). Le VEGF est synthétisé par tous les types cellulaires rétiniens et est souvent régulé à la hausse pour compenser une diminution de la production d'ATP. On a retrouvé des

l'ARNm de VEGF dans les cellules endothéliales (Lutty *et al.*, 1998; Qaum *et al.*, 2001), les astrocytes (Stone *et al.*, 1995), l'épithélium pigmentaire rétinien (Adamis *et al.*, 1994; Shima *et al.*, 1995), les cellules de Müller (Aiello *et al.*, 1995; Stone *et al.*, 1995; Amin *et al.*, 1997) et les cellules ganglionnaires (Wada *et al.*, 1999).

L'endothélium sécrète et exprime plusieurs facteurs anticoagulants et procoagulants dont la balance est maintenue selon les besoins circulatoires. Parmi les anticoagulants, on compte le PGI₂ et le NO (Cines *et al.*, 1998) qui augmentent la synthèse de cAMP et de cGMP dans les plaquettes pour prévenir leur agrégation (de Graaf *et al.*, 1992). L'endothélium possède à sa surface des nucléotidases qui hydrolysent, les puissants agrégateurs plaquettaires que sont l'ATP et l'ADP, en AMP et adénosine (Pearson *et al.*, 1980). De plus, le récepteur thrombomoduline, lorsqu'activé par la thrombine, facilite l'activation de la protéine C qui forme un complexe avec la protéine S sécrétée par la cellule endothéliale pour inactiver les facteurs de la cascade de la coagulation FVa et FVIIIa (Sadler, 1997). Finalement, les cellules endothéliales sécrètent le *tissue-type plasminogen activator* (t-PA) et l'urokinase qui transforment le plasminogène en plasmine qui dégrade les thrombi en digérant la fibrine.

À l'opposé, les procoagulants synthétisés par les cellules endothéliales sont nombreux pour faire la promotion de l'adhésion des plaquettes à l'endothélium. Parmi eux on retrouve le facteur d'activation plaquettaire (PAF), le thromboxane (TXA₂), l'adénosine triphosphate (ATP) et l'adénosine diphosphate (ADP) et le facteur de von Willebrand (vWF). La cellule endothéliale exprime le facteur tissulaire (TF), une glycoprotéine membranaire qui initialise la cascade de coagulation (Davie *et al.*, 1991) et le récepteur *protease activated receptor-1* (PAR)-1 qui, une fois activé par la thrombine,

mène à une relâche de vWF, stimule la synthèse de PAF et de chémokines et l'expression de molécules d'adhésion.

Finalement, l'endothélium réagit en réponse à des stimuli inflammatoires, tels que les lipopolysaccharides (LPS), le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α ou l'interleukine (IL)-1 en synthétisant des ILs, des *colony-stimulating factors* (CSF) et des chémokines (Mantovani *et al.*, 1992; Pober *et al.*, 1997; Krishnaswamy *et al.*, 1999) qui font la promotion de la réaction inflammatoire, affectent les interactions entre les cellules, la prolifération et la survie cellulaire, notamment par l'activation de facteurs de transcription dont les plus importants sont AP-1, STATs et NF- κ B (Barnes et Karin, 1997).

Comme nous le verrons plus loin, la phase de dégénérescence cellulaire endothéliale rétinienne (vaso-oblitération) dont il est question dans cette thèse se produit avant le début d'une agrégation plaquettaire ou l'installation d'une réponse inflammatoire (Ashton, 1966; Chan-Ling et Stone, 1992; McLeod *et al.*, 1996). Malgré des fonctions qui somme toute, sont assez semblables à celles des autres cellules endothéliales, les cellules endothéliales rétiniennes (et cérébrales) présentent des caractéristiques qui leur sont propres et qui seront mises en évidence dans les prochains chapitres (Chap. 3, 4 et 5) et les sections suivantes (La vaso-oblitération rétinienne, page 34), identifiant une certaine hétérogénéité des populations cellulaires endothéliales peuplant l'organisme.

Les péricytes

Tout comme les cellules musculaires lisses, les péricytes représentent un type cellulaire contractile qui dérive du mésenchyme. Leur contenu en actine est intermédiaire à celui retrouvé dans les cellules musculaires lisses (SMC) et les cellules endothéliales

(EC<Péricytes<SMC). En plus de l'actine, ils expriment aussi la myosine et la tropomyosine (Shepro et Morel, 1993), d'autres protéines du tissu musculaire. Cette caractéristique procure aux péricytes une capacité contractile analogue à celle des cellules musculaires lisses. Les péricytes recouvrent les capillaires des lits vasculaires ayant un diamètre inférieur à 5 μm , alors que les vaisseaux de plus forts calibres sont entourés par des cellules musculaires lisses. Certaines théories présentent les péricytes comme des précurseurs des cellules musculaires lisses (Meyrick et Reid, 1979; Rhodin et Fujita, 1989), alors qu'il s'agit d'un type cellulaire multipotent capable de se différencier en adipocytes, ostéoblastes et même, phagocytes (Farquhar et Palade, 1962; Richardson *et al.*, 1982; Brighton et Hunt, 1986; Schlondorff, 1987). Certaines différences existent entre les deux types cellulaires. Ainsi, les péricytes possèdent des conductances ioniques différentes de celles des cellules musculaires lisses leur permettant de réagir différemment à certaines molécules dérivées du sérum (Sakagami *et al.*, 1999). Mais, dans l'ensemble, leur fonction est comparable. Comme le lit microvasculaire rétinien compte parmi les plus petits capillaires de l'organisme ($< 7,5 \mu\text{m}$) et que les vaisseaux de gros calibres ($>30 \mu\text{m}$), qui contiennent des cellules musculaires lisses, sont peu ou pas affectés dans le modèle de rétinopathie induite par l'oxygène qui sera décrit plus loin (Chap. 4 et 5), seule une description des péricytes sera faite.

La fonction première des péricytes est de venir stabiliser les capillaires nouvellement formés par une interaction avec le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) produit par les cellules endothéliales (Hellstrom *et al.*, 2001b); cette fonction s'effectue aussi dans la guérison de blessures (Crocker *et al.*, 1970). Ainsi, les cellules endothéliales sont responsables du recrutement des péricytes et de leur

organisation. Par exemple, les embryons de souris déficients pour PDGF-B sont incapables d'attirer les péricytes progéniteurs et développent des microanévrismes vers la fin de la gestation (Lindahl *et al.*, 1997). Le ratio péricyte/cellule endothéliale est de 1/1 dans la microcirculation rétinienne, alors qu'il est de l'ordre de 1/10 dans les autres lits vasculaires (Tilton *et al.*, 1985; Balabanov et Dore-Duffy, 1998). Les péricytes, tels que cela a été démontré pour les poumons, participent aux échanges, notamment en facilitant les échanges de fluides à travers l'endothélium microvasculaire (Lonigro *et al.*, 1996). Ceci peut être expliqué en partie par la plus grande perméabilité de la barrière hémato-oculaire en comparaison avec la barrière hémato-encéphalique.

Les péricytes sont adjacents aux cellules endothéliales des capillaires et entourent ces derniers avec ce qui peut ressembler à de petites protubérances. Les cellules endothéliales possèdent aussi de semblables protubérances qui s'imbriquent dans celles des péricytes. Les deux types cellulaires participent ainsi à la formation de la membrane basale (Weibel, 1974; Mandarino *et al.*, 1993). Il existe une distribution différentielle des péricytes selon le côté veineux et artériel, ainsi y a-t-il plus de péricytes du côté veineux (Simionescu *et al.*, 1975) et les plus grosses veinules semblent avoir plus de contacts avec les cellules endothéliales (Rhodin, 1968) suggérant un rôle tissu/vaisseau spécifique. En plus de la membrane endothéliale, la jonction avec les cellules endothéliales implique des molécules d'adhésion cellulaires (CAM), des molécules d'adhérence au substrat (SAM) et des jonctions communicantes (Schwartz et Liaw, 1993).

Les péricytes ont plusieurs interactions avec les cellules endothéliales. D'abord, lors de l'angiogenèse une forme latente de TGF- β_1 , produit par les cellules endothéliales et activée par le contact avec les péricytes, stimule l'expression de α -actine dans le

péricyte (Verbeek *et al.*, 1994; Hirschi et D'Amore, 1996) tout en provoquant un arrêt de la prolifération endothéliale des vaisseaux nouvellement formés (Crocker *et al.*, 1970; Heimark *et al.*, 1986) et inhibant ainsi la migration cellulaire (Sato et Rifkin, 1989). Ensuite, comme les cellules endothéliales, les péricytes participent à l'autorégulation de la perfusion et de la perméabilité vasculaire, jouant ainsi un rôle dans le maintien de l'homéostasie (Hirschi et D'Amore, 1996). Grâce à leur capacité contractile, notamment due à l'actine qu'ils contiennent, les péricytes contrôlent le diamètre de la lumière vasculaire par altération morphologique médiée par des cytokines et des médiateurs autocrines, paracrines et endocrines (Chakravarthy et Gardiner, 1999). Les péricytes possèdent, entre autres, des récepteurs ET_B (Takahashi *et al.*, 1989) et une activité kinase dépendante de cGMP (Joyce *et al.*, 1985a; Joyce *et al.*, 1985b) lui permettant de répondre à des stimuli provenant de la cellule endothéliale pour causer soit une contraction par l'ET-1 par exemple, soit une relaxation NO-dépendante (Busse *et al.*, 1995; Masaki, 1995).

Les péricytes semblent avoir un rôle important dans plusieurs pathologies, dont les rétinopathies ischémiques. On remarque une corrélation entre la disparition des péricytes et la forte néovascularisation dans la ROP (Kuwabara et Cogan, 1963). De plus, la survie des péricytes dépend du PDGF fabriqué par les cellules endothéliales; une perte des péricytes entraîne une surexpression de VEGF/VEGFR-2 et une angiogenèse dans un modèle de ROP (Wilkinson-Berka *et al.*, 2004). Ceci rejoint une théorie présentant les péricytes qui expriment le récepteur VEGF comme des leurres pour le ligand en situation physiologique, afin de maintenir l'intégrité vasculaire (Witmer *et al.*, 2003). Dans un modèle de rétinopathie diabétique (RD), l'expression du récepteur ET_B dans les péricytes

rétiniens augmentent (Ceccarelli *et al.*, 2001). Les péricytes expriment aussi un récepteur des *advanced glycation end-products* (AGE) et dégèrent rapidement dans le cas de RD (Cogan *et al.*, 1961) mourant par apoptoses (Mizutani *et al.*, 1996; Podesta *et al.*, 2000).

PHYSIOLOGIE DE LA CIRCULATION OCULAIRE

Circulation sanguine oculaire

Deux systèmes circulatoires sont impliqués dans l'apport de nutriments pour satisfaire à la demande métabolique de l'œil, le réseau de vaisseaux sanguins rétiniens et le réseau de vaisseaux sanguins ciliaires qui compte trois lits vasculaires : celui de l'iris, du corps ciliaire et la choroïde.

Circulation rétinienne et choroïdienne

Certaines espèces animales ont la rétine complètement avasculaire comme c'est le cas du cochon d'Indes (Wong et Macri, 1964; Yu *et al.*, 1996), laissant la rétine entièrement dépendante de la circulation choroïdienne, alors que chez l'humain, les primates et le rat, la rétine est alimentée par les réseaux rétinien et choroïdien (Alm et Bill, 1992). La rétine est irriguée par les vaisseaux rétiniens superficiels et profonds qui eux-mêmes irriguent les deux tiers internes de la rétine, alors que le dernier tiers, où la demande en oxygène est la plus forte, car elle contient les photorécepteurs, est dépendante d'une diffusion passive venant des vaisseaux de la choroïde.

Le volume sanguin circulant au niveau de la rétine adulte est beaucoup plus faible (~1/20) que celui de la choroïde (Bill, 1981). L'autorégulation y est bonne et la saturation veineuse y est faible comparée à la choroïde où, comme c'est le cas chez le nouveau-né, l'autorégulation est déficiente, voire inexistante et nécessite un débit beaucoup plus élevé afin de subvenir aux besoins métaboliques et maintenir la température de l'oeil. Les capillaires rétiniens ont un diamètre de 5 à 6 μm (Alm et Bill, 1992) et contiennent les cellules endothéliales et les péricytes qui interagissent pour participer à la régulation du

débit sanguin rétinien (Frank *et al.*, 1987; Kelley *et al.*, 1987; Kelley *et al.*, 1988; Alm et Bill, 1992; Haefliger *et al.*, 1994a).

Le réseau capillaire choroïdien est beaucoup plus dense que le réseau capillaire rétinien, car les capillaires rétiniens doivent interférer le moins possible avec la lumière qui doit traverser les couches de la rétine pour frapper les photorécepteurs. Le diamètre des vaisseaux choroïdiens est plus grand : 8 à 15 μm (Alm et Bill, 1992). Le débit sanguin choroïdien est très élevé et l'extraction de l'oxygène y est faible (<5 %) (Alm et Bill, 1970; Bill *et al.*, 1983) comparé à ce qui se passe au niveau de la rétine (~40 %) (Hickam *et al.*, 1963; Tornquist et Alm, 1979).

Régulation du débit sanguin oculaire

L'autorégulation du débit sanguin est intrinsèque et inclut tous les phénomènes qui s'opposent aux variations du flux sanguin (une baisse prononcée = ischémie) ou de la concentration d'oxygène (une baisse prononcée = hypoxie) dans un territoire afin de maintenir un débit sanguin adéquat (malgré des fluctuations de la pression artérielle) et permettre les échanges cellulaires qui répondront aux besoins métaboliques. Chez l'adulte, le débit sanguin rétinien est bien régulé dans un intervalle de pression de perfusion de 45 à 145 mm Hg (Robinson *et al.*, 1986), permettant une oxygénation adéquate (Alm et Bill, 1972b; Hill, 1989). Chez le nouveau-né, cet intervalle est plus étroit, soit 45 à 85 mm Hg (Chemtob *et al.*, 1991) et de récentes études ont mis en évidence une vasoconstriction insuffisante ou une vasodilatation exagérée quand la pression de perfusion est augmentée notamment par des interactions avec les radicaux libres, le NO et les PGs (Hardy *et al.*, 1994; Hardy *et al.*, 1996a; Hardy *et al.*, 1996b; Hardy *et al.*, 1998a; Hardy *et al.*, 1998b). Par contre, alors que chez l'adulte les débits

sanguins choroïdiens sont autorégulés (Kiel et Shepherd, 1992; Kiel, 1994; Kiel et van Heuven, 1995; Yu *et al.*, 1996), cela n'est pas le cas chez le nouveau-né (Chemtob *et al.*, 1991). Par conséquent, le dépassement par la pression de perfusion des limites supérieures de l'autorégulation amène un excès d'oxygène trop grand pour les besoins métaboliques. L'oxygène en excès sera la source d'une génération d'espèces oxygénées hautement réactives (ROS). La peroxydation lipidique qui s'en suit participe alors à des dommages cellulaires à l'origine du développement de rétinopathies ischémiques comme la ROP (Tripathi et Tripathi, 1984; Penn, 1990; Penn *et al.*, 1997). Ces mécanismes ont un rôle important à jouer dans l'incidence de la vaso-oblitération rétinienne, préambule à la rétinopathie proliférative. Plusieurs éléments entrent en jeu dans la régulation des débits sanguins oculaires, domaine où les données sur la rétine sont plus nombreuses que les données sur la choroïde. Il sera brièvement fait mention de cinq facteurs influençant la régulation : la réponse myogénique, l'innervation, l'oxygène, le dioxyde de carbone et les facteurs dérivés de l'endothélium.

Réponse myogénique

Malgré des contradictions, il semble que l'endothélium joue un rôle de mécanorécepteur pour traduire les pressions transmuraux ou forces de cisaillement en réponse myogénique (Rubanyi *et al.*, 1990) par la libération de facteurs relaxants (Hassésian *et al.*, 1993) ou constricteurs (Chillon *et al.*, 1997) dont il a été question dans les sections précédentes.

Innervation

La vascularisation rétinienne est peu ou pas innervée par le système nerveux autonome (Bill, 1981) contrairement à la choroïde (Ehinger, 1966; Laties, 1967; Nakanome *et al.*, 1995) qui contient des récepteurs α et β adrénergiques (Bill, 1962; Bruinink *et al.*, 1986; Elena *et al.*, 1987; Koss et Gherezghiher, 1993; Koss, 1994; Kiel et Lovell, 1996) et sert à maintenir un débit sanguin adéquat lors d'augmentations soudaines de la pression sanguine (Bill et Nilsson, 1985) alors que le tonus rétinien est plutôt maintenu par des facteurs produits localement.

L'oxygène

La pression artérielle partielle d'oxygène (PaO_2) a une grande influence sur la régulation du débit sanguin rétinien. Chez l'humain, une baisse de la PaO_2 provoque une vasodilatation limitée ($\sim 10\%$ à 60 mm de Hg de PaO_2 (Eperon *et al.*, 1975)) compensée par une redistribution du débit sanguin au niveau des microvaisseaux rétiens (Kiryu *et al.*, 1995) dont le mécanisme demeure inconnu, mais impliquerait les péricytes (Ferrari-Dileo *et al.*, 1992). Lorsque la PaO_2 est très élevée, le métabolisme oxydant rétinien est grandement réduit (Baeyens *et al.*, 1973). L'hyperoxie a un effet constricteur, tant chez l'adulte (Hickam et Frayser, 1966; Tsacopoulos *et al.*, 1974; Hague *et al.*, 1988) que chez le nouveau-né (Ricci, 1987; Stiris *et al.*, 1989a; Stiris *et al.*, 1989b). La vascularisation de la couche interne est relativement bien régulée (Alm et Bill, 1972a) par constriction (Hickam et Frayser, 1966), alors que ce n'est pas le cas pour la couche externe (Linsenmeier et Yancey, 1989). Chez l'humain, l'inhalation d'oxygène pur (100 % O_2) réduit le débit sanguin de 70 % (Riva *et al.*, 1983) par vasoconstriction. Les mécanismes impliqués dans la vasoconstriction sont mal connus, mais les études chez le porc

nouveau-né ont démontré des rôles joués par le TXA₂, 20-HETE, ET-1, les radicaux libres et les PGs (Hardy *et al.*, 1994; Hardy *et al.*, 1996b; Hardy *et al.*, 1998b; Zhu *et al.*, 1998).

Les effets de l'hyperoxie sur les débits choroïdiens sont mal connus. Chez le nouveau-né, l'hyperoxie cause une vasoconstriction importante due aux radicaux libres et est contrebalancée de façon exagérée par une augmentation de la synthèse et des effets du NO, rendant le tissu oculaire du sujet nouveau-né particulièrement sensible aux effets d'une augmentation de la PaO₂ (Hardy *et al.*, 1996a; Hardy *et al.*, 1996b).

Dioxyde de carbone

Une augmentation de la pression partielle de dioxyde de carbone (PaCO₂) affecte autant la rétine que la choroïde. Une augmentation de deux fois la PaCO₂ normale (40 mm de Hg) cause une grande vasodilatation (Riva *et al.*, 1994; Flower *et al.*, 1995) et une augmentation du débit sanguin de l'ordre de 300 à 400 % (Alm et Bill, 1972b). Dans la rétine, les mécanismes régissant cette hausse du débit impliquent une synthèse de PGE₂, stimulant la production de NO par eNOS pouvant être contrée par l'emploi d'un inhibiteur de la cyclooxygénase (COX) (Dumont *et al.*, 1999; Najarian *et al.*, 2000; Checchin *et al.*, 2002). La simple augmentation de la PaCO₂ est capable à elle seule de provoquer la ROP (Holmes *et al.*, 1998), soulignant ainsi l'importance d'un apport accru en oxygène dans la maladie. À l'inverse, une diminution de la PaCO₂ produit une forte vasoconstriction et une baisse du débit sanguin rétinien de l'ordre de 22 %.

Facteurs endothéliaux

L'endothélium vasculaire de l'œil produit plusieurs agents vasomoteurs afin de réguler les débits sanguins oculaires dont les plus importants vasodilatateurs sont le PGI₂ (Nielsen et Nyborg, 1990; Chemtob *et al.*, 1991) et le NO (Haefliger *et al.*, 1992), alors que l'ET-1 (MacCumber *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1989; Nyborg *et al.*, 1991; Haefliger *et al.*, 1992; Schmetterer *et al.*, 1997), le TXA₂ (Luscher *et al.*, 1992) et le 8-iso-PGF_{2α} (Lahaie *et al.*, 1998) causent une vasoconstriction. Leurs rôles exacts ne sont pas connus, mais de tous ces agents, les prostanoïdes sont de loin les plus étudiés (Pournaras *et al.*, 1978; Flower *et al.*, 1984; Chemtob *et al.*, 1991). Les prostanoïdes sont produits par la rétine (Kass et Holmberg, 1979; Birkle et Bazan, 1984; Flower *et al.*, 1984; Robertson *et al.*, 1990) et la choroïde (Bhattacharjee *et al.*, 1979) et contribuent à déterminer les limites de l'autorégulation des débits sanguins rétinien et choroïdien (Chemtob *et al.*, 1991) principalement la limite supérieure (Chemtob *et al.*, 1991; Hardy *et al.*, 1998b). Chez l'adulte, une augmentation de la pression de perfusion dans la rétine libère PGE₂ et PGF_{2α} pour causer une vasoconstriction (Nielsen et Nyborg, 1990; Abran *et al.*, 1994), alors que cette réponse est négligeable chez le nouveau-né (Abran *et al.*, 1994) en partie due à une régulation à la baisse des récepteurs EP et FP (Mitchell *et al.*, 1978; Abran *et al.*, 1997a; Abran *et al.*, 1997b; Hardy *et al.*, 1998b) en réponse à une concentration plus élevée de prostanoïdes (Abran *et al.*, 1994; Abran *et al.*, 1997a; Abran *et al.*, 1997b). Selon le sous-type de récepteur sur lequel il va agir, PGE₂ peut être un vasoconstricteur (rétine) ou un vasodilatateur (choroïde) (Abran *et al.*, 1997a). PGI₂ et PGD₂ ont aussi un effet relaxant où la réponse observée est plus importante chez le nouveau-né que chez l'adulte (Abran *et al.*, 1997b). Ceci est dû en grande partie à une

régulation ontogénique de la densité des récepteurs ou de la signalisation intracellulaire
(Abran *et al.*, 1997a; Abran *et al.*, 1997b; Hardy *et al.*, 1997; Bouayad *et al.*, 2004).

LA RÉTINOPATHIE DU PRÉMATURÉ

Pathogenèse

La rétinopathie du prématuré ou rétinopathie obstructive proliférative (ROP) est une maladie qui affecte le prématuré d'autant plus qu'il est de faible poids ou âge gestationnel. Les conséquences de la pathologie sont variées et peuvent aller de la rémission totale à des déficits fonctionnels, tels que la myopie, le strabisme, l'amblyopie, des difficultés à différencier les couleurs et enfin, dans les cas les plus graves, la cécité (Gallo *et al.*, 1991; Hack *et al.*, 1994; Dobson *et al.*, 1995; Seaber *et al.*, 1995; Hebbandi *et al.*, 1997). La ROP représente la deuxième plus importante cause de cécité dans les pays industrialisés avec 6 % à 18 % des cas de cécité (Gilbert *et al.*, 1997). La ROP a été décrite pour la première fois par Terry en 1942 et on a tôt fait de l'associer à l'exposition des prématurés à de fortes concentrations d'oxygène (Ashton *et al.*, 1953; Kinsey, 1956; Flynn *et al.*, 1992) nécessaires pour pallier la détresse respiratoire et maintenir les organes vitaux comme le cerveau. La maladie se caractérise par deux phases distinctes : 1) une oblitération et dégénérescence des capillaires des microvaisseaux rétiniens (vaso-oblitération) contribuant à créer un environnement hypoxique dans le tissu suivi de 2) une angiogenèse anarchique (néovascularisation) dirigée en partie vers le corps vitré causant une traction sur la rétine (Ashton, 1966; Penn *et al.*, 1994; Reynaud et Dorey, 1994). La perte des capillaires est due à une cytotoxicité spécifique des cellules endothéliales qui sont particulièrement sensibles à l'hyperoxie (D'Amore et Sweet, 1987; McLeod *et al.*, 1996) et non pas à une simple vasoconstriction excessive (Penn, 1990). De plus, il existe une corrélation directe et positive entre la sévérité de la ROP et la durée d'exposition à l'oxygène (Ricci et Calogero, 1988). La vaso-oblitération est le point crucial du

développement de la maladie et moins elle est accentuée, moins la néovascularisation et la sévérité de la ROP le seront (Penn *et al.*, 1994).

Développement normal de la vascularisation rétinienne

Malgré des décennies d'études, le développement de la vascularisation rétinienne est un phénomène encore mal compris de nos jours. Il semble que la vascularisation qui se développe soit taillée sur mesure selon les besoins du tissu rétinien. C'est pourquoi certaines espèces naissent avec une absence partielle ou totale de vascularisation rétinienne qui persiste si la circulation choroïdienne réussit à subvenir aux besoins métaboliques. Alors que tout le monde s'accorde pour dire que la couche profonde vasculaire, qui va de façon radiale de la couche superficielle à la couche plexiforme externe, est formée par angiogenèse à partir de la couche préexistante, le doute subsiste quant à l'origine de la couche superficielle. On a longtemps pensé que les cellules fusiformes (*spindle cells*), présentes avant la formation de vaisseaux, étaient des angioblastes, précurseurs des cellules endothéliales, mais elles ont récemment été identifiées dans un modèle murin comme étant des astrocytes immatures (Fruttiger, 2002). Le développement de cette couche ne se ferait donc pas par vasculogenèse, c'est-à-dire par formation de vaisseaux sanguins et par différenciation et organisation des précurseurs mésenchymateux et angioblastiques, mais plutôt par angiogenèse, c'est-à-dire la formation de vaisseaux par prolifération et migration de cellules endothéliales à partir de vaisseaux déjà existants. Le développement se fait du disque optique vers la périphérie à partir de vaisseaux qui croissent à partir de la circulation hyaloïde selon un mécanisme strict, régulé par la demande métabolique du tissu et le VEGF (Stone et Maslim, 1997b)

produit par les astrocytes en réponse à une hypoxie physiologique (Ling et Stone, 1988; Chan-Ling *et al.*, 1990).

Lors d'une hypoxie, le VEGF est régulé à la hausse et à la baisse en hyperoxie dans plusieurs modèles animaux dont ceux du chaton et du raton (Stone *et al.*, 1995). L'activité transcriptionnelle de l'ARNm VEGF est augmentée et le messager voit sa demi-vie ($t_{1/2}$) multipliée par un facteur de 4 à 8 fois (Stein *et al.*, 1995). Le gène de VEGF est principalement régulé par le facteur de transcription *hypoxia-induced factor* (HIF)-1 α dont un élément de réponse est contenu sur le promoteur du gène. En condition non hypoxique, HIF-1 α est rapidement ubiquitiné et dégradé par les protéasomes (Salceda et Caro, 1997; Huang *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1999). Lorsque la demande métabolique augmente, le tissu subit une « hypoxie physiologique » rapidement prise en charge par l'inhibition des mécanismes de destruction (Sutter *et al.*, 2000) et la phosphorylation de HIF-1 α qui stimule l'expression de VEGF par les astrocytes situés quelques microns en amont de la vascularisation et s'étendant du disque optique à la périphérie pour former la couche superficielle (Stone *et al.*, 1995). Les astrocytes sont donc capables de détecter directement une baisse de la tension en oxygène (Stone *et al.*, 1995). Durant le développement rétinien chez le raton, le VEGF est exprimé par deux types cellulaires précis de la macroglie rétinienne, les astrocytes et les cellules de Müller (Stone *et al.*, 1995). Les astrocytes confinés à la surface interne de la rétine sont associés au développement de la couche superficielle et les cellules de Müller qui s'étendent de façon radiale de la membrane limitante interne à membrane limitante externe sont associées à la formation de la couche profonde à partir des vaisseaux déjà formés de la couche superficielle. Dans les astrocytes de raton, on détecte la présence de VEGF de P0

à P7, alors que, dans les cellules de Müller, la présence de VEGF est détectée de P7 à P14, allant de pair avec l'augmentation de la demande métabolique et le développement de la couche profonde. Les astrocytes et les cellules de Müller fournissent donc le VEGF et servent de support matriciel à la formation du nouveau réseau sanguin. Le développement anarchique d'une nouvelle vascularisation dans toutes les directions et au-delà la couche limitante interne vers le corps vitré fait aussi intervenir l'angiogenèse. Pour la différencier du processus normal, elle a été appelée « néovascularisation ».

La néovascularisation rétinienne

La néovascularisation, telle qu'observée dans la ROP et la RD, ne serait que l'exagération des mécanismes de croissance normaux faisant intervenir aussi des facteurs de croissance et autres facteurs n'ayant habituellement qu'un rôle marginal dans la physiologie vasculaire normale de l'œil. Dans un modèle d'OIR, lorsque les sujets rendus ischémiques par la première phase de la maladie (vaso-oblitération, voir section suivante) retournent à des concentrations d'oxygène plus basses, il s'ensuit une hypoxie qui engendre une phase d'angiogenèse anarchique, la néovascularisation. Les nouveaux vaisseaux, qui n'ont plus le support des astrocytes, endommagés par la période d'hypoxie prolongée (Zhang et Stone, 1997), croissent sans ordre et finissent par envahir le corps vitré. On assiste donc à un déséquilibre entre les facteurs proangiogéniques et antiangiogéniques. Parmi les facteurs proangiogéniques, le VEGF est le plus important. La concentration de VEGF est élevée dans l'humeur aqueuse d'enfants aux prises avec la ROP (Aiello *et al.*, 1994). Le VEGF est induit par HIF-1 α (Berra *et al.*, 2000), alors que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) diminuent l'accumulation de ce dernier lors d'hypoxie (Jones *et al.*, 2002). L'adénosine relâchée en période d'ischémie (Roth *et*

al., 1997) est aussi capable d'induire HIF-1 α via son récepteur A₂ (Takagi *et al.*, 1996c; Takagi *et al.*, 1996d; Grant *et al.*, 1999). Le NO régule aussi l'activité du VEGF, médie ses effets mitogéniques sur la cellule endothéliale et régule à la hausse, dans ce qui semble être une boucle de rétroaction positive, la synthèse de VEGF dans les cellules musculaires lisses (Morbidegli *et al.*, 1996; Jozkowicz *et al.*, 2001).

VEGF

Les deux récepteurs majeurs de VEGF, VEGFR-1 et VEGFR-2 sont présents dans la rétine (Kim *et al.*, 1999). VEGFR-1 fait la promotion de la formation des tubes à partir de l'endothélium et est responsable de l'effet de VEGF sur la perméabilité vasculaire. VEGFR-2, pour sa part stimule la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales. La signalisation intracellulaire se fait par les domaines à activité tyrosine kinase qui phosphorylent PI3-K et la phospholipase C (PLC), cette dernière produit l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG), cette dernière active de la protéine kinase C (PKC), en particulier l'isoforme PKC β (Aiello, 1997). PKC β serait responsable de l'induction de la croissance cellulaire endothéliale. La voie cellulaire anti-apoptotique Akt/PKB activée par VEGF, dont il sera question à la section suivante, est médiée par des mécanismes dépendants de PKC et PI3-K (Gerber *et al.*, 1998; Glick *et al.*, 2002).

Plusieurs thérapies expérimentales sont à l'essai pour tenter d'enrayer les effets néovascularisants de VEGF. Parmi celles-ci, on retrouve les anticorps anti-VEGF (Zhu *et al.*, 2002), les récepteurs solubles (Kendall et Thomas, 1993), les antisens (Robinson *et al.*, 1996) et les inhibiteurs de kinases (Seo *et al.*, 1999; Ozaki *et al.*, 2000). Malheureusement, toutes ces thérapies présentent plusieurs inconvénients : problèmes d'accès au récepteur, dégradation trop précoce de l'agent ou encore l'inhibition de

mécanismes physiologiques. Pour toutes ces raisons, d'autres facteurs pouvant jouer un rôle dans la néovascularisation sont à l'étude.

GH, IGF et somatostatine

La *growth hormone* (GH) joue un rôle important dans l'angiogenèse lors du développement en induisant l'*insulin-like growth factor* (IGF)-1 qui est exprimé par l'endothélium rétinien, les péricytes et les cellules gliales (Lee *et al.*, 1992). L'emploi chez des souris en hyperoxie, de MK 678, un antagoniste de la GH, montre que la sévérité de la néovascularisation coïncide avec les niveaux de GH et de IGF-1 (Smith *et al.*, 1997a). Par contre, IGF-1 serait important pour le développement normal, puisque les prématurés qui ont des taux plus élevés de IGF-1 développent une meilleure vascularisation et ne développent pas la ROP (Hellstrom *et al.*, 2001a). Donc, l'utilisation d'un agoniste d'IGF-1 demanderait un synchronisme et un dosage parfait pour que la thérapie soit efficace.

La somatostatine est un peptide endogène qui module la relâche d'autres hormones comme la GH et l'insuline. Ses analogues inhibent l'angiogenèse dans les modèles animaux de décollement rétinien (Baudouin *et al.*, 1995; Demir *et al.*, 1999). Ils ont été testés dans un modèle d'OIR induite chez la souris et montrent de bons résultats d'inhibition (Higgins *et al.*, 2002).

Les intégrines

Les intégrines pourraient aussi avoir un rôle à jouer dans la néovascularisation. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur endothélial pour plusieurs composantes extracellulaires incluant les vitronectines et les métalloprotéases. On ne la retrouve que sur les cellules

endothéliales qui prolifèrent, dont celles qui composent la vascularisation pré-rétinienne dans les modèles d'OIR (Takagi *et al.*, 2002). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est absente des cellules endothéliales des vaisseaux rétiens normaux (Friedlander *et al.*, 1996; Luna *et al.*, 1996). Des injections i.p. d'un antagoniste sélectif $\alpha_v\beta_3$ inhibe la liaison de la vitronectine et inhibe complètement la néovascularisation.

Pigment epithelium-derived factor, angiostatine et endostatine

Le *pigment epithelium-derived factor* (PEDF) est le plus puissant inhibiteur de l'angiogenèse rétinienne (Tombran-Tink *et al.*, 1991), plus puissant que l'endostatine, l'angiostatine et thrombospondine (TSP)-1. Son expression est associée aux vaisseaux de la rétine et de la choroïde (Kim *et al.*, 2003). Il empêche la migration des cellules endothéliales par des inducteurs aussi puissants que le VEGF, l'interleukine IL-8, le *acidic fibroblast growth factor*, l'acide lysophosphatidique (LPA). Son niveau est bas durant le développement et la néovascularisation et il est élevé durant l'hyperoxie (Dawson *et al.*, 1999). De récentes études ont montré que l'administration intravitréenne ou systémique de PEDF exogène inhibe l'angiogenèse dans un modèle de OIR sans interaction avec la vascularisation préexistante (Stellmach *et al.*, 2001; Duh *et al.*, 2002).

Il en est de même avec l'angiostatine (Drixler *et al.*, 2001) qui n'est pas normalement exprimée dans le vitré, mais comme on le détecte en réponse à une thérapie de photocoagulation rétinienne chez les patients diabétiques (Spranger *et al.*, 2000), il est soupçonné d'être en partie responsable des effets bénéfiques de la thérapie.

Quant à l'endostatine, il s'agit d'un fragment de 20 kDa du collagène XVIII et c'est un autre puissant inhibiteur de l'angiogenèse. L'endostatine a été retrouvée dans le vitré de patients atteints de RD et les résultats montrent une corrélation négative entre les

niveaux d'endostatine et la sévérité de la rétinopathie (Noma *et al.*, 2002). Son utilisation dans un modèle murin d'OIR provoque une diminution de la néovascularisation (Auricchio *et al.*, 2002).

La thrombospondine

La TSP-1 fait partie d'une famille de cinq protéines sécrétées dans la matrice extracellulaire de nombreux tissus. Elle inhibe la prolifération cellulaire endothéliale, la migration et l'angiogenèse vraisemblablement en induisant l'apoptose de la cellule endothéliale (Shafiee *et al.*, 2000). Les cellules néovasculaires stimulées avec VEGF synthétisent et sécrètent TSP-1 probablement comme mécanisme de rétroaction négative en réponse à la prolifération (Suzuma *et al.*, 1999). Dans un modèle d'OIR chez le rat, TSP-1 et des peptidomimétiques inhibent la néovascularisation prérétinienne laissant intacte la vascularisation intrarétinienne sans doute parce le poids moléculaire des substances ne leur permet pas de franchir la membrane limitante interne (Shafiee *et al.*, 2000).

Platelet-derived growth factor et tumor necrosis factor

Le PDGF est un puissant mitogène et chémoattractant. Il s'agit d'un dimère dont il existe deux formes PDGF-A et PDGF-B. Il est surtout associé à la RD, au cours de laquelle il est trouvé de même que ses récepteurs dans les membranes épirétinales (Robbins *et al.*, 1994a; Robbins *et al.*, 1994b), ainsi que dans le vitré (Freyberger *et al.*, 2000). Les souris transgéniques qui surexpriment le PDGF-B développent une prolifération de cellules endothéliales, de péricytes et de cellules gliales allant jusqu'au décollement de la rétine (Mori *et al.*, 2002a; Mori *et al.*, 2002b; Mori *et al.*, 2002c;

Vinores *et al.*, 2003). L'hypoxie stimule l'expression de PDGF-B dans les cellules endothéliales (Kourembanas *et al.*, 1990) et PDGF-B collaborerait avec VEGF dans les rétinopathies ischémiques (Mori *et al.*, 2002a; Mori *et al.*, 2002b; Mori *et al.*, 2002c).

Un autre collaborateur de VEGF serait le TNF α . C'est une protéine transmembranaire de 26 kDa, elle est exprimée dans les rétines humaines lors de rétinopathies proliférantes (Limb *et al.*, 1996; Armstrong *et al.*, 1998) et dans les modèles animaux de néovascularisation (Majka *et al.*, 2002). On retrouve le TNF α dans les cellules de Müller et la couche nucléaire interne, ainsi que dans la couche nucléaire externe d'animaux développant une néovascularisation (Majka *et al.*, 2002). Le TNF α stimule l'expression de plusieurs métalloprotéases nécessaires pour que les cellules endothéliales puissent se frayer un chemin dans la matrice extracellulaire (Majka *et al.*, 2002). Le VEGF régule l'enzyme de conversion de TNF α (TACE) et la présence simultanée de VEGF et TNF α pourrait signifier que ces protéines jouent un rôle dans la régulation de l'expression de protéases durant l'angiogenèse.

Toutes les tentatives de thérapies mentionnées dans les paragraphes précédents sont toutes extrêmement coûteuses et s'éloignent de la source du problème qui est en fait la vaso-oblitération. Nous croyons que si nous sommes capables d'enrayer la première phase de la ROP, il n'y aura pas de néovascularisation subséquente et les inconforts qui y sont reliés seraient supprimés.

La vaso-oblitération rétinienne

Au moins 65 % des enfants prématurés de moins de 1250 g à la naissance souffrent à un degré divers de la ROP (Palmer *et al.*, 1991). Chez les enfants \leq 750 g,

cette statistique augmente à plus de 90 % (Palmer *et al.*, 1991). Dans les cas les plus graves, les traitements modernes comme la coagulation au laser et la cryothérapie visant à réduire les formations de néovascularisation ne constituent une réussite que dans seulement 45 % des cas (Schaffer *et al.*, 1993) et laissent des dommages permanents à la rétine. Penn et ses collègues (1994) ont démontré que plus on atténuait la vaso-oblitération qui est la première phase de la maladie, moins la ROP était sévère (Penn *et al.*, 1994). Pour cette raison, la vaso-oblitération devrait être plus étudiée afin de percer les mécanismes qui y sont impliqués.

La prématurité et l'exposition à de fortes concentrations d'oxygène semblent être les éléments les plus importants dans la pathogenèse de la maladie. L'hyperoxie relative (PO_2 intra-utérine *versus* PO_2 extra-utérine) est néfaste (Flower, 1990) et toutes conditions *extra utero* sont hyperoxiques pour le sujet prématuré. La PO_2 *in utero* est en moyenne de 32 mm de Hg dans la veine ombilicale et de 22 mm de Hg dans l'aorte descendante (Teitel, 1992; Taeusch et Ballard, 1998). La ventilation mécanique tente de maintenir une PO_2 de 50 mm de Hg, mais elle excède souvent 100 mm de Hg (Weinberger *et al.*, 2002). Chez les enfants nés avant terme, la rétine n'est pas prête à assumer la charge d'un stress oxydant (Oliver et Newsome, 1992), ce qui fait que plus de 27 % des enfants nés avant 28 semaines développent une ROP persistante lorsqu'on maintient des niveaux d'oxygène suffisant pour assurer une saturation physiologique en O_2 de l'hémoglobine entre 88-98 %, alors que seulement 6 % vont développer la ROP si elle est maintenue entre 70-90 % (Tin *et al.*, 2001). Les enfants nés à terme ne développent jamais les symptômes de la ROP et chez les enfants mis en incubateur à un âge tardif, l'incidence de la maladie diminue considérablement (Gibson *et al.*, 1990). Les

adultes qui développent une rétinopathie diabétique, une maladie qui débute par une perte des péricytes rétiens et une phase vaso-oblitérative semblable à celle qui se produit dans la ROP, le font généralement entre 10 et 15 ans après le diagnostic de la maladie (Lonchamp *et al.*, 2001). La maturation protège donc des effets toxiques de l'oxygène à partir de la 36^e semaine d'âge post-conception chez l'homme (Petersen *et al.*, 1994), de la 3^e semaine postnatale chez la souris (Smith *et al.*, 1994) et du 10^e jour postnatal chez le rat (Benjamin *et al.*, 1998).

Plusieurs modèles animaux sont utilisés pour induire la ROP. Parmi ceux-ci, citons les modèles développés pour l'étude de la ROP chez le chaton, le chiot, la souris et le raton. Les chatons ou les chiots à terme ont une vascularisation rétinienne qui ressemble à celle d'un fœtus humain de 28 semaines (Patz, 1957) et mûrissent jusqu'à 21 jours après la naissance (Ricci *et al.*, 1990), mais ils présentent des différences qui en font des modèles controversés (Kretzer *et al.*, 1986) : ils ne présentent pas de *spindle cells* ou d'espaces cystoïdes par lesquels passe la vascularisation pour atteindre la périphérie et les capillaires rétiens internes vont beaucoup plus profondément. Les expériences effectuées pour les besoins de cette thèse ont été faites en utilisant le modèle de rats nouveau-nés exposés à 80 % d'oxygène. À la naissance, le rat nouveau-né a une vascularisation rétinienne équivalant à celle d'un fœtus humain de 24 à 26 semaines (Ricci, 1990). Chez le rat comme chez l'humain, les vaisseaux rétiens proviennent du mésenchyme et forment deux couches de capillaires, une couche superficielle qui est complètement formée vers P11 alors qu'une couche plus profonde se développe jusqu'à P15 (Henkind et DeOliveira, 1967). Il a donc en commun avec l'humain et les primates, le développement du réseau sanguin rétinien, impliquant des types cellulaires semblables,

à partir de l'artère rétinienne centrale qui émerge du nerf optique, ce qui n'est pas le cas avec le chat ou le porc par exemple (Yu *et al.*, 1999). L'hyperoxie chez le rongeur constitue un très bon modèle d'étude de rétinopathie ischémique, puisque c'est le modèle le plus proche de la ROP humaine; de plus, il présente certains aspects cliniques de la rétinopathie diabétique (Campochiaro, 2000).

La rétine représente un tissu particulièrement sensible au stress oxydant. Elle a un taux de consommation d'oxygène très rapide, même en condition normoxique, propice à la formation de ROS (Rodieck, 1973). Elle a le plus haut niveau d'acides gras polyinsaturés (PUFA) de tous les tissus (Daemen, 1973). Les PUFA sont les substrats de choix pour la peroxydation par les ROS et la lumière est un initiateur connu de la formation de radicaux oxygénés (Delmelle, 1979). La prématurité vient compliquer la situation, car la rétine immature n'est pas préparée à faire face à un stress oxydant d'une grande importance. Plusieurs enzymes et antioxydants ne sont pas présents en quantité suffisante pour réduire le stress (Smith *et al.*, 1992; Behndig *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999) et les prématurés ne sont pas capables de réguler la synthèse de la SOD, la catalase ou la glutathion peroxydase (GPx) à la hausse (Frank et Sosenko, 1991). Que cela soit dans les tissus ou le sérum, les prématurés montrent des taux diminués de SOD, vitamine E, β -carotène, GPx (Frank et Sosenko, 1987b; Frank et Sosenko, 1987a; Sullivan et Newton, 1988; Lindeman *et al.*, 1989; McElroy *et al.*, 1992) et une capacité réduite à fabriquer du glutathion (Guertin *et al.*, 1993). Les enfants prématurés naissent avec seulement 10 % des niveaux de vitamine E retrouvés chez l'adulte (Nielsen *et al.*, 1988). Cette observation semble aussi s'appliquer aux modèles animaux puisqu'une supplémentation en vitamine E chez le chaton et le rat réduit la sévérité de la ROP

(Phelps et Rosenbaum, 1977; Penn *et al.*, 1992). Par contre, chez le prématuré, la vitamine E n'est pas la meilleure approche, car les moyens de l'administrer ne sont pas adéquats. La rétine du prématuré n'est pas capable d'utiliser la vitamine E et autres vitamines liposolubles en quantité suffisante, car une protéine essentielle, la *interphotoreceptor retinal binding protein* n'est pas synthétisée avant la fin de la gestation (Kingham, 1986; Nielsen *et al.*, 1988). La sensibilité de la rétine à l'oxygène dépend du stade de développement du tissu (Gu *et al.*, 2002) et c'est donc l'âge gestationnel qui importe (Flynn *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1991). Chez la souris, cette période de sensibilité est de P7 à P9. Plus on s'éloigne de cette période, moins grands sont les dommages lors d'une exposition à 75 % O₂ (Gu *et al.*, 2002). Chez le rat, cette sensibilité est durant la première semaine de vie pour la vascularisation (Benjamin *et al.*, 1998), alors que c'est durant la 2^e semaine de vie pour la rétine neurale (Dembinska *et al.*, 2001).

De façon systémique, tel que mesuré par analyseur de gaz du sang, lorsque le raton inspire 80 % d'oxygène, la PO₂ passe de 90 mm de Hg à ~495 mm de Hg, et le pH et la PCO₂ ne changent pas de façon significative (Yu *et al.*, 1999). Dans le tissu rétinien, les mesures prises par électrodes montrent des augmentations de deux à plus de trois fois la PO₂ normale. Ainsi, au niveau de la couche superficielle de la rétine la PO₂ passe de 20 mm de Hg à ~50 mm de Hg, alors que dans les couches les plus profondes la PO₂ passe de 45 mm de Hg à plus de 175 mm de Hg et toutes ces valeurs sont doublées si on ajoute 5 % CO₂ (v/v) au mélange gazeux (Yu *et al.*, 1999; Yu et Cringle, 2001). L'hyperoxie a un effet vasoconstricteur sur la vascularisation rétinienne et diminue le débit sanguin rétinien (Riva *et al.*, 1983). Chez l'humain, telle que mesurée par laser

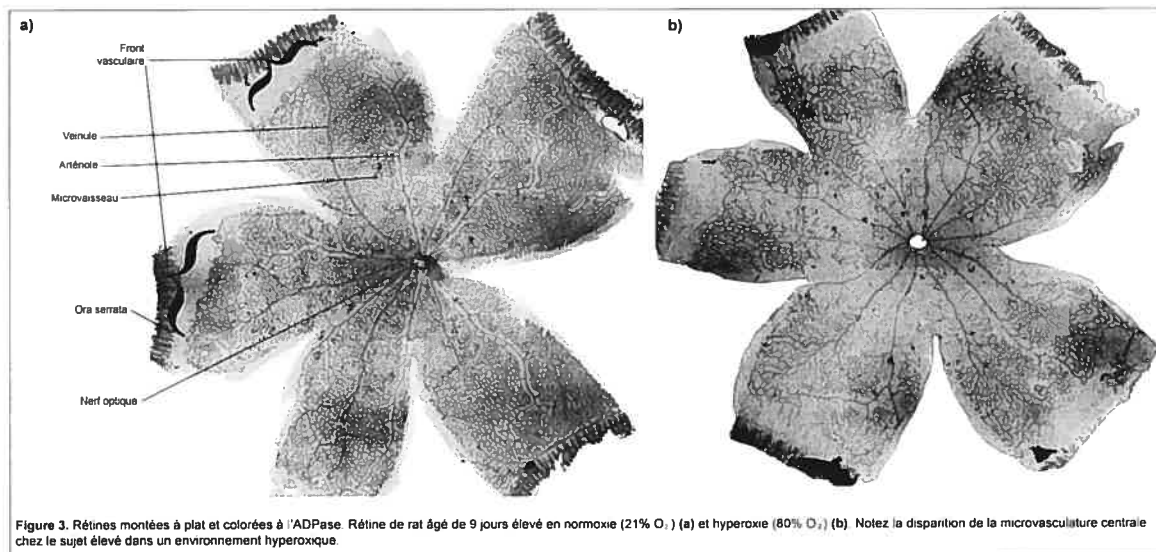
Dopler, la vasoconstriction a lieu 5 minutes après le début de l'inhalation d'oxygène 100% et ce, sans qu'il y ait mécanismes compensatoires ou adaptatifs (Kiss *et al.*, 2002). Durant cette vasoconstriction, l'apport en oxygène est fourni principalement par la choroïde. Par contre, chez le nouveau-né, comme l'indiquent les mesures de cGMP et de nitrites (NO_2^-) dans la choroïde, on remarque une activité augmentée des NOS durant la période périnatale qui se traduit par une plus grande efficacité du NO à vasodilater la vascularisation choroïdienne du nouveau-né contribuant au manque d'autorégulation de la choroïde en hyperoxie (Hardy *et al.*, 1996b). Ce phénomène participe à la pathogenèse de la ROP et on remarque une corrélation directe entre la sévérité de la ROP et la période d'exposition à l'oxygène (Ricci et Calogero, 1988). Par contre, Ricci (1988) a démontré qu'une période aussi longue que 10 jours d'hyperoxie à 80% O_2 jumelée à une pression de 1,80 atm n'avait pas induit la ROP attendue (Ricci et Calogero, 1988). Il explique ce phénomène par une légère vasoconstriction capable de réduire le débit sanguin choroïdien et le transport de l'oxygène de la choroïde vers la rétine interne (Margolis et Brown, 1966; Herstein et Murchland, 1984). Il semble donc qu'un certain degré de vasoconstriction soit souhaitable, puisque des études viennent confirmer cette hypothèse. L'hyperoxie cause une diminution de la concentration rétinienne de PGI_2 (Stuart *et al.*, 1988) et une augmentation de la concentration rétinienne de TXA_2 (Beauchamp *et al.*, 2001) et la balance $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ est critique pour maintenir la régulation du tonus vasculaire (Flower *et al.*, 1984; Nielsen et Nyborg, 1990; Katusic, 1996). L'hyperoxie cause une diminution de l'activité SOD (plus grand pour la Cu-Zn-SOD que la Mn-SOD), tel que démontré dans l'étude de la rétine de rats et de chats exposés à 80% O_2 (Bougle *et al.*, 1982; Niesman *et al.*, 1997). De plus, chez le rat, une exposition à 60 %

O₂ durant 14 jours produit une perte de 26 % de la vitamine E (Penn, 1990). Tous ces phénomènes contribuent au développement de la première phase de la ROP, la vaso-oblitération.

La vaso-oblitération rétinienne est un phénomène unique au tissu rétinien immature et n'est constatée nulle part ailleurs (Claxton et Fruttiger, 2003). La vaso-oblitération a été décrite formellement pour la première fois dans les années 1950 par Ashton et ses collègues (1953) (Ashton *et al.*, 1953). Ils remarquaient une oblitération des vaisseaux capillaires rétiens d'animaux soumis à une forte concentration d'oxygène. Le phénomène était observable dans tous les modèles animaux dont le sujet présente une vascularisation rétinienne immature à la naissance. On a d'abord cru que le phénomène était dû à la diminution du débit sanguin imputable à la vasoconstriction secondaire en réponse à l'hyperoxie pour ensuite se rendre à l'évidence que la vaso-oblitération résulte des effets toxiques de l'oxygène (Ashton et Pedler, 1962; Penn, 1990) (Fig. 3, page 41). En plus des effets toxiques sur la vascularisation, l'hyperoxie cause une atteinte de la fonctionnalité de la rétine. Sur un tracé d'électrorétinogramme (ERG), l'hyperoxie diminue l'amplitude de l'onde b, tant des bâtonnets que des cônes, sans toutefois affecter l'onde a de façon significative (Penn *et al.*, 1988; Lachapelle *et al.*, 1999; Dembinska *et al.*, 2001; Dembinska *et al.*, 2002). L'atteinte fonctionnelle de la rétine est associée à un amincissement de la couche plexiforme externe et à une perte de cellules horizontales (Lachapelle *et al.*, 1999; Dembinska *et al.*, 2001). Certaines évidences nous portent à croire que la prévention de la vaso-oblitération préviendrait aussi la perte de fonctionnalité de la rétine. Il devient donc doublement intéressant de comprendre les

mécanismes qui régissent la vaso-oblitération rétinienne induite par une trop grande concentration d'oxygène.

Ashton (Ashton, 1966) a décrit la vaso-oblitération comme étant une exagération des processus normaux de vascularisation, de rétraction et de migration. Mais qu'en est-il vraiment? D'abord, on remarque une oblitération des vaisseaux chez les animaux soumis



à une forte concentration d'oxygène. Les capillaires se ferment après seulement six heures à 80 % de O₂ et une dégénérescence plus tardive de la cellule endothéliale s'ensuit (Ashton, 1963). Des changements sont perceptibles, tant au niveau nucléaire que cytoplasmique. La dégénérescence endothéliale est accompagnée de pycnose et de caryorrhexis laissant un squelette capillaire composé de fins morceaux de membrane basale. Les vaisseaux de plus gros calibre ne sont pas affectés et dans le but de maintenir la circulation, il y a apparition de shunts artérioveineux surtout en périphérie. Ces phénomènes ont été observés chez des bébés de 7 mois de gestation, avant l'apparition des péricytes intramuraux (Cogan et Kuwabara, 1963) excluant par le fait même toute implication des péricytes dans l'apparition des shunts. Ces phénomènes se reproduisant

chez le prématuré ressemblent tellement à ce qui est observé dans la RD qu'on se demande alors si les mêmes mécanismes ne seraient pas à l'œuvre.

Des études en microscopie électronique montrent que les dommages sont exclusifs aux cellules endothéliales des vaisseaux immatures (Ashton et Pedler, 1962). Ashton a fait des cultures d'explants rétiniens pour constater qu'ils étaient complètement détruits après 30 heures d'exposition à l'oxygène pur. Il y voyait une rétraction, une migration et une désintégration des cellules endothéliales (Ashton, 1966). Il fallait néanmoins 18 heures avant de pouvoir faire les premières observations et 24 heures pour observer des dommages vraiment sévères, alors que pratiquement tout était détruit à ~48 heures. Il y aurait donc un point de non-retour, une étape d'activation après laquelle la dégénérescence est irréversible (Allison, 1965).

Chez le raton, les conséquences d'une exposition à l'oxygène sont évidentes : 1) retards de croissance à la périphérie de la rétine; 2) vaso-oblitération des vaisseaux centraux (microvaisseaux et capillaires périartériels) et perte de densité vasculaire de l'ordre de 40 %; 3) perte totale de la vascularisation profonde (Penn, 1990) (Fig. 3, page 41). Les péricytes, tout comme les astrocytes et les cellules de Müller, sont beaucoup moins sensibles aux effets toxiques de l'oxygène (Ashton, 1963; Ashton, 1966; Beauchamp *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2002), mais ils ont quand même un rôle à jouer dans l'évolution de la vaso-oblitération (voir ci-dessous).

La vaso-oblitération observée lors de l'hyperoxie implique une régulation à la baisse de VEGF (Alon *et al.*, 1995; Pierce *et al.*, 1996) et de IGF-1 (Smith *et al.*, 1997b), une stimulation de l'apoptose dans les cellules endothéliales (Alon *et al.*, 1995), une augmentation de l'expression de PEDF (Dawson *et al.*, 1999) et de eNOS (Brooks *et al.*,

2001; Beauchamp *et al.*, 2004), ainsi que du *placental growth factor* (PlGF)-2 (Khaliq *et al.*, 1999). Stimulée par HIF en réponse à l'hypoxie, la cellule endothéliale produit du VEGF (Shweiki *et al.*, 1992). Le VEGF est un agent mitogène pour la cellule endothéliale (Ferrara et Henzel, 1989; Keck *et al.*, 1989). C'est un puissant facteur angiogénique (Dvorak *et al.*, 1995), il augmente la perméabilité et stimule la production de collagénase (Unemori *et al.*, 1992). L'arrêt soudain de croissance vers la périphérie de la rétine est médié par l'inhibition du VEGF par l'hyperoxie (Stone *et al.*, 1995) jumelée à une régulation à la hausse de PEDF, un puissant facteur antiangiogénique (Dawson *et al.*, 1999). Alors que nous sommes certains du rôle du VEGF dans la prévention de l'apoptose des cellules endothéliales (Alon *et al.*, 1995), la contribution respective des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 trouvés dans la rétine est encore nébuleuse. Le VEGFR-2 jouerait un rôle négligeable dans le développement normal de la vascularisation rétinienne, alors qu'il jouerait un rôle très important dans la phase de néovascularisation puisqu'un anticorps antiKDR n'affecte pas le développement normal, mais prévient la ROP chez le chien (McLeod *et al.*, 2002). Dans la même veine, VEGF, en se liant à son récepteur VEGFR-2, prévient l'apoptose des cellules endothéliales en culture (Gerber *et al.*, 1998) et dans un modèle animal de ROP (Alon *et al.*, 1995; Upalakalin *et al.*, 2002), alors que l'usage d'un agoniste spécifique pour le VEGFR-1, le PlGF-1 peut prévenir de façon modeste la vaso-oblitération dans un modèle de souris (Shih *et al.*, 2003). Chez les rongeurs, dans la rétine ou ailleurs, seul PlGF-2 produit par les ganglions rétiniens a été mis en évidence (DiPalma *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 1999); il inhibe la prolifération endothéliale (Khaliq *et al.*, 1999), mais son rôle exact demeure peu connu. Peu importe le récepteur sur lequel il agit, VEGF est un facteur de survie

nécessaire à la vascularisation immature (Alon *et al.*, 1995) grâce à un mécanisme impliquant la stimulation de la voie PI3-kinase/Akt kinase (Gu *et al.*, 2003). Le VEGF est un facteur important dans le phénomène de sensibilité des vaisseaux immatures, alors qu'il l'est de façon plus modeste chez l'adulte. Même si les vaisseaux rétiniens adultes sont plus résistants aux dommages causés par l'hyperoxie (Ashton, 1968; Patz, 1984), les souris adultes montrent une perte de densité capillaire après trois semaines en hyperoxie (Duhault *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1999). La mort est apoptotique et est accompagnée d'une chute d'ARNm de VEGF dans la rétine. Par contre, le VEGF ne jouerait pas un rôle aussi important dans la rétine mature que dans la rétine immature puisque la rétine mature peut survivre beaucoup plus longtemps sans VEGF et surtout reçoit des signaux de survie cellulaire de la matrice extracellulaire. Enfin, les vaisseaux ne peuvent être protégés par l'emploi de VEGF exogène (Yamada *et al.*, 1999) indiquant que d'autres facteurs sont en jeu. Au niveau du développement, le VEGF est impliqué dans le processus normal de raréfaction capillaire se produisant autour des artérioles, un phénomène remarqué par Michaelson et ses collègues (Michaelson *et al.*, 1954) d'abord, puis par Engerman et Meyer (Engerman et Meyer, 1965) et par Ashton (Ashton, 1970). La PO₂ artérielle étant plus forte dans la périphérie immédiate des artérioles, la diffusion de l'oxygène dans les tissus ne nécessite pas autant de capillaires que près du côté veineux où la PO₂ est plus faible. Il y aurait donc une régulation à la baisse de VEGF et une apoptose des capillaires superflus, et ce, surtout autour des artérioles et de la tête du nerf optique (Alon *et al.*, 1995; Claxton et Fruttiger, 2003). L'IGF-1, un autre facteur de croissance, pourrait être impliqué dans le développement de la ROP (Hellstrom *et al.*, 2001b). La concentration d'IGF-1 est proportionnelle au poids de naissance (Bennett *et*

al., 1983; Giudice *et al.*, 1995) et à l'âge gestationnel (Lineham *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1997b). Provenant du placenta et du liquide amniotique, la concentration d'IGF-1 n'est pas maintenue aux niveaux *in utero* après la naissance (Smith *et al.*, 1997b) et pourrait représenter un autre facteur déterminant la survie cellulaire. Un autre facteur de survie qui semble important est la présence de péricytes rétiens. Le VEGF, ainsi que l'angiopoïétine/Tie 2 déjà impliquée dans la maturation et l'intégrité vasculaire, seraient responsables du recrutement des péricytes (Sato *et al.*, 1995; Suri *et al.*, 1996; Benjamin *et al.*, 1998).

Deux théories ont cours sur l'origine des péricytes. Ils proviendraient d'une différenciation *in situ* de précurseurs mésenchymateux par des facteurs solubles au moment de l'émergence des cellules endothéliales (Nehls *et al.*, 1992) ou encore de la migration et de la dédifférenciation de cellules musculaires lisses artérielles (Nicosia et Villaschi, 1995). Dans la rétine, ils ont un rôle d'inhibition de la croissance cellulaire endothéliale par la sécrétion de TGF- β (Orlidge et D'Amore, 1987) et l'inhibition de la migration (Sato et Rifkin, 1989). Selon Benjamin et ses collègues (Benjamin *et al.*, 1998), les péricytes sont recrutés par les cellules endothéliales recouvrant d'abord les branches primaires, secondaires puis tertiaires. Chez le rat, seules les artères majeures sont recouvertes par les péricytes à P2. Pour les vaisseaux de plus petits calibres, les péricytes sont absents durant la première semaine suivant la naissance chez le rat et n'apparaissent que vers P10, ceci coïncidant avec la fin de la période de sensibilité de la vascularisation rétinienne superficielle (Benjamin *et al.*, 1998). Cette période serait nécessaire pour évaluer les besoins d'approvisionnement en oxygène de la rétine et ainsi éliminer les capillaires en trop (Benjamin *et al.*, 1998). En régulant à la baisse le VEGF,

l'hyperoxie empêche de recruter les péricytes laissant les cellules endothéliales plus sensibles aux effets de l'oxygène (Benjamin *et al.*, 1998). Alors que le recrutement dépend de VEGF, leur migration vers les capillaires dépend de PDGF-B (Lindahl *et al.*, 1997). Dans la RD, on observe une chute dramatique du nombre de péricytes (*pericyte drop out*), juste avant la vaso-oblitération (Speiser *et al.*, 1968). À très long terme (10 à 15 ans), les péricytes sont affectés par le stress oxydatif causé par une glycémie trop élevée (Lonchampt *et al.*, 2001). Dans la RD, on a mis en évidence par essai TUNEL (voir page 125), l'apoptose dans les capillaires rétiniens, des péricytes et des cellules endothéliales (Kerr *et al.*, 1994; Majno et Joris, 1995; Mizutani *et al.*, 1996). Un signal TUNEL positif très brillant, signe de nombreuses cassures double brins dans l'ADN, confirme une mort qui se différencie de la fragmentation non spécifique qu'on pourrait observer en fin de nécrose (Gold *et al.*, 1994). Il semble donc que les péricytes protègent la vascularisation contre les dommages causés par le stress oxydatif.

Les astrocytes sont importants dans le développement rétinien. Les précurseurs des astrocytes migrent par le nerf optique vers la périphérie et leur étalement à partir du disque optique est suivi de près par le développement de la vascularisation rétinienne superficielle (Henkind et DeOliveira, 1967; Chan-Ling *et al.*, 2004). Ils détectent les faibles concentrations d'oxygène et produisent du VEGF (Ling et Stone, 1988; Stone *et al.*, 1995), en plus de servir de support à la vascularisation (Stone et Maslim, 1997a). Malgré des contradictions (Kourembanas *et al.*, 1990; Kuwabara *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1996), plusieurs évidences montrent que la migration des astrocytes est influencée par le PDGF-A (Bucher *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1997) produit par les cellules ganglionnaires (Mudhar *et al.*, 1993; Fruttiger *et al.*, 1996; Reneker et Overbeek, 1996; Yamada *et al.*,

2000). L'hyperoxie n'a pas d'effet cytotoxique sur les astrocytes (Beauchamp *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2002) et n'affecte pas les niveaux de PDGF-A. Cependant, elle retarde leur stellation et la production de VEGF (Zhang et Stone, 1997; Zhang *et al.*, 1999). L'hypoxie prolongée a aussi un effet sur les astrocytes qui dégèrent, ce qui permettrait à la croissance des cellules endothéliales de rattraper celle des astrocytes, laissant la vascularisation rétinienne sans matrice lors du retour à la normoxie, favorisant ainsi un développement anarchique de la vascularisation (Zhang et Stone, 1997).

Un type cellulaire rarement associé à la vaso-oblitération est la cellule de Müller. Chez le chien, la vaso-oblitération est marquée par une perte de l'activité de la glycoprotéine 5' nucléotidase (5'N) située dans certains domaines des cellules de Müller (Braun *et al.*, 1995). La 5'N produit l'adénosine, un vasodilatateur capable de prévenir les dommages tissulaires qui se produisent durant l'ischémie (Rudolphi *et al.*, 1992b; Rudolphi *et al.*, 1992a; Sciotti *et al.*, 1992; Sciotti et Van Wylen, 1993) et est régulée à la hausse durant la phase ischémique (Roth *et al.*, 1997). Dans la rétine, l'adénosine est aussi un puissant vasodilatateur (Braunagel *et al.*, 1988; Campochiaro et Sen, 1989; Gidday et Park, 1993). Ce mécanisme d'inhibition servirait à favoriser une vasoconstriction se voulant bénéfique en réduisant l'apport en O₂ (Lutty *et al.*, 2000).

Plusieurs chercheurs (Alon *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996; Beauchamp *et al.*, 2001; Guimaraes *et al.*, 2003) ont tenté d'expliquer le mécanisme par lequel l'hyperoxie déclenche l'apoptose des cellules endothéliales rétinienne et de démontrer quels sont les mécanismes impliqués dans cette mort. Les travaux de Penn (Penn, 1990) ont démontré dans le modèle de rétinopathie induite par l'oxygène chez le raton nouveau-né, ce qui avait déjà été démontré dans un autre modèle (Bougle *et al.*, 1982), à l'effet que le sujet

soumis à une hyperoxie n'a pas les défenses adéquates pour soutenir les effets d'un stress oxydant intense. Ce stress oxydatif est à l'origine de la formation de ROS et de la peroxydation lipidique (Tripathi et Tripathi, 1984; Penn, 1990; Penn *et al.*, 1997). Habituellement, le O₂ est transformé par les cytochromes oxydases des mitochondries en deux molécules de H₂O laissant une petite quantité de ROS comme sous-produits prise en charge par les antioxydants cellulaires. Le surplus de O₂ responsable d'une accumulation de ROS, cause des dommages cellulaires. Parmi les dommages cellulaires attribués aux ROS, on compte une attaque de l'ADN, de l'ARN et des membranes lipidiques (Cotran *et al.*, 1994). Un seul radical peut déclencher une réaction en chaîne de peroxydation et causer une oxydation de tous les PUFA dont regorge la rétine (Niesman *et al.*, 1997). Le premier intermédiaire formé à partir de la réduction de l'oxygène, à partir duquel sont formés d'autres radicaux, est l'ion surperoxyde (O₂^{•-}) qui peut à lui seul oxyder plus de 100 molécules lipidiques (Southorn et Powis, 1988). Combiné au NO, O₂^{•-} se transforme en peroxynitrite (ONOO⁻), cytotoxique pour la cellule endothéliale (Beckman *et al.*, 1990). Les dommages causés par le ONOO⁻ sont produits, entre autres, par la modification de protéines contenant des tyrosines inhibant leur activité. Parmi celles-ci, on remarque la Mn-SOD, la PKC et la c-SRC kinase. Le plasma 3-nitrotyrosine est un marqueur stable de la modification des protéines par ONOO⁻ et il est élevé chez les enfants atteints de dysplasie broncho-pulmonaire en corrélation avec la quantité de O₂ inspirée (Banks *et al.*, 1998). Le NO est produit de façon importante durant la période périnatale (Hardy *et al.*, 1996b) et pourrait contribuer à la formation de ONOO⁻. Chez les souris invalidées pour le gène eNOS (eNOS^{-/-}) ou traitées avec un inhibiteur de NOS et soumises à une hyperoxie de 75 % O₂ de P7 à P9, on remarque une protection plus que

modeste contre la vaso-oblitération (Brooks *et al.*, 2001). L'immunoréactivité à la nitrotyrosine est détectée très tôt lors de la vaso-oblitération et est plus intense près des vaisseaux réiniens, alors que des souris adultes eNOS^{+/+} soumises à la même hyperoxie ne montrent pas de marquage (Brooks *et al.*, 2001).

Il semble bien que la mort induite par la formation de radicaux soit apoptotique (Alon *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 2001). Le système Fas-FasL représente un mécanisme souvent activé lorsqu'il est question d'apoptose. Le récepteur Fas (CD95/APO-1) est une protéine transmembranaire de type I (extrémité C-terminale cytoplasmique) qui appartient à la famille des récepteurs TNF/*nerve growth factor* (Nagata et Golstein, 1995; Walczak et Krammer, 2000) et FasL est une protéine transmembranaire de type II (extrémité N-terminale cytoplasmique) qui appartient à la famille de TNF. La liaison de FasL au récepteur Fas déclenche une cascade intracellulaire activant les caspases et induisant ainsi l'apoptose de la cellule (Suda *et al.*, 1993). La mort par apoptose en présence de TSP-1 et de PEDF, deux puissants facteurs anti-angiogéniques se fait par la voie Fas-FasL (Volpert *et al.*, 2002). Par contre, les souris qui ont une déficience en FasL ne montrent pas moins de vaso-oblitération que le type sauvage lorsqu'elles sont soumises à 75% d'O₂ de P7 à P12 (Davies *et al.*, 2003). Cette voie est donc exclue pour expliquer la mort cellulaire.

En plus de confirmer les travaux de Brooks et ses collègues (Brooks *et al.*, 2001), les résultats présentés dans cette thèse décriront de nouveaux rôles pour le NO, le TXA₂, et le PAF dans la vaso-oblitération réiniennne induite par l'oxygène (Chap. 3, 4 et 5).

AGENTS VASOPRESSEURS DE LA VASCULARISATION RÉTINIENNE

L'oxygène et les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules dont la configuration électronique est caractérisée par la présence d'un électron non païré dans la dernière orbitale. Ceci en fait un réactif plus ou moins instable selon les cas. La molécule d'oxygène possède deux électrons non appariés situés dans ses deux orbitales externes, une configuration qui facilite la production de formes actives oxygénées dont les principales sont : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), l'oxygène singulet (O_2^1), le radical hydroperoxyde (HOO^{\cdot}) et le radical peroxyde (LOO^{\cdot} , où L=lipide). Il faut ajouter à ceci une autre forme active de l'oxygène, plus stable que les autres, mais très importante lors d'un stress oxydatif, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les radicaux libres peuvent modifier le tonus des muscles lisses vasculaires en agissant directement sur les cellules musculaires lisses et aussi via des mécanismes indirects en modifiant l'activité biologique des médiateurs vasoactifs.

Les radicaux libres et leurs métabolites affectent la régulation du débit sanguin et affectent la résistance vasculaire, soit par une vasoconstriction, soit par une vasodilatation (Koide *et al.*, 1982; Rosenblum, 1983; Rubanyi et Vanhoutte, 1986; Wolin *et al.*, 1987; Hubel *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 1993; Chemtob *et al.*, 1995). Plusieurs évidences montrent que les radicaux libres formés lors de l'hyperoxie participent de façon directe ou indirecte à la vasoconstriction rétinienne médiée par l'hyperoxie (Jamieson *et al.*, 1986; Yusa *et al.*, 1987). Les radicaux libres sont capables d'activer la phospholipase A_2 , la COX et la TX synthase dans le tissu vasculaire (Schimke *et al.*, 1992; Walsh *et al.*, 1993; Katusic, 1996; Wolin, 1996); H_2O_2 ainsi que d'autres peroxydes causent une constriction artériolaire rétinienne dans une préparation *ex vivo* d'oeil de porcelet (Abran

et al., 1995a) et les radicaux libres participent à l'autorégulation des débits sanguins rétiniens chez le porcelet (Hardy *et al.*, 1994); une augmentation des produits de peroxydation est détectable après 45 min d'hyperoxie (Hardy *et al.*, 1996b); cette dernière mène à la production de O_2^{\bullet} par l'activation de l'enzyme xanthine oxydase (Rodell *et al.*, 1987) qui est présente dans les cellules endothéliales rétiniennes (Fox *et al.*, 1995). De plus, les O_2^{\bullet} peuvent inactiver la synthèse de NO (Rubanyi et Vanhoutte, 1986; Katusic, 1996), importante pour le maintien d'un tonus vasodilatateur dans la rétine de porcelet (Gidday et Zhu, 1995).

Les radicaux libres oxygénés ont plusieurs interactions avec les PGs. La prostaglandine G/H synthase (PGHS) ou COX est ubiquitaire et une source majeure de radicaux libres dans la rétine (Chemtob *et al.*, 1993; Chemtob *et al.*, 1995; Hanna *et al.*, 1997). Les peroxydes et les radicaux libres stimulent la formation des PGs selon deux mécanismes majeurs : l'augmentation de la libération de l'acide arachidonique (Gurtner *et al.*, 1983; Vane *et al.*, 1990) et la stimulation de la COX (Hemler *et al.*, 1979; Kulmacz et Lands, 1984). Le principal producteur de prostaglandines est la cellule endothéliale où sa concentration est 20 fois plus élevée que dans les cellules musculaires lisses (Smith, 1986). Parmi les PGs formées, on retrouve le TXA_2 (Tate *et al.*, 1984; Walsh *et al.*, 1993; Abran *et al.*, 1995a) et la PGI_2 (Harlan et Callahan, 1984; Leffler *et al.*, 1990; Schimke *et al.*, 1992; Abran *et al.*, 1995b). La réponse vasomotrice résultante est probablement déterminée par le ratio PGI_2/TXA_2 . Les radicaux libres et les peroxydes stimulent la libération de l'acide arachidonique (AA) en augmentant l'activité de la phospholipase A_2 (Harlan et Callahan, 1984; Schimke *et al.*, 1992; Natarajan, 1995) par un mécanisme encore peu caractérisé. Parmi les hypothèses, les peroxydes : 1) augmenteraient la

concentration de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire qui activerait la cPLA₂ très sensible à une élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Chakraborti *et al.*, 1989), 2) favoriseraient la conversion de la PLA₂ inactive en sa forme active (de Haas *et al.*, 1968), 3) causeraient une augmentation de l'activité de la calmoduline- Ca^{2+} qui à son tour stimule l'activation de la PLA₂ (Chakraborti *et al.*, 1989), 4) provoqueraient une activation de la PKC ainsi qu'une activation des tyrosines kinases (Natarajan, 1995). Finalement, une faible proportion de la libération de l'acide arachidonique peut être secondaire à une activation de la PLC par les hydroperoxydes (Shasby *et al.*, 1988).

Au cours de la synthèse des PGs à partir du substrat AA, la COX-1 a besoin d'être activée par des peroxydes (Hemler *et al.*, 1979; Kulmacz et Lands, 1984; Williams et DuBois, 1996). À son tour, le métabolisme de la COX-1 produit des peroxydes (Cook et Lands, 1975) créant une boucle de rétroaction positive mise en évidence dans la circulation rétinienne et choroïdienne chez le porcelet (Chemtob *et al.*, 1995). Une autre interaction importante entre les peroxydes et la synthèse de PGs est l'inhibition de la synthèse de PGI₂ par les peroxydes (Weiss *et al.*, 1979; Warso et Lands, 1983) pour ainsi favoriser une synthèse préférentielle de TXA₂. L'activation de la COX-2 est aussi régulée par le stress oxydatif (Chinery *et al.*, 1998; Nakamura et Sakamoto, 2001) et mène à une synthèse augmentée de PGs.

D'autres mécanismes sont également suggérés pour expliquer l'effet vasomoteur des radicaux libres et des peroxydes. Certains ont proposé une activation directe de la guanylyl cyclase (Hidaka et Asano, 1977; Mittal et Murad, 1977), via la formation de NO ou par le métabolisme de H₂O₂ par la catalase (Wolin *et al.*, 1989). Par contre, d'autres études (Rubanyi et Vanhoutte, 1986; Huang *et al.*, 1998) ont démontré que les radicaux

libres peuvent inactiver le NO augmentant ainsi l'effet constricteur des radicaux libres. L'activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP a également été suggérée pour expliquer la vasodilatation des artérioles cérébrales par le H₂O₂ et le ONOO⁻ (Wei *et al.*, 1996).

Le monoxyde d'azote

Le NO est un important vasodilatateur formé par l'endothélium vasculaire, en réponse à des stimuli chimiques libérés par les plaquettes (ATP/ADP, 5-HT) (Cocks et Angus, 1983; Cohen *et al.*, 1983). Le NO peut être produit par l'endothélium dans le but essentiel de réguler le débit sanguin (Ignarro *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1989; Vanhoutte, 1989; Furchgott, 1990; Vane *et al.*, 1990; Luscher, 1991) en réponse à des médiateurs endocriniens et d'autacoïdes (l'acétylcholine, bradikinine, histamine, noradrénaline, substance P et vasopressine) (Furchgott et Zawadzki, 1980; Cocks et Angus, 1983; Katusic *et al.*, 1984) et en réponse à des stimuli physiques de la paroi vasculaire, tels que les forces de cisaillement (Pohl *et al.*, 1986; Rubanyi *et al.*, 1986; Luscher et Vanhoutte, 1990; Vargas *et al.*, 1990; Hasséssian *et al.*, 1993). Il peut aussi être produit en réponse à un facteur de croissance tel que le VEGF (van der Zee *et al.*, 1997).

Le NO est formé à partir de l'acide aminé L-arginine (Schmidt *et al.*, 1988; Knowles *et al.*, 1989; Moncada et Palmer, 1991) par l'enzyme appelée NO synthase (NOS) dont il existe trois isoformes. La NOS endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS) sont constitutives, dépendantes d'une activation par le Ca²⁺ et produisent de faibles concentrations de NO, alors que la NOS inductible (iNOS) est indépendante du Ca²⁺ et produit de fortes concentrations de NO (Stuehr, 1999). Le NO est un radical libre et

constitue l'un des seconds messagers les plus étudiés en raison de son implication dans une foule de mécanismes physiologiques : agent vasodilatateur, prolifération des cellules musculaires lisses, angiogénèse (Garg et Hassid, 1989; Moncada et Higgs, 1993; Papapetropoulos *et al.*, 1997; Ziche *et al.*, 1997; Murohara *et al.*, 1998), messenger neuronal (Garthwaite *et al.*, 1988; Gillespie et Sheng, 1988; Snyder, 1992), inhibition de l'adhésion leucocytaire et agent bactéricide (Nathan et Hibbs, 1991; Moncada et Higgs, 1993).

Au niveau oculaire, le NO joue un rôle dans la réponse des photorécepteurs à la lumière en modulant les canaux ioniques dépendants du voltage dans les photorécepteurs (Kurenyy *et al.*, 1994). Au niveau de la circulation choroïdienne, le NO est en partie responsable du défaut d'autorégulation en médiant une augmentation du débit sanguin, malgré une hyperoxie contribuant ainsi au stress oxydatif. Plusieurs études (Sennlaub *et al.*, 2001; Ando *et al.*, 2002a; Ando *et al.*, 2002b; Sennlaub *et al.*, 2002) ont démontré un rôle du NO dans la néovascularisation rétinienne et prérétinienne dans un modèle animal de ROP. Par contre, très peu d'études se sont attardées au rôle du NO dans la susceptibilité de la vascularisation rétinienne en réponse au stress oxydatif (Brooks *et al.*, 2001). Essentiellement, dans un modèle de souris eNOS^{-/-} ou traitées avec un inhibiteur pharmacologique de NOS, la vascularisation rétinienne est protégée contre la vaso-oblitération dans un mécanisme impliquant probablement les peroxy-nitrites et l'accumulation de protéines nitrosylées (Brooks *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2003; Beauchamp *et al.*, 2004; Le monoxyde d'azote et les radicaux libres, page 94 et chap. 3).

Les prostanoïdes

Les prostanoïdes (PGs, TXs et Iso-PGs) sont des autacoïdes qui exercent une très grande variété d'actions physiologiques et physiopathologiques dans presque tous les tissus des mammifères (Campbell, 1990; Smith et Marnett, 1991). Les prostanoïdes, qui sont des vasodilatateurs et des vasoconstricteurs, ont vu leur participation aux réponses hémodynamiques oculaires clairement démontrée (Chemtob *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 1991). Les PGs sont des médiateurs impliqués dans des désordres rétiens comme la néovascularisation observée dans la RD (Stjernschantz, 1984) et la ROP (Flower *et al.*, 1984).

Les prostanoïdes (PGs et TXs) sont dérivés des PUFAs, soit de façon enzymatique par l'hémoprotéine PGHS ou COX (Smith, 1989), soit de façon non enzymatique (Iso-PGs) par la peroxydation de l'AA libéré des membranes par les radicaux libres (Morrow *et al.*, 1990; Morrow *et al.*, 1992a; Morrow *et al.*, 1994). Les lipides sont des constituants importants de la rétine. Ils représentent 20 % du poids sec de la rétine. L'acide arachidonique (AA : acide gras insaturé 20 :4 ω 6) est nécessaire à la biosynthèse des prostanoïdes. Toutefois, l'acide arachidonique peut être métabolisé dans les tissus oculaires par plusieurs voies métaboliques, dont la cyclooxygénase, la lipoxygénase et la voie de l'époxygénase. La rétine des mammifères contient une grande quantité d'acide arachidonique métaboliquement active qui est estérifiée sous forme de phosphoglycérides, particulièrement sous forme de phosphatidylcholine (PC), de phosphatidylinositol et de triglycérides (5 à 15 % des acides gras dans les phospholipides) (Bazan, 1989). Dans la rétine, l'acide docosahexaénoïque (DHA) représente 25 % du total des acides gras libres, soit environ trois fois plus que l'acide arachidonique. Toutefois, dans les microvaisseaux rétiens, les quantités de DHA et d'AA sont

équivalentes, soit environ 10 % du total des acides gras (Lecomte *et al.*, 1996). En réponse à un stimulus approprié, l'AA est séparé des phosphoglycérides. Il y a au moins deux voies par lesquelles l'AA peut être mobilisé. Il y a la voie de la phospholipase A₂ (PLA₂) qui sépare principalement l'acide arachidonique de la phosphatidylcholine, et à partir du phosphoinositol, par la voie de la phospholipase C (PLC) et des lipases diacylglycérol et monoacylglycérol (Dennis *et al.*, 1991). Cependant, la voie de la PLA₂ est préférée à celle de la PLC (Bettazzoli *et al.*, 1990; Dennis *et al.*, 1991). L'AA est le substrat de la COX qui synthétise PGH₂, le précurseur des PGs.

Il existe deux types d'isoformes de la COX, la COX-1 et la COX-2. La COX-1 est exprimée de manière constitutive et la COX-2 de façon inductible (Fu *et al.*, 1990; Kujubu *et al.*, 1991; O'Banion *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 1991). La COX-2 joue un rôle majeur dans la production de PGs inflammatoires (Fu *et al.*, 1990; Masferrer *et al.*, 1994). Dans la rétine, chaque isoforme est responsable de 50 % de l'activité totale de la cyclooxygénase (Peri *et al.*, 1995; Hanna *et al.*, 1997). L'activité enzymatique de ces isoenzymes est augmentée pendant la période périnatale (Brannon *et al.*, 1994; Peri *et al.*, 1995; Hanna *et al.*, 1997). La PGE₂ est la principale PG produite dans la rétine et a une action vasoconstrictrice (Preud'homme *et al.*, 1985; Bazan, 1989). La PGI₂ est un vasodilatateur dans tous les lits vasculaires et elle est produite par l'endothélium vasculaire en réponse au flot pulsatile et à l'augmentation des forces de cisaillement. Ces prostanoïdes ont des effets importants, fréquemment opposés, au niveau de la reproduction et de la parturition, de l'agrégation plaquettaire, de l'inflammation, des réactions immunitaires, de la sécrétion gastrique, du transport de l'eau et des ions, de la

libération de neurotransmetteurs et du tonus des muscles lisses vasculaires et non vasculaires (Halushka *et al.*, 1989; Campbell, 1990).

Les prostanoïdes exercent leurs actions en se liant à des récepteurs spécifiques de la membrane plasmique (Tab. I). Ces récepteurs sont membres de la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G (Kennedy *et al.*, 1982). Il s'agit des récepteurs DP pour la PGD₂, des sous-types de récepteurs EP₁, EP₂, EP₃ et EP₄ pour la PGE₂, du récepteur FP pour PGF_{2α}, du récepteur IP pour la PGI₂ et le récepteur TP pour le TXA₂ (Narumiya *et al.*, 1999).

Tableau I . Voies de signalisation des récepteurs prostanoïdes

Type	Sous-type	Isoforme	Protéine G	Second Messenger
DP			G _s	cAMP ↑
EP	EP ₁		Unidentified	Ca ²⁺ ↑
	EP ₂		G _s	cAMP ↑
	EP ₄		G _s	cAMP ↑
	EP ₃	EP _{3A}	G _i	cAMP ↓
		EP _{3B}	G _s	cAMP ↑
		EP _{3C}	G _s	cAMP ↑
		EP _{3D}	G _i , G _s , G _q	cAMP ↓, cAMP ↑, PI response
FP			G _q	PI response
IP			G _s , G _q	cAMP ↑, PI response
TP		TP _α	G _q , G _s	PI response, cAMP ↑
		TP _β	G _q , G _i	PI response, cAMP ↓

Les données ont été obtenues de différentes espèces. Les deux isoformes du récepteur TP sont humains, les isoformes du récepteur EP₃ sont bovins et les autres sont murins. PI, phosphatidylinositol; Ca²⁺, calcium; cAMP, adénosine monophosphate cyclique.

↑, augmentation; ↓, diminution. (Adapté de Narumiya, 1999)

Une classe de prostanoïdes importante est celle des isoprostanes. En plus d'activer la COX, les radicaux libres et les peroxydes peuvent oxyder l'AA pour produire les isoprostanes (Morrow et Roberts, 1996; Roberts et Morrow, 1997). Formés *in situ* sur les phospholipides estérifiés, ils sont relâchés par la PLA₂ (Morrow *et al.*, 1992a). Les iso-

PGs sont des produits stables et leur formation sert d'index de peroxydation dans nombre de maladies ayant une composante de stress oxydant (Pratico *et al.*, 1998; Morrow, 2000; Pratico *et al.*, 2004). Parmi les isoprostanes synthétisés, le 8-iso-PGF_{2α} est abondamment produit et est un puissant vasoconstricteur (Morrow *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 1992). Son récepteur demeure à ce jour inconnu, mais le 8-iso-PGF_{2α} stimule la synthèse de TXA₂ et d'endothéline (mais préférentiellement TXA₂) et cause une vasoconstriction rétinienne (Lahaie *et al.*, 1998) plus importante chez le nouveau-né que chez l'adulte (Abran *et al.*, 1995a).

L'implication des prostanoïdes dans le développement de la ROP et l'importance d'agir lors de la première phase de la maladie (vaso-oblitération) ne font aucun doute. Malgré tout, la divergence de résultats retrouvés dans la littérature porte à croire que, selon la situation dans laquelle l'inhibition est faite, les PGs ont un rôle à jouer dans la vascularisation tant normale que pathologique. Par exemple, l'emploi de bloqueurs non spécifiques de COX durant la phase d'hyperoxie a montré des effets bénéfiques en réduisant la vascularisation prérétinienne sans affecter le développement normal de la vascularisation (Nandgaonkar *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2003), alors que dans le même modèle on peut noter une inhibition de l'angiogenèse affectant le développement normal (Wilkinson-Berka *et al.*, 2003). Dans une étude ciblant précisément la phase vaso-oblitérative, Flower (Flower, 1990) a mis en évidence une augmentation de la sévérité de la vaso-oblitération par l'emploi d'AAS durant l'hyperoxie. De toute évidence, l'inhibition non ciblée de toutes les PGs nuit à des processus physiologiques essentiels, créant la nécessité de tenter une intervention plus ciblée afin d'identifier de façon précise le ou les facteurs responsables de la vaso-oblitération rétinienne.

L'endothéline et l'angiotensine

Il existe 3 formes d'endothéline, ET-1, ET-2 et ET-3. L'ET-1 est celle qui prédomine parmi les ETs sécrétées par l'endothélium, alors que ET-2 est produit préférentiellement dans les reins et les intestins et ET-3, dans le cerveau, les poumons, les intestins et les reins. L'action des ETs est généralement autocrine, voire paracrine et une chose est certaine, elle ne parcourt pas de grandes distances. Chaque isoforme est issu d'un gène différent et est synthétisé d'abord dans une forme prépropeptide, puis propeptide et ensuite en peptide actif sous l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline (Reid, 2001). L'ET-1 est le vasoconstricteur endogène le plus puissant connu et il est impliqué dans de nombreuses pathologies, dont l'insuffisance cardiaque, les accidents vasculaires cérébraux et l'hypertension (Rubanyi et Polokoff, 1994; Schmitz-Spanke et Schipke, 2000). L'ET-1 peut agir sur 2 récepteurs : ET-1_A qu'on retrouve sur les muscles lisses et dont l'activation mène à une vasoconstriction soutenue, ET-1_{B1} sur les cellules endothéliales qui produit une vasodilatation via le NO et ET-1_{B2} sur le cardiomyocyte produit une contraction directe (Rubanyi et Polokoff, 1994). L'ET-1 a été identifié dans le tissu oculaire et des sites de liaison spécifiques ont été mis en évidence dans la rétine et la choroïde (MacCumber et D'Anna, 1994; Wollensak *et al.*, 1998). L'ET-1 exogène est associé à une diminution du débit sanguin rétinien (Granstam *et al.*, 1992; Takagi *et al.*, 1996a; Takagi *et al.*, 1996b).

L'Ang II est un vasoconstricteur important, quoique moins puissant que l'ET-1. La synthèse de l'Ang II est faite à partir de l'angiotensinogène, dans une réaction qui, dans un premier temps, est catalysée par la rénine pour d'abord donner l'Ang I puis, dans un second temps, est catalysée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) pour

donner l'Ang II. Plus qu'un vasoconstricteur, l'Ang II est un facteur de croissance, il stimule la prolifération des cellules endothéliales et musculaires lisses (Itoh *et al.*, 1993; Le Noble *et al.*, 1993; Tamarat *et al.*, 2002), stimule la migration des péricytes (Otani *et al.*, 1998; Nadal *et al.*, 2002) et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses (Peiro *et al.*, 1998). L'Ang II agit sur deux récepteurs nommés AT₁ et AT₂. La plupart des effets vasculaires connus de Ang II sont ceux médiés par AT₁. Le récepteur AT₂ est moins connu et plusieurs études (Nakajima *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1996; Munzenmaier et Greene, 1996; Chung *et al.*, 1998; Tebbs *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2000; Tamarat *et al.*, 2002) se contredisent quant à une activation tantôt favorisant la croissance cellulaire, tantôt l'inhibant.

L'angiotensine et l'endothéline ont été impliquées dans la néovascularisation pré-rétinienne dans un modèle de ROP (Lonchampt *et al.*, 2001) et dans les vasculopathies diabétiques (Cooper *et al.*, 2001). L'Ang II augmente l'ARNm de VEGF (Chua *et al.*, 1998) et potentialise l'activité angiogénique de VEGF en augmentant l'expression de VEGFR-2 (Otani *et al.*, 2001). L'ACE stimule aussi la production de ET-1 et augmente la concentration de Ca²⁺ intracellulaire, pouvant causer une contraction encore plus soutenue de Ang II. Par conséquent, les inhibiteurs de l'ACE diminuent la néovascularisation rétinienne chez l'homme (Chaturvedi *et al.*, 1998) et supprime la néovascularisation dans un modèle de souris (Lonchampt *et al.*, 2001; Tadesse *et al.*, 2001) en partie par une action médiée par ET-1 (Tadesse *et al.*, 2001).

Le facteur d'activation plaquettaire

En plus du 8-iso-PGF_{2α}, un autre puissant vasoconstricteur, le facteur d'activation plaquettaire (PAF), peut induire une synthèse de TXA₂ (Chung *et al.*, 1986; Beauchamp

et al., 2002). Le PAF est un phospholipide sécrété par la cellule endothéliale en réponse à de nombreux stimuli, tels que Ang II (Camussi *et al.*, 1983), les cytokines (Bussolino *et al.*, 1986; Camussi *et al.*, 1987; Bussolino *et al.*, 1988; Kuijpers *et al.*, 1991; Mizoguchi *et al.*, 1991; Kuijpers *et al.*, 1992; Au *et al.*, 1994; Bussolino *et al.*, 1994) et le peroxyde (Lewis *et al.*, 1988; Gasic *et al.*, 1991), en plus de contracter les cellules musculaires lisses (Findlay *et al.*, 1981; Kester *et al.*, 1984; Stahl et Lefer, 1987). Le PAF peut de plus stimuler la génération de radicaux libres dans une boucle de rétroaction positive (Chanez *et al.*, 1990). La synthèse de PAF est donc augmentée en situation de stress oxydatif et une section entière de cette thèse y sera consacrée puisqu'un nouveau rôle pour le PAF dans la rétinopathie induite par l'oxygène (un modèle de ROP) fait l'objet du chapitre 5.

LE THROMBOXANE A₂

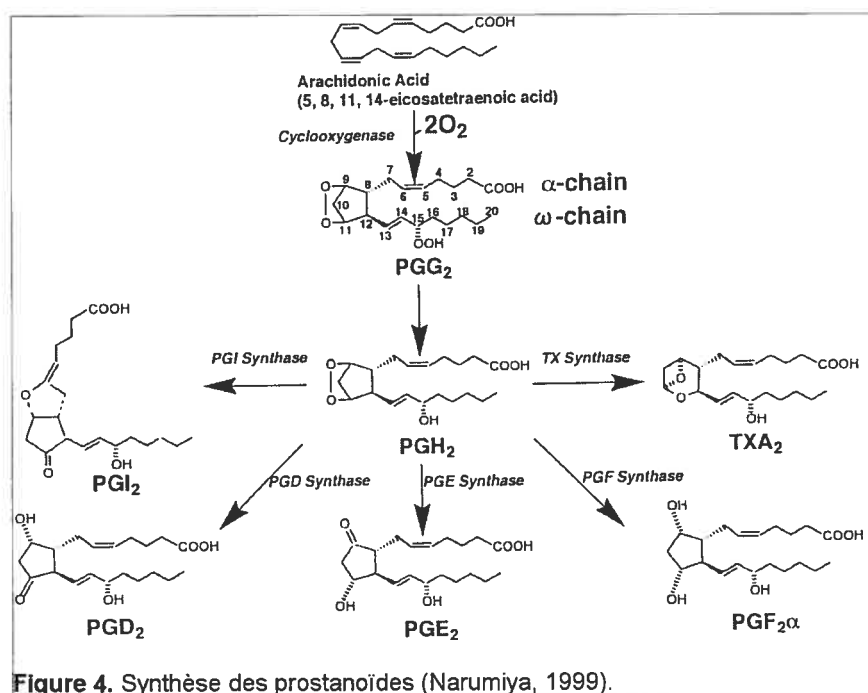
Synthèse du thromboxane

Les phospholipases A₂ (PLA₂) représentent une super famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse d'un lien ester en position *sn-2* (centrale) d'un substrat phospholipidique, comme la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine ou le phosphatidylglycérol. Cette réaction relâche des acides gras libres et des lysophospholipides. Parmi eux, l'AA servira de substrat à des enzymes comme la COX et la lipoxigénase (LOX) qui synthétiseront respectivement des prostanoides (PGs et du TX), et des leucotriènes (LTs). Il existe plusieurs types de PLA₂ dont la PLA₂ cytosolique (cPLA₂) qui est caractérisée par son domaine catalytique sérine, aucun lien disulfure et une dépendance vis-à-vis du Ca²⁺.

La cPLA₂ est exprimée dans tous les tissus et son gène contient des sites de liaison pour AP-1, AP-2, NF-κB et GRE, suggérant une modulation importante lors de stress ou d'inflammation. La cPLA₂ possède deux domaines catalytiques intercalés essentiels à leur liaison à la membrane lipidique et à la capture de Ca²⁺ requise pour son activation. Une activité maximale est observée lorsque la cPLA₂ est phosphorylée en deux endroits par les sérines kinases *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) et par *MAPK-activated protein kinases*. Les cPLA₂ hydrolysent préférentiellement la phosphatidylcholine (Nalefski, 1998). La cPLA₂ est hautement sélective pour les phospholipides ayant un AA en position *sn-2*, mais a aussi une activité *sn-1* lysophospholipase et transacylase qui libère entre autres le lyso-PAF (Loo, 1997), précurseur du PAF aussi impliqué dans la réaction inflammatoire.

L'AA relâché par la cPLA₂ subit ensuite l'action de la PG endoperoxyde H synthase -1 et -2 ayant une activité peroxydase (POX) et cyclooxygénase (COX). Brièvement, un peroxyde encore inconnu oxyde le groupement hème de la peroxydase ce qui oxyde la COX

sur un site actif tyrosine et l'active. Le radical tyrosine extrait un H^+ de l'AA, formant à son tour un radical qui réagit avec 2 molécules d'oxygène pour former un produit intermédiaire, le PGG_2 . Le PGG_2 est rapidement réduit ($2 e^-$) par la POX en PGH_2 , précurseurs de plusieurs prostanoides dont le thromboxane A_2 (TXA_2) (Smith et Song, 2002). Plus précisément, le TXA_2 est synthétisé par la thromboxane synthase (TXS), une enzyme utilisant le PGH_2 comme substrat. Un schéma récapitulatif de la synthèse des prostanoides est présenté dans la figure 4.



La thromboxane synthase

La thromboxane synthase (TXS) est une enzyme microsomiale bifonctionnelle qui catalyse la synthèse de TXA_2 et de l'acide 12-hydroxyheptadécatriénoïque (HHT). Bien que le HHT ait une action antiplaquettaire minimale, on ne lui connaît pas vraiment de fonction physiologique ou pathologique (Hamberg et Samuelsson, 1974; John *et al.*, 1998). Par contre, chez l'humain, une déficience en TXS dans les plaquettes (Weiss et Lages, 1977),

tout comme c'est le cas pour une mutation du récepteur TP (Hirata *et al.*, 1994), cause des problèmes de coagulation. La TXS est une protéine de la membrane du RE (Hamberg *et al.*, 1975; Needleman *et al.*, 1977) et fait partie de la superfamille des cytochromes P450. Elle est exprimée dans les poumons, le foie, les reins, la rétine, les cellules du sang et les intestins (Nusing et Ullrich, 1990; Abran *et al.*, 1995a; Carty *et al.*, 2002). De plus, par la présence de nombreux transcrits d'ARNm de TXS retrouvés dans la rate, le thymus et les cellules myéloïdes, le TXA₂ a sûrement un rôle important à jouer dans le système immunitaire (Zhang *et al.*, 1993; Miyata *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1994; Tone *et al.*, 1994). Nous savons déjà que le TXA₂ cause l'apoptose par fragmentation de l'ADN des thymocytes immatures par une interaction directe avec son récepteur TP (Ushikubi *et al.*, 1993). Le cDNA de TXS a été isolé dans plusieurs espèces dont l'humain (Wang *et al.*, 1991; Yokoyama *et al.*, 1991; Ohashi *et al.*, 1992) et le rat (Tone *et al.*, 1994) et a été cloné. Le gène TXS humain contient 13 exons et s'étend sur une distance continue de 193 kb sur l'ADN du chromosome 7 (Tazawa *et al.*, 1996).

La production de TXA₂ est en partie contrôlée par une « inactivation suicide » de la TXS durant laquelle son substrat, le PGH₂ se lie de façon covalente à l'enzyme pour éviter une surproduction du puissant autacoïde (Jones et Fitzpatrick, 1991). De plus, au niveau génique, plusieurs mécanismes régulent la transcription du gène. Par l'épissage alternatif, certains transcrits d'ARNm de TXS, auxquels il manque le 12^e exon qui est responsable du domaine de liaison à l'hème de l'enzyme, s'avèrent être non fonctionnels (Wang *et al.*, 1994). Parmi les facteurs de transcription, NF-E2 se lie au promoteur sur un site PPRS1 et est responsable de la transactivation du gène de TXS (Zhang *et al.*, 1997b; Ikeda *et al.*, 2000). Le NF-E2 est un hétérodimère (p45/p18) ayant un motif *leucine zipper* (Andrews *et*

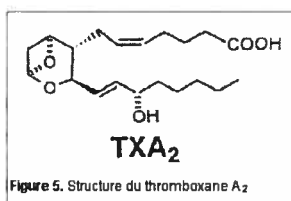
al., 1993a; Andrews *et al.*, 1993b; Chan *et al.*, 1993; Igarashi *et al.*, 1994). Il permet à la machinerie de transcription de se lier au promoteur. La protéine p45 n'a pas d'activité pouvant modifier la chromatine qui est essentielle pour l'altération des structures nucléosomales et l'activation du promoteur de TXS et doit donc former un complexe avec plusieurs protéines. La protéine p18 fait partie de ce complexe qui permet de lier la boîte TATA et les éléments initiateurs qui sont essentiels pour la transcription (Yaekashiwa et Wang, 2002). En plus du site PPRS1, le site de liaison AP-1 (jun) est crucial pour favoriser l'activité des promoteurs de TXS (Lee *et al.*, 1996). Un fait intéressant est la modulation de la transcription par la méthylation habituellement associée à une inhibition de la transcription de gènes. Dans le cas de la TXS, une hyperméthylation favorise l'expression de TXS par la méthylation d'une région associée à un effet répressif sur l'expression d'un gène rapporteur (Lee *et al.*, 1996).

Le thromboxane A₂

Le TXA₂ est abondamment produit durant un stress oxydant, et ce, par la formation de ROS qui peroxydent les lipides de la membrane et activent la COX et la cPLA₂ (Chemtob *et al.*, 1995; Cosentino *et al.*, 1998). Les lipides oxydés représentent un substrat de choix pour la cPLA₂ qui est activée par l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire induite par le stress oxydant. En plus de rendre le précurseur de PGH₂ plus disponible, le stress oxydant inhibe de façon sélective la PGI₂ synthase et favorise la formation de TXA₂ (Ham *et al.*, 1979). Le PGI₂ est souvent vu comme l'antagoniste physiologique de TXA₂ puisque qu'il médie des effets contraires à ceux du TXA₂. Utilisant des mécanismes similaires et profitant des conditions oxydantes, la synthèse d'autres médiateurs lipidiques est augmentée, notamment celle du PAF et du 8-iso-PGF_{2α} qui ont des

effets connus sur la stimulation d'une synthèse de TXA₂ (Morrow *et al.*, 1992b; Ishizuka *et al.*, 1994; Lahaie *et al.*, 1998; Beauchamp *et al.*, 2001; Beauchamp *et al.*, 2002) et ainsi, contribuent aux effets du TXA₂.

Le TXA₂ est un dérivé d'acide gras insaturé à 20 carbones contenant un anneau oxane qui le différencie des prostaglandines qui ont un anneau cyclopentane (Fig. 5). Malgré leur nature lipidique, les PGs et le TXA₂ ne peuvent pas traverser librement les membranes,



car ils se retrouvent majoritairement sous forme d'anions. Un transporteur des prostaglandines (PGT) a été identifié et permet l'efflux des PGs hors de la cellule pour leur action biologique et leur influx pour leur inactivation (Schuster, 1998; Schuster, 2002).

Le mécanisme de transport serait indépendant de Na⁺, Cl⁻ et H⁺ selon des études effectuées sur une lignée de cellules épithéliales (HeLa) (Kanai *et al.*, 1995), alors qu'il serait dépendant de Na⁺ dans l'uvée antérieure et le plexus choroïdien (DiBenedetto et Bito, 1980; DiBenedetto et Bito, 1986).

Le TXA₂ a d'abord été purifié des plaquettes humaines en 1989 (Ushikubi *et al.*, 1989), puis cloné en 1991 (Hirata *et al.*, 1991). C'est un prostanoïde ayant une très courte t_{1/2} *in vivo* (~30 s) qui est rapidement métabolisé en TXB₂, un métabolite stable qui peut être facilement dosé (Catella *et al.*, 1986). Il a un rôle important à jouer dans la circulation rénale en tant que médiateur de l'effet de l'Ang II, tant dans les conditions normales (Wilcox et Welch, 1990; Wilcox *et al.*, 1991) que pathologiques (Nasjletti, 1998). Ainsi, l'Ang II via son récepteur AT₁ stimule la relâche d'AA libre dans les cellules endothéliales par une stimulation de la cPLA₂ (Pueyo *et al.*, 1996) et une production de TXA₂ produisant de cette façon un effet contractile soutenu (Wilcox et Welch, 1990), alors qu'une contre-

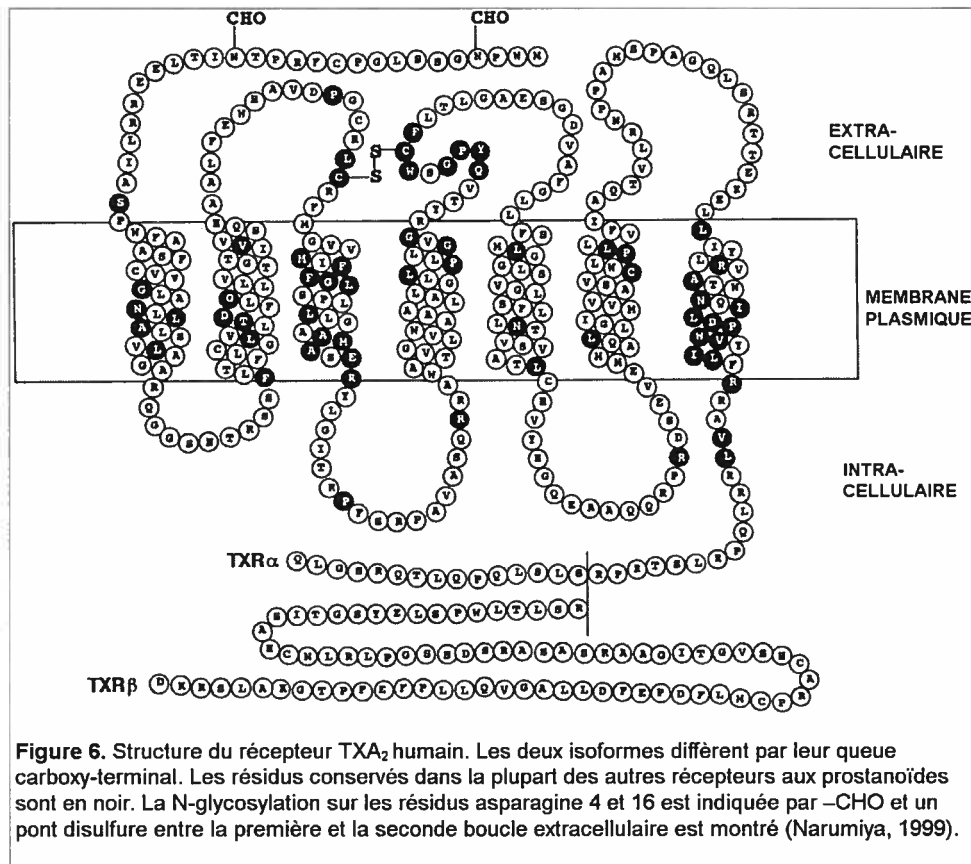
balance est assurée par les PGs relaxantes PGE₂ et PGI₂ (Arima *et al.*, 1994). Le TXA₂ a une action préférentielle sur certains lits vasculaires comme c'est le cas au niveau de la circulation rénale sur l'artériole afférente et le glomérule (Loutzenhiser *et al.*, 1986; Baylis, 1987; Hayashi *et al.*, 1997), une préférence qui se transpose au niveau de la maturité de la vascularisation rétinienne avec une action préférentielle sur la vascularisation immature (Abran *et al.*, 1995a).

C'est lors de circonstances pathologiques et inflammatoires que le TXA₂ prend toute son importance. Le TXA₂ induit l'agrégation et le changement de morphologie des plaquettes (Hamberg *et al.*, 1975; Arita *et al.*, 1989), l'activation des neutrophiles (Kitchen *et al.*, 1978); il augmente l'adhésion de ces derniers à la cellule endothéliale (Wiles *et al.*, 1991) et augmente la diapédèse (Doukas *et al.*, 1988), il induit aussi la production de LTB₄ (Goldman *et al.*, 1991), module la fonction des lymphocytes T (Kelly *et al.*, 1979) et cause l'apoptose des thymocytes immatures (Ushikubi *et al.*, 1993). Au niveau vasculaire, le TXA₂ est un puissant vasoconstricteur et un agent mitogénique; il cause une hypertrophie des cellules musculaires lisses et joue un rôle important dans l'ischémie-reperfusion (Whittle *et al.*, 1981; Halushka *et al.*, 1989; Morinelli *et al.*, 1994; Abran *et al.*, 1995a; Sachinidis *et al.*, 1995; Craven *et al.*, 1996). Tels que dosés dans l'urine, on remarque des taux élevés de TXB₂, dans nombre de pathologies : maladies inflammatoires de l'intestin (Rampton et Collins, 1993), pathologies rénales et cardiovasculaires (Ogletree, 1987) dont l'hypertension dépendante de l'Ang II, spasmes artériels coronariens et thromboses artérielles (Tada et Kuzuya, 1985; Dai *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1994).

Le récepteur TP

Description du récepteur TP

Le récepteur TP (Fig. 6) est un membre de la super famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires capables de lier une protéine G. Chez l'humain, il existe au



moins deux isoformes du récepteur TP résultant de l'épissage alternatif du gène. Le TP_α a été identifié dans le placenta (Hirata *et al.*, 1991) et le TP_β sur les cellules endothéliales (Raychowdhury *et al.*, 1994). Il se retrouve sur plusieurs types cellulaires, dont les cellules musculaires lisses et les plaquettes. Les plaquettes comportent les deux isoformes du récepteur et les cellules endothéliales n'expriment que le TP_β (Negishi *et al.*, 1995). Les deux isoformes présentent une queue cytoplasmique différente et diffèrent dans leur mécanisme et cinétique de désensibilisation et d'internalisation (Gao *et al.*, 2001). Autre différence importante, alors que les deux récepteurs sont couplés à une protéine G_{αq} (PTX-

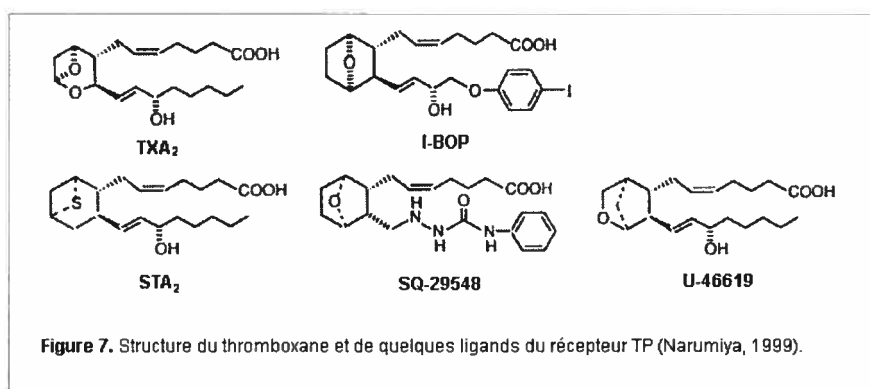
non sensible), TP $_{\alpha}$ peut aussi interagir avec une protéine G $_{\alpha_s}$, alors que TP $_{\beta}$ interagit aussi avec une protéine G $_{\alpha_i}$ (PTX- sensible). Chez le rat, le récepteur TP présente 73 % d'homologie avec le récepteur TP $_{\alpha}$ humain (Abe *et al.*, 1995; D'Angelo *et al.*, 1996b) et montre essentiellement des différences dans l'affinité des agonistes pour le récepteur (D'Angelo *et al.*, 1996b). Une souris knock-out pour le gène du récepteur TP a été développée et présente une tendance à saigner, mais se montre plus résistante au choc cardiovasculaire induit par le mimétique stable du TXA $_2$, U46619 et l'AA (Thomas *et al.*, 1998).

Liaison ligand-récepteur et outils pharmacologiques

La masse moléculaire du récepteur TP purifié des membranes de plaquettes humaines est de 57 kDa, alors que sa structure primaire prédit une masse de 37 kDa, laissant croire que le récepteur subirait des modifications post-traductionnelles comme la N-glycosylation (Hirata *et al.*, 1991). Ainsi, un traitement à la N-glycanase ramène le poids moléculaire à ~37 kDa (Chiang et Tai, 1998). Cette modification semble être nécessaire à la liaison du ligand au récepteur, puisque la déglycosylation abolit la liaison du ligand. L'interaction du ligand avec le récepteur TP est encore mal connue, mais plusieurs régions du récepteur à sept domaines transmembranaires seraient impliquées, autant les domaines transmembranaires (TM) que les boucles extra-cellulaires (ED). Le TM7 interagirait avec le groupement carboxyle du ligand (Hirata *et al.*, 1991; Narumiya *et al.*, 1993), le TM3 coordonnerait l'anneau prostanoloïde, les TM4 et TM5 interagiraient avec les chaînes alkyles (Turek *et al.*, 2002). En plus des TM, les ED 2 et 3 seraient impliqués puisque des mutants provenant de récepteur TP $_{\alpha}$ de placenta humain (Chiang *et al.*, 1996) et de récepteurs TP $_{\alpha}$ et TP $_{\beta}$ de plaquettes humaines (D'Angelo *et al.*, 1996a) montrent

l'importance des ponts disulfures entre les cystéines Cys¹⁰⁵ et Cys^{183/184}. Des mutations sur ces sites éliminent toute activité de liaison.

Quelques ligands sont présentés dans la figure 7. Des essais compétitifs de liaison sur des plaquettes humaines, donnent l'ordre de puissance suivant : I-BOP > SQ-29548 > STA₂ > U-46619 avec des IC₅₀ respectifs de 2,2; 4,7; 17 et 62 nM. Les autres PGs ont très peu d'affinités pour le récepteur TP sauf peut-être l'agoniste EP₃, M&B-28767 avec un K_i de 1300 nM. L'iso-PG, 8-iso-PGF_{2α} active aussi le récepteur TP (Morrow *et al.*, 1992b). Le U-46619 est souvent utilisé comme outil pharmacologique, car il est stable et possède un



profil physiologique similaire à TXA₂ (Coleman *et al.*, 1981). Afin d'empêcher l'activation du récepteur, des inhibiteurs de TXS sont aussi utilisés notamment le CGS-12970 et CGS-22652. Le CGS-12970 est un puissant inhibiteur de TXS (IC₅₀ 12 nM) ayant l'avantage d'avoir une longue t_{1/2} (12-25 heures), sans les effets antithrombocytopeniques du CGS-13080 (Ambler *et al.*, 1985). Quant au CGS-22652, c'est en plus un antagoniste du récepteur TP (IC₅₀ : 2 nM en tant qu'antagoniste TP; 30 nM en tant qu'inhibiteur de la TXS) (Bhagwat *et al.*, 1993), ce qui en fait un antagoniste aussi puissant que l'antagoniste compétitif du TP, L-670,596 avec une IC₅₀ de 5,5 nM (Ford-Hutchinson *et al.*, 1989). D'autres molécules ont une certaine spécificité pour le récepteur TP, entre autres, le losartan,

un antagoniste du récepteur AT₁ et son métabolite, EXP3174 (Liu *et al.*, 1992; Bertolino *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1997b; Guerra-Cuesta *et al.*, 1999). Leur interaction avec le récepteur TP pourrait expliquer une partie de leur efficacité dans leur capacité à abaisser la pression sanguine, puisque losartan et EXP3174 inhibent la contraction vasculaire et l'agrégation plaquettaire induite par le U-46619 chez le rat spontanément hypertendu (SHR) (Li *et al.*, 1998b).

Régulation du récepteur TP

Désensibilisation et internalisation du récepteur TP

La désensibilisation du récepteur TP peut être homologue ou hétérologue. Chez l'humain, le TP_α est désensibilisé de façon homologue par une augmentation de la concentration du ligand, alors que c'est le contraire dans le cas du TP_β qui est régulé à la hausse (Dorn *et al.*, 1990; Liel *et al.*, 1993) par une stimulation prolongée et une augmentation du TXA₂ circulant (Fitzgerald *et al.*, 1986; Meagher et FitzGerald, 1993). La désensibilisation du TP_β serait régulée par la PKC_α, dont l'activation dépend de DAG et d'une augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire, et par la PKA, en phosphorylant des résidus sérine et thréonine dans la queue C-terminale, ce qui mettrait fin à l'activation du récepteur et à la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire (Kinsella *et al.*, 1994). La régulation du TP_β par la PKC expliquerait sa désensibilisation hétérologue par le PAF qui active aussi la PKC (Dorn et Davis, 1992). Le mécanisme exact demeure inconnu, mais la PKC pourrait venir phosphoryler une protéine G pour venir mettre fin à la transduction du signal et un candidat possible serait G_i propre au TP_β et phosphorylé par la PKC (Crouch et Lapetina, 1988). Un autre mécanisme de désensibilisation hétérologue est celui qui

s'effectue via un *cross-talk* avec le récepteur IP activé par son ligand PGI₂ (Manganello *et al.*, 1999) et qui provoque une augmentation de la production de cAMP entraînant la désensibilisation du TP (Murray *et al.*, 1990). De plus, la délétion des sites de phosphorylation dans la queue C-terminale du récepteur TP_β inhibe la désensibilisation (Spurney, 1998). Finalement, la palmitoylation ne semble pas jouer de rôle majeur dans la désensibilisation du TP, car la séquence consensus nécessaire pour cette modification n'est pas trouvée dans l'extrémité distale du 7^e TM (Narumiya *et al.*, 1999). La désensibilisation du récepteur est transitoire et la sensibilité à l'agoniste revient à la suite de l'enlèvement de l'agoniste (Spurney *et al.*, 1994). Dans un mécanisme dépendant du Ca²⁺, les protéines phosphatases (PP)-1 et PP2A du cytosol participent à la resensibilisation du récepteur (Spurney, 2001).

Seul le TP_β et non le TP_α est internalisé à la suite d'une stimulation par l'agoniste dans un mécanisme impliquant la dynamine, une *G-coupled receptor kinase* (GRK) et l'arrestine, suggérant ainsi la formation de puits recouverts de molécules de clathrines (Parent *et al.*, 1999).

Régulation génique du récepteur TP

Le gène du récepteur TP ne possède pas les motifs conventionnels, tels que la boîte TATA et TATA-like ou deux boîtes CCAAT. Les éléments régulateurs de la région du promoteur incluent un site de liaison à Sp-1, des séquences consensus AP-2, un élément de réponse à l'ester de phorbol (TRE), un *acute-phase reactant regulatory element* (APRRE), un motif de liaison c-myc et un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) (Nusing *et al.*, 1993). Il est important de mentionner que la protéine AP-2, tout comme AP-1 (jun), est induite par la PKC. Dans les cellules musculaires lisses, le peroxisome *proliferator-*

activated receptor (PPAR) γ et ses ligands peuvent inhiber l'expression de l'ARNm du récepteur TP en liant Sp-1 qui ne peut plus lier le site du promoteur (Sugawara *et al.*, 2002). Dans les macrophages, le PPAR γ peut aussi lier le NF-E2-related factor et supprimer la transcription du gène TXS (Ikeda *et al.*, 2000).

Activation du récepteur TP et signalisation

Le récepteur TP fait partie de la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires capables par le biais d'une protéine G, les plus communes étant G_i, G_s, G_q et G_o, d'activer ou d'inhiber une protéine/enzyme effectrice. Les protéines G sont hétérotrimériques et composées des sous-unités $\alpha\beta\gamma$. Elles peuvent lier le nucléotide guanosine et possèdent une activité guanosine-triphosphate (GTP)ase. C'est la sous-unité α qui confère à la protéine G son identité. Lorsque le récepteur n'est pas stimulé, les trois sous-unités sont liées entre elles en plus de la sous-unité α qui est liée à la guanosine-diphosphate (GDP). Suivant une stimulation du récepteur, celui-ci change de conformation donnant lieu à la phosphorylation de la GDP en GTP. La sous-unité α se dissocie alors des sous-unités $\beta\gamma$, laissant les deux complexes libres d'interagir avec leur protéine effectrice qui produira un ou des seconds messagers. L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité α permet d'hydrolyser GTP en GDP et de reformer le complexe, ce qui met fin au signal de transduction.

La liaison du ligand au récepteur TP déclenche une cascade de signalisation classique impliquant une protéine G α_q /G α_{11} . Suite à la liaison du ligand au récepteur, la sous-unité G α se dissocie de son complexe pour s'associer et activer la phospholipase C (PLC) ancrée à la membrane qui hydrolyse les phosphoinositides de la membrane en deux

seconds messagers importants : IP3 qui est relâché dans le cytosol et DAG dans la membrane plasmique. Le IP3 stimule la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire en favorisant l'ouverture d'un pore sur la membrane du RE. Spécifiquement, la relâche de Ca^{2+} interne peut être aussi faible que $0,1 \mu\text{M}$, mais peut aller jusqu'à $10 \mu\text{M}$ (Voet *et al.*, 1998). Quant à la DAG, elle active la protéine kinase C (PKC) (Brass *et al.*, 1987; Shenker *et al.*, 1991). Chez l'humain, il a aussi été démontré, sans faire l'unanimité, que le récepteur TP pouvait aussi lier une protéine G_s (TP_α) ou une G_i (TP_β) et moduler l'adénylyl cyclase à la hausse ou à la baisse respectivement (Shenker *et al.*, 1991; Offermanns *et al.*, 1994; Ushikubi *et al.*, 1994; Allan *et al.*, 1996). Il a aussi été rapporté que le récepteur pourrait aussi se lier à une protéine $G_{12/13}$ (Offermanns *et al.*, 1994; Allan *et al.*, 1996), à G_{16} (van der Vuurst *et al.*, 1997) et récemment une G_h (Veza *et al.*, 1999).

Les effets de l'activation de récepteur TP sont divers. Sur les muscles lisses vasculaires, le TXA_2 ou son mimétique U-46619 active les canaux Ca^{2+} liés au voltage de type L pour l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire (Tosun *et al.*, 1998) et inhibe les canaux potassiques de type K_{ca} (Scornik et Toro, 1992), une inhibition transitoire qui est renversée par la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire. De plus, dans les cellules musculaires lisses humaines, porcines, murines et bovines, le U-46619 active les *extracellular signal-regulated kinases* (ERK), des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) importantes pour la transduction intracellulaire de signaux de migration, prolifération et survie cellulaire (Morinelli *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1995; Grosser *et al.*, 1997; Miggin et Kinsella, 2001). Lorsqu'activée par la DAG, la PKC viendrait activer ERK par une interaction directe entre les protéines kinase c-Raf et Ras (Hagemann et Rapp, 1999). Le processus serait régulé par les niveaux de cAMP intracellulaires et l'activation de la PKA viendrait inhiber c-Raf

(Hagemann et Rapp, 1999). Par contre, des conflits existent quant au rôle de la PKA qui peut selon le cas inhiber l'activation des MAPK ou la stimuler (Miggin et Kinsella, 2002). On remarque aussi des différences au niveau de l'activation de la voie PKB/Akt par PI3-K, considérée comme une voie de survie antiapoptotique (Datta *et al.*, 1999). Miggin et Kinsella (Miggin et Kinsella, 2002) montrent dans une lignée cellulaire HEK293 (*human embryonic kidney*) que le TXA₂ stimule la PI3-K qui médie l'activation de la PKB, alors que Gao (2000) montre que l'activation du récepteur TP avec I-BOP inhibe l'activation de la PKB dans une lignée cellulaire ECV304 (*human bladder cancer cell line*) (Gao *et al.*, 2001).

Récemment, Ashton et ses collègues (Ashton *et al.*, 1999) ont démontré que l'agoniste du récepteur TP, I-BOP inhibe, en fonction de la dose et du temps, la formation de réseaux vasculaires (IC₅₀ 25 nM) par les cellules endothéliales et la migration cellulaire (IC₅₀ 50 nM) dans un modèle *in vitro*. Ces effets contrastent avec les effets connus du TXA₂ sur la survie cellulaire et les résultats de Miggin et Kinsella (2002). L'inhibition de l'angiogenèse peut-être due à l'inhibition des jonctions communicantes (GAP) par un mécanisme dépendant d'une accumulation de cAMP qui, par l'activation de kinases et la phosphorylation de protéines, rend impossible les communications jonctionnelles (Shirinsky *et al.*, 1988; Saez *et al.*, 1993; Wang et Rose, 1997). Dans un modèle de retard de croissance utérine induit par un mimétique du TXA₂ chez le rat, on remarque une inhibition de la migration des neurones peut-être à cause d'une expression anormale de la protéine d'adhésion N-CAM, impliquée dans la migration (Sasaki *et al.*, 2000). Par contre, le TXA₂ n'affecte pas directement l'expression des intégrines de surface $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$. Mais l'inhibition de la migration cellulaire endothéliale peut être un phénomène indépendant d'une altération des intégrines ou du cytosquelette, en particulier l'inhibition de la migration

causée par une altération des jonctions communicantes qui est indépendante de changements du cytosquelette (Pepper *et al.*, 1989). Ces phénomènes d'inhibition ont été tout récemment explorés davantage par Ashton et ses collègues (2004). Ils montrent que I-BOP (100 nM), sur le récepteur TP endothélial humain (HUVEC), est un puissant antagoniste de la migration et de la différenciation (IC₅₀ 30 nM) induites par le VEGF. Le I-BOP inhibe la relâche du NO stimulée par le VEGF par une baisse de l'activation de Akt, eNOS (Ashton et Ware, 2004). En plus d'interférer avec le VEGF, l'activation du récepteur TP sur la cellule endothéliale empêche l'internalisation d'un autre récepteur, le récepteur FGF-1 (FGFR-1), ce qui empêche la migration (*in vitro*) et l'angiogenèse (*in vivo*) induite par le FGF-2. L'activation du récepteur TP mène aussi à une relâche de TSP-1 qui interagit avec $\alpha_v\beta_3$ et forment un complexe avec le FGFR-1 empêchant son internalisation (Ashton *et al.*, 2004). Lors du développement utérin, le TXA₂ empêche la différenciation du trophoblaste qui constituera plus tard le feuillet supérieur du placenta et les villosités placentaires. L'inhibition de la synthèse de TXA₂ ou l'emploi d'un antagoniste du TP facilite la différenciation hormonale du trophoblaste (Yusuf *et al.*, 2001).

Enfin, l'activation du récepteur TP peut moduler directement la transcription de l'ARNm de plusieurs molécules d'adhésion, tel que mesuré dans les HUVEC, notamment la transcription des molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM)-1, des molécules d'adhésion vasculaire (VCAM)-1 et les molécules d'adhésion leucocytaire endothéliales (ELAM)-1. Les ICAM-1 et ECAM-1 seraient exprimés davantage par une activité de liaison augmentée des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 activés par une phosphorylation dépendante de PKC, alors que VCAM-1 serait liée à l'activité de NF- κ B seulement (Ishizuka *et al.*, 1998). Ces effets peuvent être reproduits avec le PAF et peuvent être complètement bloqués par le

SQ-29,548, un antagoniste du TP ou par un inhibiteur de PKC (Ishizuka *et al.*, 1998). Par contre, le TXA₂ ne peut pas réguler à la hausse l'expression des molécules d'adhésion dans tous les types cellulaires. Dans les cellules mésengiales de rat, le TXA₂ ou son agoniste, stimule la formation de TGF β (Studer *et al.*, 1995) et dans les poumons, stimule la synthèse de NO (Wilson *et al.*, 1997), deux facteurs qui inhibent l'expression de molécules d'adhésion (Gamble *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1996).

En résumé, plusieurs évidences démontrent un rôle potentiellement important du TXA₂ lors d'un stress oxydant. Dans ce contexte, il est produit abondamment et, par son action sur la mobilisation du Ca²⁺, il participe à l'activation de COX et cPLA₂ (Chemtob *et al.*, 1995; Cosentino *et al.*, 1998). Cette dernière procure le substrat nécessaire à la COX qui produit le précurseur du TXA₂ ce qui augmente la production du prostanoïde (Ham *et al.*, 1979). L'activation de la COX participe directement à l'oxydation en générant des ROS (Chemtob *et al.*, 1995). Ces conditions sont rencontrées dans le modèle du rat nouveau-né soumis à l'oxygène où, malgré une agrégation plaquettaire absente dans la première phase de la ROP, il y a une forte concentration de TXA₂ dans la rétine de l'animal exposé (Beauchamp *et al.*, 2001). Ceci suggère un rôle important joué par le TXA₂ dans la ROP, d'autant plus que le TXA₂ semble avoir une action préférentielle sur la vascularisation rétinienne immature (Abran *et al.*, 1995a), si on la compare à l'adulte.

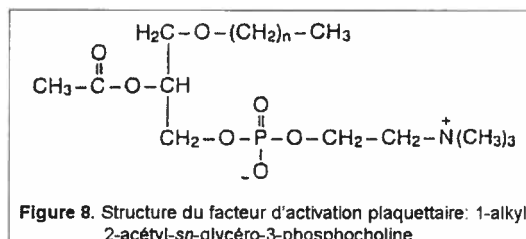
LE FACTEUR D'ACTIVATION PLAQUETTAIRE

Généralités

Le PAF est un puissant médiateur pro-inflammatoire. Il a d'abord été mis en évidence en tant que médiateur de l'anaphylaxie chez le lapin (Barbaro et Zvaifler, 1966; Braquet *et al.*, 1987). Il a été précisément identifié par Benveniste et ses collègues en 1972 qui ont démontré qu'il était relâché par les basophiles selon un mécanisme dépendant de IgE (Benveniste *et al.*, 1972). Ce n'est pas avant 1982 que sa structure chimique a été connue et caractérisée comme étant une substance dont la synthèse peut être modulée par les PLA₂ (Benveniste *et al.*, 1982). Dès la fin des années 1980, des lipides synthétiques ont été créés pour mimer le comportement du PAF, une molécule à 16 carbones (Fig.8).

Le récepteur PAF (PAFR) a été cloné par Honda et ses collègues (Honda *et al.*, 1991) et appartient à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Le PAFR est exprimé partout et le PAF possède des sites de liaison, tant sur la membrane plasmique cellulaire que sur l'enveloppe nucléaire (Marrache *et al.*, 2002).

Le PAF comporte un squelette glycérol lié à une chaîne alkyle d'une longueur variable en position *sn*-1, un groupe acétyle *sn*-2 et un groupement phosphocholine en *sn*-3. Le nombre de carbones peut varier, mais se situe habituellement entre C₁₂ et C₁₈. Les réactions de peroxydation incontrôlées donnent différents types de PAF, mais



certaines caractéristiques sont nécessaires pour que le PAF puisse être actif biologiquement. Premièrement, le lien en *sn*-1, un lien ester (-COO-R) ou éther (-CO-R)

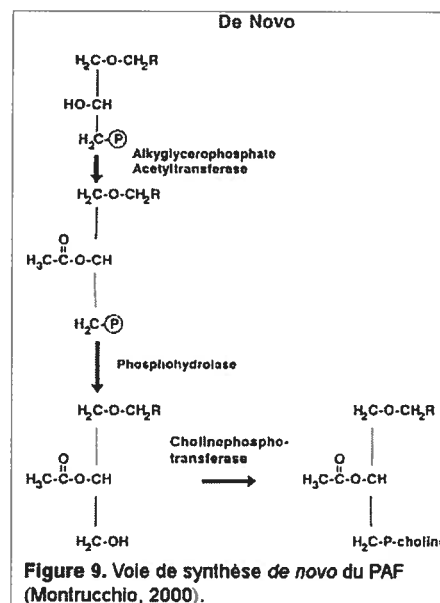
lui donne son nom acyle ou alkyle respectivement. Ces deux formes sont les plus abondantes, et l'alkyle, la forme la plus puissante. La disponibilité des phospholipides alkyles est grande, particulièrement dans les neutrophiles (Ramesha et Pickett, 1987) et les cellules endothéliales (Murphy *et al.*, 1992) où la phosphatidylcholine de type alkyle peut atteindre jusqu'à 40 % des réserves membranaires. De plus, la forme acyle subit un catabolisme préférentiel (van den Bosch *et al.*, 1991) et l'enzyme acétyltransférase qui synthétise le PAF génère préférentiellement des espèces alkyles dans les cellules endothéliales humaines (Holland *et al.*, 1992). Deuxièmement, l'acétate présent en *sn*-2 confère au PAF son activité biologique en affectant sa demi-vie ($t_{1/2}$) et sa puissance (EC_{50}). Le méthylcarbamate PAF (C-PAF) devient très stable et résistant au métabolisme (O'Flaherty *et al.*, 1987) quand un groupement imino ($-NH$) est ajouté à l'acétate. Ce changement n'affecte pas l'activité de PAF et en fait un outil pharmacologique efficace (O'Flaherty *et al.*, 1987). Par contre, le lyso-PAF, le précurseur immédiat du PAF est déacétylé en *sn*-2 et biologiquement inactif. Enfin, des changements en *sn*-3 affecteront l'activité du PAF. En remplaçant l'amine quaternaire par différents dérivés cycliques, on augmente l'activité du PAF (Coeffier *et al.*, 1986). La distance entre la tête polaire positive et le groupement phosphoryle est aussi critique et une augmentation de la distance se traduira par une perte d'activité qui a permis le développement d'antagonistes efficaces (Wissner *et al.*, 1985).

Synthèse du facteur d'activation plaquettaire

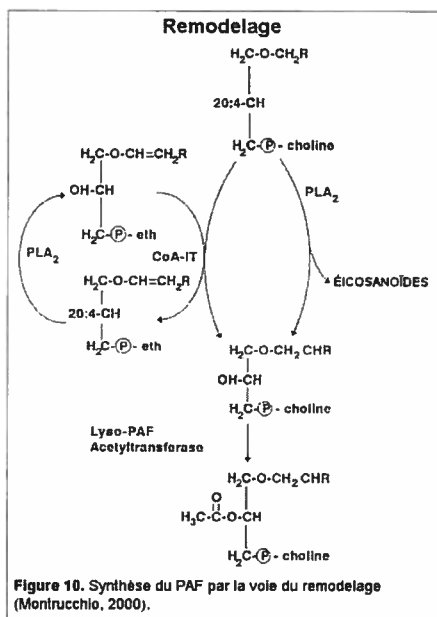
Tout comme le TXA_2 , le PAF a une $t_{1/2}$ très courte et n'est donc pas emmagasiné; sa synthèse est très régulée en réponse à des stimuli spécifiques. Plusieurs cellules synthétisent du PAF dont les cellules endothéliales de tous les lits vasculaires (Whatley *et*

al., 1988; Bussolino et Camussi, 1995), les leucocytes (Lynch et Henson, 1986), les plaquettes, les poumons (Christie et Henderson, 2002) et le cerveau (Baker, 1995) selon deux voies de synthèse métabolique : la voie *de novo* et la voie du remodelage.

La voie *de novo* est la voie utilisée pour maintenir des niveaux physiologiques de PAF sans qu'il n'y ait de stimulation précise (Fig 9). La voie *de novo* synthétise des phospholipides en trois étapes : d'abord le 1-alkyl-2-lyso-*sn*-glycéro-3-phosphate, un intermédiaire lipidique qui est acétylé par l'enzyme alkylglycérophosphatase acétyltransférase en 1-alkyl-2-acétyl-*sn*-glycérophosphate; ensuite, il est transformé en précurseur du PAF soit le 1-alkyl-2-acétyl-*sn*-glycérol par une phosphohydrolase;



finalement, la cholinephosphotransférase transforme le précurseur en 1-alkyl-2-acétyl-*sn*-3-phosphocholine qui est le PAF physiologiquement actif (Montrucchio *et al.*, 2000).



La voie du remodelage implique une synthèse du PAF en deux étapes dépendantes du Ca^{2+} et de l'activation de la cPLA_2 (Fig. 10). L'activation de la cPLA_2 par le Ca^{2+} catalyse l'hydrolyse en position *sn*-2 de 1-alkyl-2-archidonyl-glycéro-phosphocholine pour relâcher le 1-alkyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (lyso-PAF), le précurseur du PAF, mais aussi des acides gras libres et de l'acide arachidonique

(Montrucchio *et al.*, 2000). Le lyso-PAF est ensuite acétylé par une enzyme spécifique utilisant le coenzyme A, la lyso-PAF acétyltransférase, pour donner le PAF biologiquement actif. L'activation de cPLA₂ est essentielle pour la synthèse du PAF par la voie de remodelage puisqu'une souris knock-out pour le gène cPLA₂ est incapable de générer du lyso-PAF (Shindou *et al.*, 2000).

Production de lipides apparentés à PAF lors de stress oxydant

Tout comme le 8-iso-PGF_{2α} lors d'un stress oxydant, des phospholipides apparentés au PAF sont produits de façon non enzymatique par fragmentation des PUFAs, puisque des résidus lipidiques acyles se trouvant en position *sn*-1 du squelette glycérol sont des cibles de choix lors de la peroxydation des membranes. Ces phospholipides oxydés, dont la structure s'apparente à celle du PAF, sont d'efficaces ligands et agonistes du PAFR (McIntyre *et al.*, 1999).

Régulations de PAF acétyltransférase et PAF acétylhydrolase

La lyso-PAF acétyltransférase est une enzyme liée à la membrane (Snyder, 1995) et est retrouvée dans une variété de tissus où sa plus grande activité a été détectée dans la rate, les poumons, le thymus et les ganglions lymphatiques (Baker, 2000). En plus de la disponibilité du substrat, l'activité de la transférase est régulée par une phosphorylation médiée par la protéine kinase p38 (Nixon *et al.*, 1999). Elle a une préférence pour le 1-alkyl-PAF *versus* 1-acyl-PAF (Holland *et al.*, 1992; Snyder *et al.*, 1992).

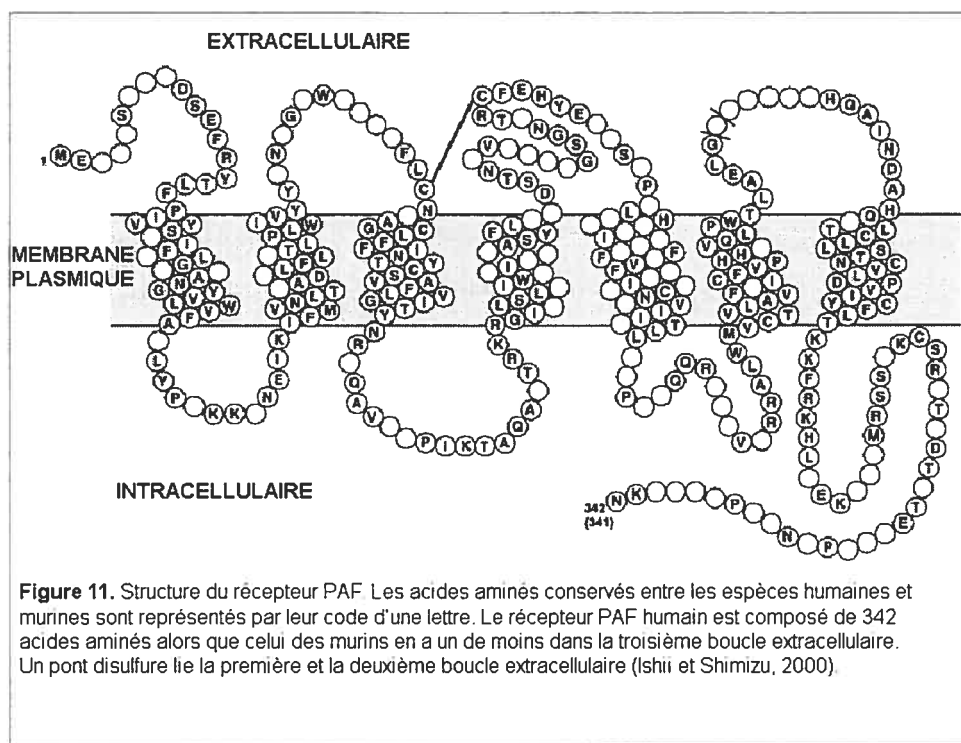
Le PAF est dégradé par la PAF acétylhydrolase (PAF-AH), une enzyme cytosolique (Prescott *et al.*, 2000). La PAF-AH est une PLA₂, mais représente une famille de PLA₂ distincte indépendante du Ca²⁺. La PAF-AH n'est ni sécrétée, ni apparentée à la

cPLA₂. Elle hydrolyse le groupement acétyle en position *sn*-2 pour donner le lyso-PAF et l'acétate. Le lyso-PAF peut ensuite être réacétylé ou hydrolysé par la phospholipase D en acide phosphatidique. La PAF-AH est hautement spécifique pour les courtes chaînes acyle en position *sn*-2 et ne semble pas être étroitement régulée.

Le récepteur PAF

Le PAF active son récepteur à des concentrations qui vont du picomolaire au nanomolaire autant *in vitro* qu'*in vivo*. Le PAFR reconnaît trois aspects structuraux de PAF, soit le groupement choline, le court résidu en *sn*-2 et le lien éther. En 1991, le gène PAFR humain a été cloné (Nakamura *et al.*, 1991) et présente 72 % d'homologie avec celui du rat, de la souris ou du cochon d'Inde. Il présente aussi la structure classique d'un récepteur à sept domaines transmembranaires de 39 kDa (Fig. 11, page 83). Le lien disulfure entre les cystéines Cys⁹⁰ et Cys¹⁷³ des 2^e et 3^e boucles extracellulaires est essentiel pour le repliement correct du récepteur et son expression de surface (Le Guill *et al.*, 1997a). Le PAFR humain possède une seule séquence consensus de N-glycosylation dans la 2^e boucle extracellulaire sur l'asparagine Asn¹⁶⁹, alors que le rat en a une deuxième à Asn⁴. Les études de mutagenèse dirigée proposent un site de liaison du ligand aux résidus histidines His¹⁸⁸, His²⁴⁸ et His²⁴⁹ (Ishii *et al.*, 1997a). La 3^e boucle intracellulaire interagirait avec les protéines G.

Contrairement au récepteur TP du thromboxane, un site de palmitoylation est trouvé sur un résidu cystéine de la queue C-terminale (Cys³¹⁷), sur quatre résidus sérines



(Ser³⁰⁵, Ser³¹³, Ser³¹⁴, Ser³¹⁸) et cinq résidus thréonines (Thr³²¹, Thr³²², Thr³²⁴, Thr³²⁶, Thr³³⁵). Ces résidus sont des sites de phosphorylation et peuvent participer à la désensibilisation du récepteur.

Régulation génique du PAFR

Le gène humain du PAFR ne contient aucun intron et une seule copie du gène est présente sur le chromosome 7 (Mutoh *et al.*, 1993). Le gène de PAFR génère deux différents transcrits d'ARNm. Les exons 1 et 2 sont exprimés de façon distincte par deux promoteurs différents et sont alternativement épissés et joints à un site commun (exon 3) qui encode la protéine fonctionnelle PAFR. Les deux promoteurs sont stimulés par des stimuli différents et procurent une grande versatilité dans les fonctions biologiques du

PAF. Le promoteur du premier transcrit possède trois sites de liaison NF- κ B et un site de liaison Sp-1, en plus d'une séquence consensus initiatrice (ATG). Ce promoteur répond à une stimulation aux PAF et lipopolysaccharides (LPS), témoignant du rôle important du PAF dans les processus inflammatoires et pathologiques (Mutoh *et al.*, 1994). Le promoteur de l'exon 2 contient trois sites de liaison AP-2 et un Sp-1, un élément inhibiteur du TGF β et des éléments de réponse à l'œstrogène, l'acide rétinoïque et à l'hormone thyroïde laissant croire que le promoteur 2 répond davantage à des signaux de différenciation.

Désensibilisation du PAFR

La $t_{1/2}$ du PAFR est d'environ 4 heures sans stimulation, alors que ce chiffre tombe à ~30 min en présence du PAF. Une désensibilisation homologue a lieu par la phosphorylation des résidus sérine et thréonine de la queue C-terminale par des protéines kinases, telles que la *β -adrenergic receptor kinase* (β ARK)-1 (Takano *et al.*, 1994). Les protéines arrestines lient le récepteur phosphorylé et empêchent la transduction des signaux (Takano *et al.*, 1994). Tout comme c'est le cas avec le TP, par une interaction des arrestines avec la clathrine, le récepteur est internalisé et séquestré (Le Gouill *et al.*, 1997b; Ishii *et al.*, 1998a) dans un endosome précoce et est recyclé vers la membrane après un retrait de l'agoniste. La phosphorylation des résidus sérine et thréonine facilite le processus, mais n'est pas essentielle pour la séquestration du récepteur (Ishii *et al.*, 1998a).

Altérations génétiques du PAFR

Les souris produites par génie génétique qui surexpriment le PAFR ont des problèmes de fertilité, d'hypersensibilité des bronches, de réactions inflammatoires pulmonaires et une pigmentation anormale de la peau au niveau des oreilles et de la queue (Ishii *et al.*, 1997b). Les souris knock-out pour le PAFR (Ishii *et al.*, 1998b) sont fertiles, se développent normalement, sont résistantes aux chocs anaphylactiques, montrent des symptômes modérés de réaction inflammatoire pulmonaire et ne présentent pas d'anormalité de pigmentation.

Activation du PAFR

Tout comme c'est le cas pour le récepteur TP, le PAFR n'est pas très fidèle à sa protéine G. En plus de lier la protéine G_q , le PAFR lie les protéines G_i et G_s (Agrawal *et al.*, 1992; Lin et Rui, 1994; Shi *et al.*, 1996) dépendamment du type cellulaire. Le couplage différentiel de G_s ou G_i a pour effet une augmentation de cAMP par la stimulation de l'adénylyl cyclase dans les macrophages (Asmis et Dennis, 1994) ou une diminution de cAMP par inhibition de l'adénylyl cyclase dans les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) (Honda *et al.*, 1994).

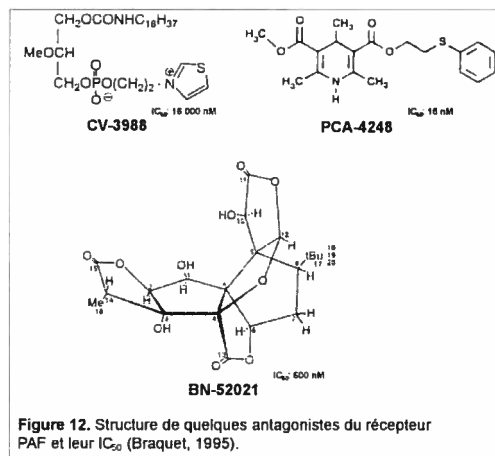
L'activation du PAFR peut déclencher le *turnover* des phosphoinositides (Chao et Olson, 1993; Izumi et Shimizu, 1995) par l'activation de la PLC et ses deux seconds messagers produits IP_3 et DAG, mobilisant le Ca^{2+} des stocks intracellulaires et activant la PKC, respectivement. Comme pour le récepteur TP, l'activation du PAFR peut directement ou indirectement moduler des canaux Ca^{2+} de type *receptor-operated* sur la membrane plasmique et créer un influx de Ca^{2+} extracellulaire (Chao et Olson, 1993), favorisant ainsi la synthèse de prostanoïdes. L'augmentation de la concentration de Ca^{2+}

intracellulaire a pour effet d'activer la cPLA₂ qui libère de l'acide arachidonique, mais aussi du lyso-PAF dans un mécanisme d'auto-induction de la production du PAF.

La cascade d'activation du PAFR inclut l'activation de NF-κB (Kravchenko *et al.*, 1995), l'induction de la transcription des gènes de type *immediate-early genes* (IEG) *c-fos* et *c-jun* (Bazan et Allan, 1996), COX-2 (Bazan *et al.*, 1997; Alvi *et al.*, 1999) et iNOS (Szabo *et al.*, 1993), ce qui implique l'activation des MAPKs (Izumi et Shimizu, 1995) via le Ca²⁺, la PKC et d'autres protéines kinases (Liu *et al.*, 1994) comme c'est le cas dans les plaquettes (Dhar *et al.*, 1990), les neutrophiles (Gomez-Cambronero *et al.*, 1991) et les macrophages (Chao *et al.*, 1992).

Antagonistes du PAFR

Plusieurs outils pharmacologiques sont disponibles afin d'empêcher l'activation du PAFR. Les expériences présentées au chapitre 5 ont nécessité l'emploi du CV-3988, PCA-4248 et BN-52021, trois antagonistes qui diffèrent par leur structure et permettent de mettre en évidence l'effet de l'inhibition sélective du PAFR (Fig. 12).



Le CV-3988 est le plus populaire des antagonistes du PAFR et sert souvent de standard dans les études sur le PAFR. Il s'agit d'un alkyléther, analogue à la structure du PAF (Takatani et Tsushima, 1991). Le PCA-4248 est un composé synthétique de la famille des dihydropyridines dérivé du développement de bloqueurs de canaux Ca²⁺ ayant un faible effet antagoniste sur le récepteur PAF. Il n'a aucun effet sur les canaux Ca²⁺

(Fernandez-Gallardo *et al.*, 1990). Quant au, le BN-52021, aussi appelé ginkgolide B, c'est un produit naturel extrait du *ginkgo biloba* utilisé depuis des siècles dans la médecine traditionnelle pour le traitement de l'asthme. Il est efficace, mais a le désavantage d'être peu sélectif et montre des propriétés antioxydantes et inhibitrices de protéases (Braquet *et al.*, 1985).

Rôles physiologiques du PAF

Le PAF agit de manière paracrine, autocrine et même de façon intracrine (Bazan *et al.*, 1991; Bussolino et Camussi, 1995). Plusieurs types cellulaires, tant inflammatoires que vasculaires, synthétisent le PAF (Whatley *et al.*, 1988; Christie et Henderson, 2002) et expriment le PAFR (Montrucchio *et al.*, 2000). Plusieurs systèmes sont affectés par le PAF incluant le système cardiovasculaire, le CNS, les systèmes gastro intestinal, immunitaire, oculaire, pulmonaire et reproducteur (Braquet *et al.*, 1987; Ishii et Shimizu, 2000).

Le premier rôle du PAF fut identifié dans les plaquettes où il induit une agrégation par un mécanisme incluant une synthèse et une relâche de TXA₂ (Siess, 1989) et une modification de l'expression de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Shattil *et al.*, 1998). Dans l'inflammation, le PAF augmente la perméabilité vasculaire et initie la migration des cellules inflammatoires. Sur la cellule endothéliale, le PAF par son effet sur le cytosquelette induit un changement de forme de la cellule et cause des intervalles (*gaps*) intercellulaires (Bussolino *et al.*, 1987); il induit aussi l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales faisant le pont entre les réponses inflammatoires et thrombotiques (Zimmerman *et al.*, 2002). Le PAF cause des réponses vasculaires différentes selon les lits vasculaires. Au niveau de la circulation générale, il cause une hypotension, une

tachycardie et un collapsus circulatoire (Goldstein *et al.*, 1991). Le PAF cause la constriction des artères rénales chez le chien et des artères cérébrales chez le porcelet (Scherf *et al.*, 1986; Armstead *et al.*, 1988), mais cause une dilatation des artères gastriques, mésentériques et fémorales encore chez le chien (Chu *et al.*, 1988).

Le cerveau et la rétine sont extrêmement riches en phospholipides et peuvent produire du PAF en réponse à un stimulus pathologique (Baker, 1995; Beauchamp *et al.*, 2002). De plus, le PAFR est distribué abondamment dans le cerveau au niveau de l'hippocampe (Domingo *et al.*, 1988), dans les terminaisons nerveuses du cortex cérébral (Marcheselli *et al.*, 1990) et dans les cellules endothéliales des microvaisseaux (Sun *et al.*, 1992; Montrucchio *et al.*, 2000). Le PAF a été impliqué dans de nombreuses pathologies du système nerveux central, telles que l'ischémie, l'hypoxie et les convulsions (Bonventre et Koroshetz, 1993) et a été associé à la mort neuronale et cellulaire endothéliale (Liu *et al.*, 1996; Ohmori *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 1998; Beauchamp *et al.*, 2002). Par exemple, le H₂O₂ formé durant l'ischémie peut activer la cPLA₂ (Boyer *et al.*, 1995) et contribuer à la synthèse du PAF (Lewis *et al.*, 1988). Un antagoniste de PAF ou des désactiveurs de radicaux libres ont un effet bénéfique dans ces situations (Braquet *et al.*, 1985).

Interactions PAF/TXA₂

Plusieurs des effets vasoconstricteurs du PAF sont attribués au TXA₂ (Dillon *et al.*, 1988; Goldstein *et al.*, 1991; Rizzo *et al.*, 1995), puisque les réponses hémodynamiques au PAF sont souvent accompagnées par la relâche de TXA₂ (Goldstein *et al.*, 1991).

Le stress oxydant, la synthèse du PAF et du TXA₂ sont intimement liés. Lewis et ses collègues (Lewis *et al.*, 1988) ont démontré que, dans deux types cellulaires endothéliaux différents (aortiques bovines et ombilicales humaines), que le H₂O₂ induit une stimulation de la synthèse et une accumulation de PAF. Le peroxyde agit en fonction du temps et de la dose pour induire une augmentation de la perméabilité à Ca²⁺ (Shasby *et al.*, 1985; Lewis *et al.*, 1988) et cause un influx de Ca²⁺ provenant du milieu extracellulaire par une peroxydation des lipides de la membrane qui peuvent alors agir, tels des ionophores de Ca²⁺ (Serhan *et al.*, 1981; Shasby *et al.*, 1985) et favoriser l'activation de la cPLA₂ dépendante du Ca²⁺. La cPLA₂ utilisera de manière préférentielle les lipides oxydés et relâchera non seulement le lyso-PAF, mais aussi de l'AA, substrat de la COX et précurseur de la synthèse des prostanoides. Dans des conditions de stress similaires, la synthèse du TXA₂ est favorisée au détriment de la formation de PGI₂ qui est inhibée par le H₂O₂ à des doses élevées (IC₅₀ 35 mM) ou par génération de O₂^{•-} au moyen du système xanthine/xanthine oxydase (Whorton *et al.*, 1985; Dillon *et al.*, 1988), un effet qui est contré par un désactivateur de radicaux libres (Taylor *et al.*, 1983). De telles concentrations de H₂O₂ peuvent paraître élevées, mais l'hyperoxie fournit un bon exemple dans lequel l'atteinte de telles concentrations est possible (Crapo, 1986). On comprend maintenant que le médiateur des effets du PAF, comme c'est le cas dans plusieurs types cellulaires, est le TXA₂. Le H₂O₂ (100 µM) dans les glomérules de rat produit non seulement du PAF, mais aussi une forte concentration de TXA₂, qui est maximale en peu de temps (30 min) et peut être inhibée par le BN-52021 (50 µM), un antagoniste du récepteur PAF (Arribas-Gomez *et al.*, 1995). L'abolition quasi complète de la synthèse de TXA₂ suggère que le PAF est un intermédiaire nécessaire dans certains

types cellulaires pour stimuler la TXS. Dans les neutrophiles de cochons d'Inde par exemple, le PAF promeut la génération de O_2^{\bullet} par un mécanisme qui peut être bloqué par un antagoniste sélectif pour le PAFR ou le TP, impliquant une synthèse de TXA_2 amorcée par une stimulation due à l'activation du PAFR (Kato *et al.*, 1993). Un phénomène semblable a été décrit pour le cerveau lors de l'ischémie-reperfusion alors que le PAF amplifie la relâche de O_2^{\bullet} et de H_2O_2 par les neutrophiles (Matsuo *et al.*, 1996).

L'exemple le plus probant d'une interaction entre le TXA_2 et le PAF au niveau de la microvascularisation a été récemment documenté par Hou et ses collègues (Hou *et al.*, 2003). Dans le cerveau immature, alors que les cellules endothéliales sont le plus sensibles au stress, la stimulation des microvaisseaux périventriculaires avec le C-PAF cause une vasoconstriction plus grande que chez l'adulte. Ce phénomène est en partie dû à une plus grande densité de PAFR, mais surtout à une grande concentration de TXA_2 produite par les cellules endothéliales en réponse au PAF (Hou *et al.*, 2003). Le tout peut être prévenu par l'emploi d'un inhibiteur de la TXS (CGS-12970) ou d'un antagoniste spécifique du TP (L-670596). Les canaux sensibles au voltage de type N ou L ne semblent pas impliqués, puisque la ω -conotoxin MVIIA et la nifédipine demeurent sans effet, mise à part l'abolition de la contraction musculaire lisse. Cela semble normal, puisque ces canaux ne se retrouvent pas sur la cellule endothéliale, mais ceci exclut donc un rôle joué par les astrocytes à proximité qui les expriment. Par contre, le TXA_2 n'était plus produit lorsqu'un bloqueur des canaux calciques de type *receptor-operated*, le SK&F96365, était employé. Une entrée de calcium opérée par la liaison de PAF à son

récepteur contribuerait à l'augmentation et à l'entretien de la synthèse de TXA₂ (Hou *et al.*, 2003).

Le PAF et la mort cellulaire

Malgré qu'il protège les lymphocytes de l'apoptose, le PAF est proapoptotique dans plusieurs types cellulaires, tels que les types dérivés de l'hippocampe (Shi *et al.*, 1998), les cellules épidermales (Barber *et al.*, 1998), les oligodendrocytes (Hostettler *et al.*, 2002) et les cellules épithéliales de l'intestin (Lu *et al.*, 2004). De plus, des infusions de C-PAF induisent des retards de croissance intra-utérins chez le rat de l'ordre de 19 à 35% (Thaete *et al.*, 2003). Le PAF est produit durant plusieurs pathologies à composante inflammatoire et joue un rôle primordial dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Le récepteur PAF est impliqué dans la cytotoxicité observée dans plusieurs modèles animaux (Panetta *et al.*, 1987; Lindsberg *et al.*, 1990; Bennett *et al.*, 1998). Dans l'intestin, les cellules épithéliales intestinales expriment le récepteur PAF (Merendino *et al.*, 1999) qui est présent exclusivement sur le côté apical de la membrane plasmique et son activation sert à la régulation du transport trans-épithélial des ions dans les colonocytes (Claud *et al.*, 2002). Dans un modèle animal de maladie inflammatoire de l'intestin, une infusion de PAF résulte en une nécrose de l'intestin (Gonzalez-Crussi et Hsueh, 1983) et une ulcération gastrique (Rosam *et al.*, 1986). Incidemment, de fortes concentrations de PAF sont retrouvées dans le plasma d'enfants prématurés développant une entérocolite nécrosante (Caplan *et al.*, 1990), alors que les concentrations de PAF-AH sont significativement plus basses dans l'iléon distal de patients aux prises avec la maladie de Crohn, si elles sont comparées aux groupes témoins (Kald *et al.*, 1996). Dans

des modèles murins, l'utilisation de PAF-AH ou d'antagonistes du récepteur PAF prévient les effets nocifs causés par le PAF (Caplan *et al.*, 1997a; Caplan *et al.*, 1997b).

Les mécanismes de mort induite par le PAF ne sont pas totalement élucidés. Le PAF cause l'apoptose des entérocytes IEC-6 et peut être prévenue par une surexpression de bcl-2 qui prévient la translocation induite par le PAF de bax vers la mitochondrie et la perte du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$). En plus de la perte de $\Delta\psi_m$, la translocation de bax, un membre proapoptotique de la famille bcl-2, à la mitochondrie cause la relâche du cytochrome c et la mort de la cellule. Bcl-2, qui elle est anti-apoptotique dimérise avec bax, afin d'établir une balance pro- ou anti-apoptotique (Oltvai *et al.*, 1993). Le même phénomène est observé dans un type cellulaire où le potentiel cytotoxique du PAF n'est plus à démontrer, soit dans les cellules neuronales provenant du cortex de rat où on observe une perte du $\Delta\psi_m$ et plus précisément sur des mitochondries isolées, une ouverture du pore transitoire mitochondrial (MTP) et une relâche du cytochrome c (Parker *et al.*, 2002).

Dans des cultures de cellules corticales provenant de cerveaux de fœtus de rats (16^e jour de gestation), une concentration de 50 μ M cause des dommages sévères après 12 heures selon un mécanisme qui est bloqué par le BN-52021, un antagoniste du récepteur PAF. Certains mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer la neurotoxicité du PAF et ils incluent des mécanismes faisant intervenir le pouvoir chémoattractant du PAF et la migration des neutrophiles et macrophages contribuant ainsi à la toxicité (Tong *et al.*, 2000). Une composante de stress oxydant peut être envisagée puisqu'une concentration non toxique de cPAF (500 nM) potentialise significativement les dommages causés par une concentration cytotoxique de H₂O₂ (Zhu et Bazan, 2004).

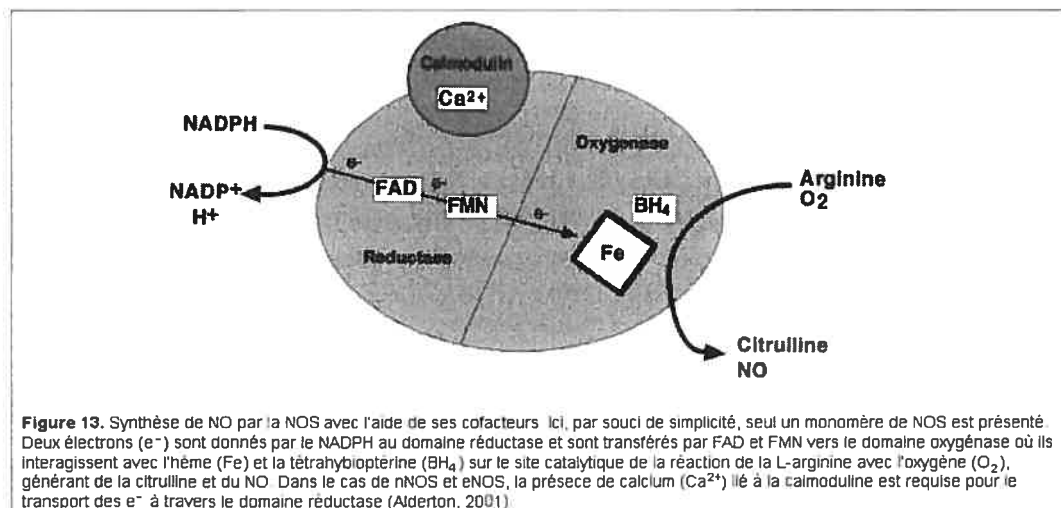
Cette potentialisation pourrait être expliquée par la capacité du PAF à faire produire des ROS dont le H_2O_2 . Ainsi de faibles quantités de PAF mènent à la faible production de H_2O_2 ; elles sont facilement éliminées et prises en charge par les molécules et les systèmes enzymatiques antioxydants, ce qui ne serait pas le cas si le H_2O_2 est présent en quantité plus importante dans le cytosol de la cellule suite à une activation du PAFR jumelée à un ajout exogène de H_2O_2 .

Si la cytotoxicité du PAF n'est plus à démontrer sur plusieurs types cellulaires, il en est tout autrement pour ce qui est du cellulaire endothélial pour lequel aucune toxicité n'a été établie. Les résultats publiés dans l'article présenté au chapitre 5 de la présente thèse démontrent, pour la toute première fois dans ce champ d'expérimentation, des effets cytotoxiques du PAF sur la microvascularisation rétinienne du rat nouveau-né (Chap. 5).

LE MONOXYDE D'AZOTE ET LES RADICAUX LIBRES

Synthèse de NO

Le NO est synthétisé par les NOS dont il existe trois isoformes : la NOS neuronale (NOS1 ou nNOS), la NOS inductible (NOS2 ou iNOS) et la NOS endothéliale (NOS3 ou eNOS). Généralement, les NOS sont considérés comme des dimères, alors que nous avons plutôt affaire à des tétramères, puisque deux monomères NOS sont associés à deux calmodulines (CaM) requises pour leur activation. Des cofacteurs sont aussi nécessaires au bon fonctionnement de l'enzyme et parmi eux se trouvent le (6R)-5,6,7,8-



tétrahydrobioptérine (BH_4), le FAD, le FMN et un hème pour catalyser la réaction qui transforme la L-arginine, la NADPH et le O_2 en NO, citrulline et NADP (Knowles et Moncada, 1994; Marletta, 1994) (Fig. 13). Le BH_4 , l'hème et la L-arginine servent à stabiliser le dimère de NOS. Le NADPH donne deux électrons (e^-) que FAD et FMN acceptent un à un avant de les passer à l'hème. La CaM contrôle le transfert d'électrons qui est plus lent en absence de Ca^{2+} (Matsuda et Iyanagi, 1999). Le NO qui résulte de la

synthèse par les NOS a une $t_{1/2}$ très courte (~ 1 sec) et est rapidement métabolisé par oxydation en nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-), deux produits stables et inactifs.

La NOS neuronale et la NOS endothéliale

La nNOS est présente principalement dans le cytosol de certains neurones du système nerveux central et périphérique (Bredt et Snyder, 1994), alors que la eNOS est principalement localisée dans la membrane plasmique des cellules endothéliales vasculaires (Forstermann *et al.*, 1991; Christopherson et Bredt, 1997). Ces deux isoformes sont présentes de façon constitutive dans les cellules et peuvent être activées par le Ca^{2+} et par la CaM. L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire entraîne la fixation du complexe Ca^{2+} /CaM sur la protéine NOS et donc son activation, entraînant la synthèse transitoire de NO. Le NO, produit ainsi de manière étroitement régulée, agit comme un messager en activant la guanylyl cyclase soluble, augmentant ainsi les niveaux de cGMP intracellulaires (Moncada et Palmer, 1991).

La NOS inducible

L'isoforme inducible iNOS n'est généralement pas exprimée de façon continue dans les cellules, mais est produite uniquement après une activation transcriptionnelle de son gène (Nussler et Billiar, 1993; Nathan et Xie, 1994). Son activité est généralement indépendante du complexe Ca^{2+} /CaM et elle produit ainsi du NO pendant de longues périodes. La iNOS a été tout d'abord décrite dans des macrophages murins stimulés par du LPS (Stuehr et Marletta, 1985), et l'ADN complémentaire murin de iNOS a été cloné dans ce même système (Lowenstein *et al.*, 1992; Lyons *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1994). Cependant, il est clairement établi aujourd'hui que de nombreuses autres cellules

expriment iNOS aussi bien *in vitro* après stimulation avec différentes cytokines qu'*in vivo* lors de certaines pathologies (Nathan, 1997).

Régulation de la synthèse de eNOS et nNOS

La régulation de eNOS et nNOS par le Ca^{2+} est bien connue, mais leur dépendance envers le Ca^{2+} est remise en cause par la découverte d'une activation de eNOS par phosphorylation via la sérine/thréonine protéine kinase Akt/PKB (Dimmeler *et al.*, 1999), ce qui augmente le flux d' e^- à travers le domaine réductase et augmente la production de NO. Son activité devient ainsi indépendante du Ca^{2+} et elle peut produire du NO durant de longues périodes. De plus en plus d'exemples démontrent que les NOS dites constitutives peuvent également être induites par des stimuli et produire de grandes quantités de NO. Ainsi, une induction importante de l'expression de la eNOS a été démontrée par les forces de cisaillement (Davis *et al.*, 2001), par les oestrogènes (Kleinert *et al.*, 1998) et par le VEGF (Hood *et al.*, 1998). Une expression de nNOS peut-être induite dans certaines cellules par différentes neurotrophines (Samdani *et al.*, 1997), comme le *nerve growth factor* (Holtzman *et al.*, 1994). La molécule chaperonne Hsp 90 a aussi été identifiée comme un régulateur de eNOS. Dans les cellules endothéliales, le VEGF, l'histamine ou les forces de cisaillement augmentent l'interaction de eNOS avec Hsp 90 et la production de NO par un facteur de 3 fois (Garcia-Cardena *et al.*, 1998).

Antagonistes de NOS

Le tableau II (Tab. II page 97) présente quelques bloqueurs de la synthèse de NOS. À l'heure actuelle, il n'existe aucun antagoniste spécifique de eNOS et les conclusions quant à la contribution de eNOS à un système donné doivent être déduites à

la suite de l'inhibition non sélective des trois NOS et de l'utilisation de bloqueurs plus sélectifs pour iNOS et nNOS. Il y a de plus en plus d'évidences qui suggèrent que des analogues méthylés de L-arginine soient produits de façon endogène. Des niveaux élevés de L-NMMA et de diméthylarginine sont trouvés dans le plasma et les urines, lors de maladies rénales, d'hypertension, d'athérosclérose, de diabète et contribuent à la dysfonction endothéliale (Boger et Bode-Boger, 2000).

Inhibiteur	IC ₅₀ (µM)			Sélectivité		
	iNOS	nNOS	eNOS	iNOS versus nNOS	iNOS versus eNOS	nNOS versus eNOS
L-NA	3.1	0.29	0.35	0.09	0.11	1.2
L-NMMA	6.6	4.9	3.5	0.7	0.5	0.7
7-NI	9.7	8.3	11.8	0.9	1.2	1.4
ARL 17477	0.33	0.07	1.6	0.2	5	23
Aminoguanidine	21	170	330	5.5	11	1.9
L-NIL	1.6	37	49	23	49	1.3
1400W	0.23	7.3	1000	32	> 4000	> 130
GW273629	8.0	630	1000	78	> 125	> 1.6
GW274150	1.4	145	465	104	333	3.2
TRIM	27	28.2	1037.5	1	39	1

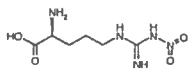
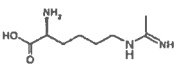
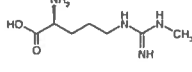
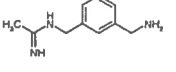

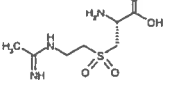
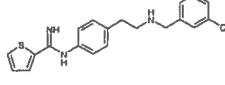
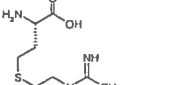

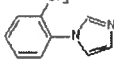
Inhibiteur	Structure	Inhibiteur	Structure
L-NA		L-NIL	
L-NMMA		1400W	
7-NI		GW273629	
ARL 17477		GW274150	
Aminoguanidine		TRIM	

Tableau II. IC₅₀, sélectivité et structure de quelques inhibiteurs de NOS. Les données se rapportent à l'inhibition de l'isoforme humain en présence de 30 µM de L-arginine à 37°C durant 15 min après une pré-incubation de 15 min avec l'inhibiteur (modifié de Alderton et al., 2001).

Régulation de la localisation de eNOS

La eNOS est acétylée de façon irréversible sur un résidu glycine en position N-terminal par le myristate et de manière réversible sur des résidus cystéine par le palmitate (Michel, 1999). Ces modifications sont requises pour une localisation efficace dans les

caveolae de la membrane plasmique des cellules endothéliales (Shaul *et al.*, 1996). Ce processus est régulé par la concentration de Ca^{2+} intracellulaire et par des interactions ligand-récepteur à la surface membranaire (Prabhakar *et al.*, 1998). Les caveolae sont les microdomaines de la membrane plasmique, face cytosolique (Garcia-Cardena *et al.*, 1996; Shaul *et al.*, 1996) et environ 57 à 100 % de l'activité eNOS est concentrée dans les caveolae (Shaul, 2002). Dans les caveolae, eNOS est lié à la protéine majeure des caveolae, caveoline-1, qui inhibe son activité dans une interaction qui est régulée par le complexe Ca^{2+} /CaM (Ju *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 1997).

Le gène eNOS

Chacun des trois isoformes de NOS est le produit d'un gène différent. Le gène humain de eNOS est encodé par 26 exons s'étendant sur 22 kb de l'ADN génomique et il est présent en une seule copie sur le chromosome 7 (Marsden *et al.*, 1993). Le cDNA de eNOS a été cloné dans les cellules endothéliales humaines, murines, porcines et bovines (Janssens *et al.*, 1992; Marsden *et al.*, 1992; Nishida *et al.*, 1992; Gnanapandithen *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997a) et sa séquence en acides aminés prédit une masse moléculaire de 133 kDa. L'homologie de séquence entre l'humain et le rat est ~90%. La caractérisation de la région 5' du gène eNOS montre qu'il est dépourvu de boîte TATA et possède des éléments promoteurs propres à une expression constitutive, soit des motifs Sp-1 et GATA (Zhang *et al.*, 1995). Le promoteur du gène eNOS contient de plus, des séquences consensus pour la liaison des facteurs de transcription AP-1, AP-2, NF-1, NF-IL-6, NF- κ B et PEA3. Les études de délétion ont montré des rôles essentiels pour les sites de liaison Sp-1 (position -103) et PEA3 (-26), ainsi que pour la séquence consensus GATA (-230). Ainsi la stimulation de la cellule endothéliale par les oestrogènes ou la

lysophosphatidylcholine augmente l'activité de liaison du facteur de transcription Sp-1 (Kleinert *et al.*, 1998), alors que des mutations dans le site consensus GATA ou le site de liaison PEA3 réduisent grandement l'activité du promoteur du gène.

Phénotype de la souris invalidée pour le gène eNOS

Les souris knock-out pour le gène eNOS sont hypertendues (Huang *et al.*, 1995), ne présentent pas de vasodilatation dépendante de l'endothélium (Huang *et al.*, 1995), montrent une augmentation de la prolifération néointimale lors d'insultes vasculaires (Moroi *et al.*, 1998; Rudic *et al.*, 1998), sont plus sensibles à l'ischémie cérébrale (Huang, 1999), sont bradycardes (Kojda *et al.*, 1999), présentent une augmentation de la réponse contractile cardiaque à des agonistes β (Godecke *et al.*, 2001) et une réduction de la sévérité de la ROP (Brooks *et al.*, 2001).

Rôles physiologiques du NO

Le NO produit dans les cellules endothéliales joue un rôle central dans la régulation du tonus vasculaire (Vallance *et al.*, 1989). En ce sens, les vaisseaux de résistance sont dans un état basal de vasodilatation induite par le NO. Le NO produit par la cellule endothéliale stimule la guanylyl cyclase dans le muscle lisse vasculaire et augmente la synthèse de cGMP (Garbers, 1992), ce qui induit une relaxation au niveau de la fibre musculaire en empêchant l'interaction actine/myosine (Archer *et al.*, 1994). Le NO est produit en réponse à l'acétylcholine et la bradikinine (Furchgott et Zawadzki, 1980), mais aussi en réponse aux forces de cisaillement (Rubanyi *et al.*, 1986). Une infusion de L-NMMA (Tab. II, page 97) induit une augmentation de la résistance vasculaire en fonction de la dose (Vallance *et al.*, 1989) et une diminution du débit

sanguin, tel que démontré dans l'avant-bras, mais aussi dans le cerveau et les reins. Le NO est impliqué dans d'autres aspects de la fonction cellulaire endothéliale, comme la perméabilité et la prolifération (Fukumura *et al.*, 2001), notamment avec son interaction avec le VEGF. Le NO produit par les cellules endothéliales inhibe le *rolling* et l'adhésion des leucocytes aux microvaisseaux. Au niveau des muscles squelettiques, le NO régule la force produite par le muscle, la différenciation des myocytes et l'homéostasie du glucose (Stamler et Meissner, 2001). Le NO neuronal agit comme un neurotransmetteur dans le système nerveux central et peut affecter des millions de synapses en raison de sa diffusion rapide (Wood et Garthwaite, 1994). C'est le cas dans les processus de potentialisation à long terme (LTP) impliqués dans les mécanismes de la mémoire (Schuman et Madison, 1991; Bohme *et al.*, 1993). Le NO est aussi le médiateur de la toxicité produite par une relâche excessive de glutamate observée lors des accidents vasculaires cérébraux et d'autres maladies neurodégénératives (Osborne *et al.*, 1999). Dans le système nerveux périphérique, le NO agit également comme neurotransmetteur (Rand et Li, 1995) entraînant une relaxation du système gastro-intestinal (Desai *et al.*, 1991) et du corps caverneux, responsable de l'érection pénienne (Burnett *et al.*, 1992).

Interactions entre le monoxyde d'azote et le VEGF

Une incubation à court terme de cellules endothéliales avec le VEGF mène à une activation de eNOS alors qu'une incubation à plus long terme régule son expression protéique à la hausse (Papapetropoulos *et al.*, 1997; Hood *et al.*, 1998). La régulation s'effectue par l'activation du récepteur VEGFR-2 via la phosphorylation des MAPKs ERK 1/2 (Bouloumie *et al.*, 1999). Comme les niveaux d'ARNm de eNOS demeurent élevés dans les cellules traitées avec VEGF en présence d'un inhibiteur de la

transcription, actinomycine D, il y aurait aussi une augmentation de la stabilité des ARNm (Bouloumie *et al.*, 1999). La régulation à la hausse de l'expression de eNOS peut aussi se faire aussi par la PLC γ activée par la liaison de VEGF à VEGFR-2. La PLC active alors la PKC pour mener à une modulation de l'expression de eNOS (Shen *et al.*, 1999).

La régulation de VEGF par le NO est aussi possible. Des cellules musculaires lisses transfectées avec iNOS ou eNOS sont associées avec une augmentation de la synthèse de VEGF, une synthèse qui peut être bloquée par un antagoniste de NOS, L-NAME (Tab. II, page 97), mais pas par son énantiomère inactif D-NAME. De plus, en présence de l'inhibiteur, la synthèse de VEGF est rétablie par l'ajout de L-arginine (Jozkowicz *et al.*, 2001). Cette observation a aussi été faite dans d'autres types cellulaires, tels que les macrophages (Xiong *et al.*, 1998), les kératinocytes (Frank *et al.*, 1998), les hépatocytes (Ankoma-Sey *et al.*, 2000) et les cellules mésangiales (Frank *et al.*, 1999). Les mécanismes plausibles seraient la régulation à la hausse de l'activité de liaison de AP-1 sur le promoteur de VEGF par le NO (Haby *et al.*, 1994) et le prolongement de la $t_{1/2}$ de l'ARNm du VEGF comme cela a été démontré dans deux types de cellules tumorales (Chin *et al.*, 1997).

Le monoxyde d'azote dans la rétine

Localisation de NOS

La présence de NOS dans la rétine a été démontrée par la technique de marquage de l'activité NADPH diaphorase (NADPH-d). Cette technique utilise l'activité NADPH-d associée aux NOS pour réduire un sel de tétrazolium en un produit de formazan de couleur bleutée insoluble. La technique n'est pas spécifique et marque les trois isoformes

de NOS (Eldred, 2000). Au niveau de la rétine, les NOS ont été identifiés dans plusieurs types cellulaires : les cellules amacrines et ganglionnaires (Dawson *et al.*, 1991), l'épithélium pigmentaire (Goureau *et al.*, 1993), les cellules de Müller (Kobayashi *et al.*, 2000), les photorécepteurs (Yamamoto *et al.*, 1993), les fibres nerveuses des couches plexiformes interne et externe (Yamamoto *et al.*, 1993), l'endothélium des vaisseaux et capillaires, de même que dans les péricytes (Chakravarthy *et al.*, 1995; Toda *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1999).

Rôle du NO dans la circulation choroïdienne et rétinienne

Les vaisseaux sanguins oculaires contenant un endothélium relâchent de façon basale du NO maintenant les muscles lisses de la vascularisation dans un état de relaxation. Par ailleurs, son action dépendante du cGMP est capable de relaxer le tonus contractile des péricytes rétiniens (Haefliger *et al.*, 1994b). La perfusion de l'œil avec L-NMMA induit une contraction significative (Haefliger *et al.*, 1992). Chez le chien, une injection i.v. de L-NMMA induit une diminution du débit sanguin choroïdien et rétinien d'environ 40 % et 15 % respectivement (Deussen *et al.*, 1993). Par contre, chez le lapin, l'administration de L-NAME réduit le débit sanguin ~50 % (Seligsohn et Bill, 1993).

On remarque des différences dans la capacité de maintenir un débit sanguin adéquat malgré le changement de la pression de perfusion entre le sujet nouveau-né et le sujet adulte. Chez l'adulte, les débits sanguins sont assez bien autorégulés et le NO y joue un rôle important surtout dans le cas de la circulation choroïdienne. Par contre, chez le nouveau-né l'intervalle d'autorégulation des débits choroïdiens est très étroit (Chemtob *et al.*, 1991) et de récentes études (Hardy *et al.*, 1994; Hardy *et al.*, 1996a; Hardy *et al.*, 1996b; Hardy *et al.*, 1998a; Hardy *et al.*, 1998b) ont mis en évidence une

vasoconstriction insuffisante ou une vasodilatation exagérée quand la pression de perfusion est augmentée notamment par des interactions avec les radicaux libres, le NO et les prostaglandines. De plus dans la rétine immature, la production de NO est grandement augmentée et cette plus grande production est jumelée à une activité aussi plus importante contribuant au stress oxydant et à la peroxydation lipidique, éléments contribuant au développement de la ROP (Hardy *et al.*, 2000).

Rôle du NO dans la ROP

La ROP est en partie causée par l'apport augmenté d'oxygène par la circulation choroïdienne et par ricochet, la circulation rétinienne. Chez le nouveau-né, les mécanismes rétiniens et choroïdiens d'autorégulation des débits sanguins en réponse à des changements de perfusion de tension d'oxygène (Chemtob *et al.*, 1991; Hardy *et al.*, 1996b), de même que les systèmes antioxydants (Oliver et Newsome, 1992) ne sont pas bien développés. Durant la période périnatale et dans le cas d'une rétine immature, la choroïde est la source majeure d'oxygène pour la rétine. Une augmentation du débit sanguin choroïdien, notamment produite par le NO se traduit par une hausse de la PO_2 dans la rétine. De plus, dans la choroïde immature, l'expression et l'activité des nNOS et eNOS, sont augmentées comparativement à l'adulte et l'effet vasorelaxant du NO est plus prononcé (Hardy *et al.*, 1996b). La réponse exagérée au NO peut être inhibée par des inhibiteurs de COX, par des inhibiteurs de PGI_2 synthase et par des bloqueurs de canaux K^+ indiquant, que la relaxation est largement dépendante de la prostacycline (PGI_2) et de façon moindre par le cGMP. Enfin, des donneurs de NO augmentent la synthèse de PGI_2 (Hardy *et al.*, 1998a).

Phase vaso-oblitérative

Dans certaines conditions oxydantes, il peut y avoir oxydation du cofacteur stabilisant de NOS, BH_4 et découplage de la formation du NO dans le sens d'une oxydation du NADPH et d'une production importante d'ions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) (List *et al.*, 1997; Stroes *et al.*, 1998). Le NO réagit alors avec le $O_2^{\cdot-}$ et forme le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) cytotoxique pour la cellule endothéliale. Les peroxynitrites peuvent aussi être formés par un autre produit des NOS, l'ion nitroxyde (NO^{\cdot}), qui peut réagir avec le O_2 , mais selon une cinétique beaucoup plus lente (Sharpe et Cooper, 1998). La production de NO et l'expression de NOS observés dans la rétine immature, jumelées au stress oxydant relié à l'hyperoxie, favorisent la formation de $ONOO^{\cdot}$, la peroxydation des membranes lipidiques et la perte de l'intégrité vasculaire endothéliale.

Dans le modèle murin de la rétinopathie ischémique induite par l'oxygène, Brooks et ses collègues (Brooks *et al.*, 2001) ont pu démontrer récemment, grâce à l'utilisation des souris invalidées pour le gène de la eNOS, que cette isoforme participe à la perte de capillaires centraux pendant la phase vaso-oblitérative d'exposition à l'oxygène probablement par la production de $ONOO^{\cdot}$. Par contre, le rôle de eNOS dans la phase ischémique subséquente du modèle reste obscure, mais les souris $eNOS^{-/-}$ ne développent pas d'ischémie rétinienne après la phase d'oxygénation et ne développent pas non plus de néovascularisation (Brooks *et al.*, 2001).

Des modulations éventuelles de l'activité des NOS dans la rétinopathie ischémique proliférante, pouvant directement être mises en rapport avec la nNOS n'ont jusqu'à aujourd'hui jamais été rapportées, alors que la iNOS est associé à la phase de néovascularisation.

Phase de néovascularisation

Plusieurs études illustrent les effets importants du NO dans la phase de néovascularisation. Le VEGF stimule la relâche de NO dans les cellules endothéliales (Papapetropoulos *et al.*, 1997) et participe à la cascade d'induction de l'angiogenèse (Ziche *et al.*, 1997). Le NO régule aussi à la baisse l'expression de VEGF induite lors d'hypoxie (Liu *et al.*, 1998; Ghiso *et al.*, 1999). Par exemple, l'expression de iNOS inhibe l'angiogenèse en régulant à la baisse l'expression de VEGFR-2 (Sennlaub *et al.*, 2001). Les mécanismes précis expliquant des effets divergents du NO demeurent mal compris; cet aspect sera abordé dans le chapitre 3.

Les radicaux libres

Généralités

Les régions occupées par les électrons (e^-) autour d'un atome ou d'une molécule sont appelées « orbitales ». Chaque orbitale peut contenir un maximum de 2 e^- . Lorsqu'un électron est seul sur son orbitale, il est dit « non pairé » et un radical est défini comme étant n'importe quelle espèce ayant un ou plus d'un e^- non pairé. À cause de ces caractéristiques physico-chimiques, lorsque des e^- lui sont transférés, l'oxygène (O_2), qui a deux e^- non pairés reçoit ses e^- un à la fois, ce qui donne lieu à toutes sortes d'intermédiaires, tels que : l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde (H_2O_2), le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et l'ion hydroxyle (OH^-), pour ne nommer que ceux-là.

L'ion superoxyde

L'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est le produit de la réduction d'un e^- à partir de O_2 . C'est une espèce très réactive qui est produite dans les cellules par les chaînes de transport d' e^- ,

telles que celles dans les mitochondries et le RE (Halliwell, 1990), les NOS (Pou *et al.*, 1992; Cosentino *et al.*, 1998), les COX (Kukreja *et al.*, 1986), les LOX (Kukreja *et al.*, 1986), les xanthines oxydases (Grunfeld *et al.*, 1995) et les NADPH oxydases (Griendling *et al.*, 1994). À pH physiologique, $O_2^{\cdot-}$ est rapidement converti en H_2O_2 qui n'est pas un radical en soi. Durant cette réaction, le radical hydroperoxyde (HO_2^{\cdot}) peut être formé (Halliwell, 1984) et représente une espèce encore plus réactive que $O_2^{\cdot-}$ (Bielski et Shive, 1979). En plus des espèces $O_2^{\cdot-}$ et HO_2^{\cdot} , les effets toxiques des radicaux peuvent être médiés par plusieurs autres espèces par exemple H_2O_2 , HO^{\cdot} ou le singulet oxygène (O_2^1).

Le singulet oxygène

Le singulet oxygène (O_2^1) est très instable et peut rapidement oxyder plusieurs molécules et les membranes lipidiques. Le O_2^1 est formé durant la réaction de dismutation de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 ou lors de la réaction de $O_2^{\cdot-}$ avec H_2O_2 (Del Maestro, 1980; Arudi *et al.*, 1984; Southorn et Powis, 1988). Le rôle exact de O_2^1 n'est pas certain, puisque la plupart des désactiveurs pharmacologiques utilisés ne sont pas spécifiques à cette espèce et neutralisent aussi d'autres radicaux (Halliwell et Gutteridge, 1984).

Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est produit directement par certaines oxydases (glycolate oxydase, aminoacide oxydase) ou via $O_2^{\cdot-}$ par une réaction de dismutation. Cette réaction est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 est plus stable que les autres espèces, il est liposoluble et peut donc traverser les membranes et être

transformé en espèces plus dommageables et réactives, telles que le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$).

Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) est formé quand $\text{O}_2\cdot^-$ réagit avec H_2O_2 dans la réaction :



Contrairement à l'ion hydroxyle, $\cdot\text{OH}$ est extrêmement réactif réagit généralement très près de son site de production avec la première molécule qu'il rencontre. Le $\cdot\text{OH}$ peut aussi être produit par la décomposition de l'eau par des rayons ionisants (Southorn et Powis, 1988) ou à tout moment lorsque H_2O_2 entre en contact avec l'ion cuivre (Cu^+) ou l'ion fer (Fe^{2+}) contenus dans plusieurs complexes métalliques (Halliwell, 1984). Habituellement, l'organisme s'assure que les ions Cu^+ et Fe^{2+} soient le plus souvent possible liés à des protéines de transport ou à des protéines fonctionnelles comme la transferrine, la céruloplasmine ou l'hémoglobine. Les métaux liés à ces protéines sont inactifs ou ne catalysent que très faiblement la production de $\cdot\text{OH}$ (Winterbourn, 1983; Halliwell, 1984).

Composantes cellulaires affectées par les espèces oxygénées réactives

Les ROS sont pour la plupart très prompts à réagir avec ce qui se trouve dans leur environnement immédiatement. Les groupements thiols ($-\text{SH}$) ou aromatiques (tyrosine par exemple) présents dans les protéines, les rendent très susceptibles à l'oxydation par les ROS. L'attaque sur la protéine par les ROS peut induire une modification de la charge électrique et une fragmentation de la chaîne peptidique, une altération de la structure

secondaire et tertiaire, une inactivation des sites catalytiques et une diminution de la solubilité due à l'exposition de sites hydrophobes (Davies, 1987).

L'ADN aussi peut être sujet à des attaques par les ROS, particulièrement par le radical $\cdot\text{OH}$, menant à l'hydroxylation des purines et des pyrimidines, causant des cassures dans l'ADN et une altération de la synthèse protéique, et amplifiant des mutations (Teoule, 1987).

Enfin, la réaction la plus intéressante est probablement celle qui a lieu sur les membranes lipidiques où les ROS peuvent initier et propager la peroxydation lipidique. L'initiation de la peroxydation lipidique a lieu lorsque n'importe quelle espèce radicalaire retire un atome d'hydrogène à un groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$) de la chaîne de carbone d'un PUFA de la membrane plasmique, laissant un radical alkyle ($-\cdot\text{CH}-$). Le radical alkyle subit un réarrangement moléculaire et forme un diène conjugué qui se combine rapidement avec l'oxygène pour former un radical peroxyde ($\text{LOO}\cdot$). Le radical peroxyde est capable de prendre un hydrogène d'une chaîne polyinsaturée voisine et ainsi propager la réaction de peroxydation qui continuera tant que les PUFAs ne seront pas complètement oxydés en hydroperoxydes (LOOH) ou lorsqu'un $\text{LOO}\cdot$ réagit avec un radical pour terminer la réaction (Flaherty et Weisfeldt, 1988; Southorn et Powis, 1988).

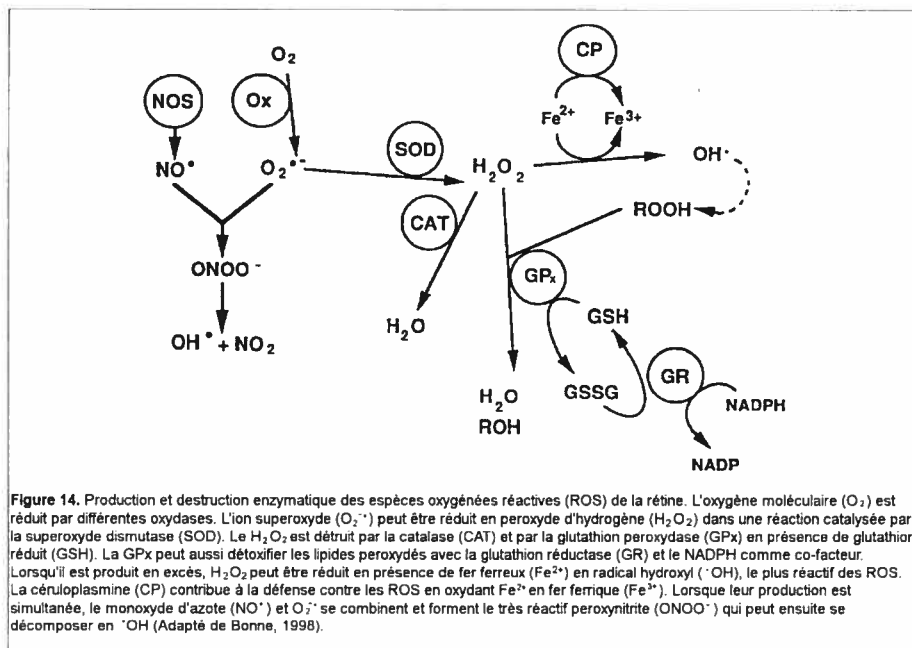
Les hydroperoxydes sont stables sous conditions physiologiques jusqu'à ce qu'ils entrent en contact avec des sels de métaux de transition, tels que le fer et le cuivre. Les sels de Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , tout comme les cytochromes et l'hémoglobine (hèmes) interagissent avec les lipides peroxydés et contribuent à la formation de ROS qui propagent la réaction de peroxydation. Lors de ces réactions, des aldéhydes sont formés, notamment le malondialdéhyde qui peut être dosé pour évaluer la peroxydation lipidique.

Systèmes antioxydants de la rétine

La rétine représente un tissu particulièrement sensible au stress oxydatif. Elle a un taux de consommation d'oxygène très rapide même en condition normoxique propice à la formation de ROS (Rodieck, 1973). Elle a le plus haut niveau de PUFA de tous les tissus (Daemen, 1973). Les PUFA sont les substrats de choix pour la peroxydation par les ROS. La lumière est un initiateur connu de la formation de ROS (Delmelle, 1979).

Afin de se protéger de la peroxydation lipidique, les membranes animales contiennent du tocophérol (vitamine E) qui termine la peroxydation de façon très efficace. Outre le tocophérol, d'autres nutriments participent au maintien d'un potentiel redox réduit comme l'acide rétinoïque (vitamine A) et ascorbique (vitamine C). De plus, la vitamine C est capable de régénérer (réduire) la vitamine E oxydée et contribue ainsi à son activité (Halliwell, 1990). Des systèmes enzymatiques se chargent aussi de se débarrasser des ROS. La métalloprotéine superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de $O_2^{\cdot-}$, laissant du H_2O_2 et de l'oxygène (Fridovich, 1978). Deux types de SOD sont retrouvés dans la cellule : Cu-Zn-SOD est retrouvée dans le cytosol, alors que Mn-SOD est mitochondrial. En situation physiologique normale, la plus grande activité SOD est retrouvée dans la rétine (Alder *et al.*, 1990). Quant à la catalase (CAT) elle est une hémoprotéine qui transforme H_2O_2 en H_2O et oxygène. L'enzyme présente une affinité proportionnelle à la concentration de H_2O_2 (Southorn et Powis, 1988). La glutathion peroxydase (GPx), qui se trouve dans le cytoplasme et la mitochondrie (Flaherty et Weisfeldt, 1988), se charge de mettre fin à la peroxydation lipidique et de se débarrasser du H_2O_2 à faible concentration en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme

cofacteur. Le glutathion est régénéré par la glutathion réductase (Southorn et Powis, 1988). Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants sont présentés à la figure 14.



Dans la rétine prématurée, les enzymes antioxydantes incluant la SOD et la GPx sont présentes à des niveaux plus faibles (Inder *et al.*, 1994). De plus, les enfants aux prises avec une ROP active montrent une déplétion des stocks de GSH (Papp *et al.*, 1999). Un niveau de GSH cellulaire élevé est associé à un potentiel redox réduit ($[H_2O_2] < 0,7 \mu M$) alors que la déplétion de GSH amène un état redox oxydé ($[H_2O_2] > 3 \mu M$) (Schroeter *et al.*, 2002).

Interactions entre le monoxyde d'azote et les espèces oxygénées réactives

L'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le NO peuvent se combiner et former le peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$) et son acide peroxyde d'azote ($ONOOH$). La production simultanée de NO et $O_2^{\cdot-}$, par l'intermédiaire de son $ONOO^{\cdot}$ (Ischiropoulos *et al.*, 1992), augmente très nettement la toxicité de $O_2^{\cdot-}$ ou NO seul (Beckman, 1990; Beckman *et al.*, 1990). Par exemple, $ONOO^{\cdot}$ est responsable des dommages tissulaires lors de la reperfusion comme c'est le

cas à la suite d'une ischémie cérébrale (Beckman, 1990; Dawson, 1994). En plus de son effet cytotoxique sur la cellule endothéliale (Beckman *et al.*, 1990; Wink et Mitchell, 1998; Davis *et al.*, 2001), ONOO⁻ est un puissant oxydant capable de modifier plusieurs acides aminés incluant la tyrosine, le tryptophane, la cystéine et la méthionine (Radi *et al.*, 1991; Alvarez *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 1999).

La formation de 3-nitrotyrosine sur la tyrosine liée à une protéine est importante lorsqu'il y a présence simultanée de ROS et NO, une condition retrouvée lors du stress oxydant menant à la vaso-oblitération rétinienne (Brooks *et al.*, 2001; Beauchamp *et al.*, 2004). La nitrotyrosine se retrouve partout dans la cellule, même au niveau mitochondrial (MacMillan-Crow *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 2002). Considérant que la mitochondrie est une source majeure de O₂^{-•} et la récente découverte d'une NOS mitochondriale (Giulivi *et al.*, 1998; Ghafourifar *et al.*, 2001), la formation de nitrotyrosine peut avoir un effet important lors de dysfonctions endothéliales enclenchant des processus de mort cellulaire faisant appel à la mitochondrie. Ce n'est pas tous les résidus tyrosines qui sont des cibles potentielles pour la nitration. La sélectivité dépend de la composition, la structure, la concentration intracellulaire, la localisation et l'interaction de la protéine avec d'autres molécules (Ischiropoulos, 1998; Souza *et al.*, 1999). Des anticorps spécifiques sont disponibles et la 3-nitrotyrosine est souvent utilisée comme un marqueur de stress oxydant (Ischiropoulos, 1998).

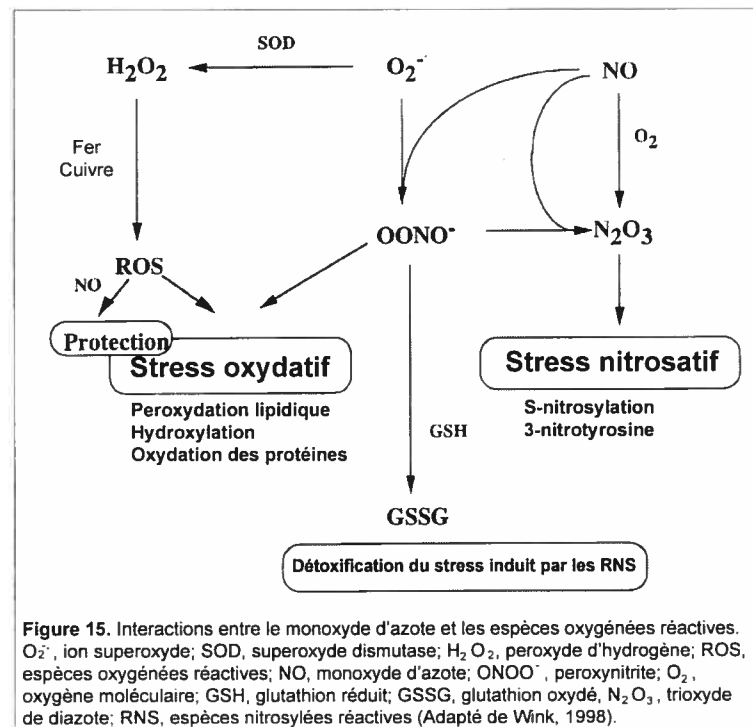
Les dysfonctions protéiques dues à la 3-nitrotyrosine ont été démontrées pour plusieurs protéines. La Mn-SOD est inactivée par la nitrotyrosine et contribue à augmenter la concentration de O₂^{-•} (MacMillan-Crow *et al.*, 1996). Dans la sclérose latérale amyotrophique, la nitrotyrosine affecte les neurofilaments provoquant une

diminution du transport axonal et induisant ainsi leur apoptose (Crow *et al.*, 1997; Estevez *et al.*, 1998; Peluffo *et al.*, 2004). Dans un modèle classique de la maladie de Parkinson, la tyrosine hydroxylase est nitrotyrosinée et pourrait être responsable de la baisse de la synthèse de catécholamines (Blanchard-Fillion *et al.*, 2001). D'autres types de nitration affectent d'autres protéines notamment la S-nitrosylation par l'attaque du cation nitrosyle (NO^+) sur un groupement thiol (-SH). Cette modification peut aussi affecter le fonctionnement de protéines comme le facteur de transcription NF- κ B (Reynaert *et al.*, 2004) et les caspases. La S-nitrosylation pourrait participer à l'activation de certaines cystéine-aspartate protéases (caspases) telles que la caspase-3 et la caspase-9 (Mannick *et al.*, 2001). Une diminution de l'activité protéase par S-nitrosylation est aussi possible et protégerait de la mort cellulaire par inhibition des caspases (Li *et al.*, 1997a; Tenneti *et al.*, 1997).

Le monoxyde d'azote en tant qu'antioxydant

Dans les sections précédentes, les effets cytotoxiques du NO par son interaction avec les ROS ont été décrits. Par contre, il semble que, selon la situation, le NO puisse être cytoprotecteur ou cytotoxique (Fig. 15, page 113) et plusieurs y voient un effet dépendant de la dose. De faibles concentrations de NO seraient cytoprotectrices, alors que des concentrations plus fortes seraient cytotoxiques (Dimmeler *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 2000; Wink *et al.*, 2001). Le NO peut agir comme un désactiveur de radicaux libres avec le radical hydroxyle ($^{\bullet}\text{OH}$) et les complexes métalliques de hautes valences (Halliwell, 1991). À des concentrations de NO biologiques, le NO peut terminer la peroxydation lipidique en réagissant avec un radical peroxyde (LOO^{\bullet}). En se liant à des

complexes ferreux (Fe^{2+}), le NO forme un métal nitrosylé qui empêchera les peroxydes d'interagir avec le complexe métallique et de former des ROS (Wink *et al.*, 2001). Enfin, la S-nitrosylation peut inhiber l'activation de caspases proapoptotiques (Rauhala *et al.*, 2002).



Dans plusieurs cas, des traitements avec le NO ou des donneurs de NO se sont avérés bénéfiques. Par exemple, un traitement avec le NO protège les hépatocytes contre les peroxydes (Kim *et al.*, 1995). Dans les macrophages, le NO peut prévenir l'assemblage de la NADPH oxydase qui est un grand contributeur de l'instauration d'un stress oxydatif commun à différentes réactions immunitaires (Clancy *et al.*, 1992). Le NO produit de façon endogène ou par des agents pharmacologiques exogènes protège contre l'ischémie-reperfusion, au niveau du myocarde (Siegfried *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1993),

mais aussi au cerveau dans un modèle d'ischémie autant focale que globale (Mason *et al.*, 2000).

LA MORT CELLULAIRE

Depuis la première description de la nécrose par Virchow en 1858 (Virchow, 1858), on s'intéresse aux processus impliqués dans la dégénération des cellules soit dans les phénomènes physiologiques comme l'élimination des neurones superflus lors du développement ou dans les phénomènes pathologiques en réponse à l'ischémie comme c'est le cas lors de l'infarctus du myocarde ou encore tout autre stimulus endogène ou exogène capable de provoquer la mort cellulaire. Historiquement, on a défini deux types de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose (Kerr *et al.*, 1972). La situation actuelle semble tout autre puisque certains prônent l'idée qu'il y aurait autant de types de mort cellulaires que de types cellulaires (Lockshin et Zakeri, 1991), alors que d'autres pensent que les caractéristiques de la mort cellulaire dépendent du type de stimulus (Schwartz *et al.*, 1993).

Les termes « apoptose » et « nécrose »

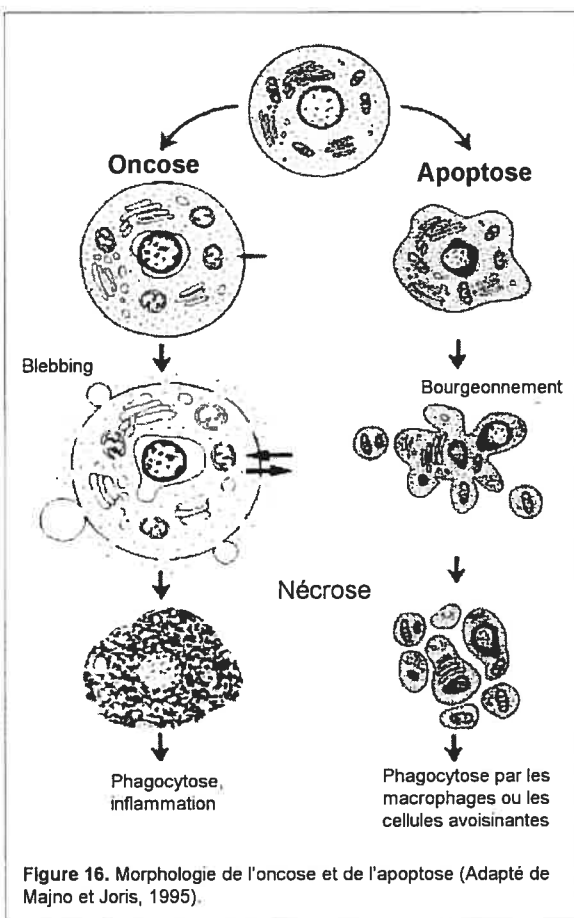
La racine du terme « apoptose » nous vient du grec et signifie « chute des feuilles » faisant allusion au phénomène cyclique de la chute des feuilles automnales et suggérant une mort douce, orchestrée et prévisible dans la limite où l'on connaît l'élément déclencheur. Alors que le terme apoptose est accepté par tous, le terme nécrose pose quelques problèmes. Les cellules nécrotiques montrent toutes un gonflement cellulaire et l'on devrait donc appeler le phénomène « oncose » qui signifie « gonflement ». Ce terme a été d'abord proposé par von Recklinghausen en 1910, puis récemment par Majno et Joris en 1995 (von Recklinghausen, 1910; Majno et Joris, 1995) et caractérise toutes les cellules ayant une mort due à l'ischémie. Alors que le terme oncose est plus descriptif, le

terme nécrose fait plutôt état de constatation d'une finalité qui peut être commune tant à l'oncose qu'à l'apoptose (Majno et Joris, 1995).

L'apoptose

L'apoptose est marquée par une perte de volume, une condensation et une margination de la chromatine, une fragmentation de l'ADN de façon spécifique à environ chaque 185 paires de bases et un

bourgeonnement (*budding*) de la membrane plasmique. La cellule apoptotique se divise en corps apoptotiques constitués d'organelles intactes et de matériel nucléaire, le tout entouré par une membrane plasmique intacte (Fig. 16). Les corps apoptotiques sont ensuite phagocytés par des macrophages ou des cellules non spécialisées avoisinantes (Kerr *et al.*, 1972). De façon générale, les macrophages reconnaissent les corps apoptotiques par l'expression de



phosphatidylsérines sur la surface externe normalement exprimées sur la surface interne de la membrane plasmique (Fadok *et al.*, 1992), mais peuvent aussi les reconnaître par l'expression du récepteur vitronectine ou de certains carbohydrates (Duvall *et al.*, 1985; Savill *et al.*, 1990). Par contre, les corps apoptotiques ne sont pas toujours reconnus et phagocytés par les macrophages et les cellules présentent alors les caractéristiques de

l'oncose qu'on qualifiait de « nécrose apoptotique », le tout sans qu'il n'y ait de réaction inflammatoire probablement parce que la concentration des molécules chémoattractantes est trop faible pour déclencher la cascade inflammatoire (Majno et Joris, 1995).

L'apoptose est un phénomène de plus en plus étudié depuis que Ellis et Horvitz en 1986 (Ellis et Horvitz, 1986) ont mis en évidence les 10 gènes responsables de la mort cellulaire d'exactly 131 cellules sur les 1090 que compte le nématode *C. elegans*. Ces gènes trouvent leur équivalent chez les vertébrés et codent pour des protéines qui, une fois activées, agissent en tant que caspases sur plusieurs substrats. Jusqu'à présent, on compte 14 caspases qui sont synthétisées sous forme de proenzyme qu'un signal en aval convertit en protéases matures. Parmi ces caspases, les caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10 et -14 sont des caspases initiatrices et sont activées par une autoprotéolyse induite par une oligomérisation (Yang *et al.*, 1998), tandis que caspase-3, -6 et -7 sont des caspases exécutrices et sont activées par plusieurs protéases incluant les caspases initiatrices.

Trois mécanismes majeurs mènent à l'activation des caspases : 1) l'interaction ligand-récepteur et l'activation subséquente de caspase-8; 2) un mécanisme mitochondrial menant à l'activation de la caspase-9 et 3) un mécanisme impliquant le réticulum endoplasmique et une activation de la caspase-12 (Nakagawa *et al.*, 2000). Tous ces mécanismes mènent à l'activation de la caspase-3 qui est responsable de la plupart des caractéristiques morphologiques de la cellule apoptotique (Shiokawa *et al.*, 1997). Elle coupe plusieurs protéines incluant la poly (ADP)-ribose polymérase (PARP). La PARP est une des premières enzymes affectées à la réparation et activées lorsqu'il y a dommage à l'ADN cellulaire (Shall et de Murcia, 2000), spécialement lors d'un stress oxydatif (von Kobbe *et al.*, 2003).

Mécanisme médié par l'interaction ligand-récepteur

Le ligand Fas sur son récepteur Fas et TNF_α sur le récepteur TNFR_1 peuvent activer la caspase-8 et déclencher la cascade d'activation des caspases. Chaque récepteur contient un domaine de transduction du signal apoptotique appelé *death domain* (DD) qui une fois activé par la liaison du ligand au récepteur lie un domaine associé (*Fas Associated Death Domain* : FADD pour Fas et *TNFR₁ Associated Death Domain* : TRADD pour TNFR_1) et permet une configuration qui liera la procaspase-8 et l'activera. La cascade se poursuit ensuite avec l'activation de la procaspase-3 en caspase-3 (Van Cruchten et Van Den Broeck, 2002). Récemment, il a été démontré que la liaison de Fas à certains de ses récepteurs ne produit aucune transduction de signal et n'induit aucune apoptose. Ces leurres (*decoy receptors* : DcR) sont présents dans les tissus normaux et protégeraient de l'apoptose (Ashkenazi et Dixit, 1999).

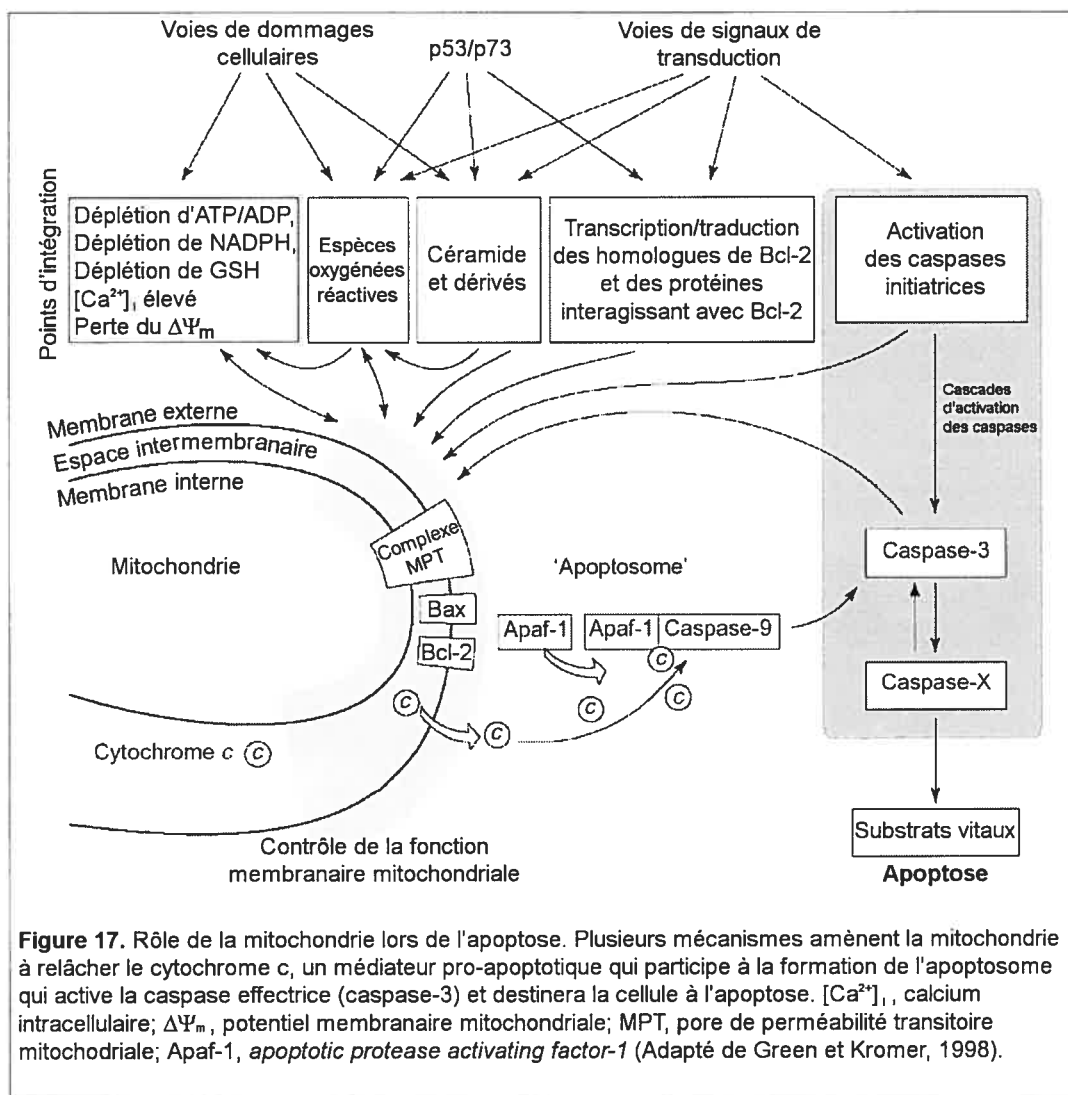
Mécanismes mitochondriaux

Dans certaines circonstances, une autre voie d'activation des caspases menant à l'apoptose implique une dysfonction mitochondriale qui se traduit par : une perte du potentiel transmembranaire interne ($\Delta\psi_m$), un découplage de la chaîne respiratoire et accompagné d'une baisse des niveaux d'ATP et d'une surproduction de $\text{O}_2^{\cdot-}$, une déplétion des stocks de GSH et NADPH et une sortie massive de Ca^{2+} (Kroemer *et al.*, 1998). Ceci entraîne la rupture de la membrane externe mitochondriale et la relâche dans le cytosol des facteurs proapoptotiques (Fig. 17, page 120). La relâche de la protéine cytochrome c est le point central de ce mécanisme mitochondrial (Bosca et Hortelano, 1999; Mathieu *et al.*, 1999). Elle est localisée sur la face interne mitochondriale, de même

que dans l'espace intermembranaire (Hirsch *et al.*, 1997). Le cytochrome c est un membre important de la chaîne de transport des e⁻ impliquée dans la production d'ATP. Durant l'apoptose, le cytochrome c est relâché dans le cytosol (Hirsch *et al.*, 1997) et se lie à l'*Apoptotic protease activating factor* (APAF)-1 et forment ensemble un complexe qui, avec dATP, active la procaspase-9 en caspase-9 (Li *et al.*, 1997c). Ce complexe apoptogénique appelé apoptosome active la procaspase-3 en caspase-3 (Green et Kroemer, 1998).

La relâche du cytochrome c est régulée par les gènes de la famille Bcl-2. Dans cette famille on retrouve bcl-2, bcl-x_L, bcl-x_s, bax, bid et bad. Bcl-2 et bcl-x_L qui inhibent l'apoptose, alors que bcl-x_s, bax, bid et bad la stimulent. Il semble que le ratio des produits de la transcription bax/bcl-2-bcl-x_L détermine si le cytochrome c est relâché ou non (Rosse *et al.*, 1998). Bcl-2-bcl-x_L et bax agiraient au niveau de la perméabilité mitochondriale sur un canal appelé *mitochondrial permeability transition pore* (MPT) (Green et Kroemer, 1998; Marzo *et al.*, 1998). Il s'agit d'un complexe protéique se formant au site de contact de la membrane mitochondriale externe et de la membrane mitochondriale interne. L'ouverture du pore cause une entrée massive d'ions dont le Ca²⁺ et un gonflement de la mitochondrie. Le gonflement brise la membrane externe, mais pas la membrane interne qui possède une surface plus grande. Plusieurs stimuli peuvent induire l'ouverture du MPT dans plusieurs modèles de mort cellulaire. Parmi ceux-ci on compte les ROS, le NO et des concentrations supraphysiologiques de Ca²⁺ (Zoratti et Szabo, 1995; Bernardi et Petronilli, 1996), ce qui a amené l'hypothèse selon laquelle le MPT serait un mécanisme de défense contre une surcharge cellulaire de Ca²⁺ (Crompton,

2000). L'influx d'ions est responsable de la perte du $\Delta\psi_m$ (Marzo *et al.*, 1998). La cyclosporine A bloque de façon spécifique l'ouverture du MPT en se liant à la



cyclophiline D se trouvant sur la face externe du pore stabilisant ainsi le $\Delta\psi_m$ (Kroemer *et al.*, 1998). Les antioxydants et les inhibiteurs de la formation de ROS se sont aussi montrés efficaces pour inhiber l'ouverture MPT et bloquer la mort cellulaire (Lemasters *et al.*, 1998).

Par contre, l'ouverture du MPT n'est pas unique à l'apoptose et peut aussi se produire lors du processus oncotique et même lors de l'autophagie (Kroemer *et al.*, 1995; Kroemer *et al.*, 1997; Lemasters *et al.*, 1998). De plus, le MPT pourrait aussi être indirectement activé par la caspase-8, habituellement typique d'une interaction ligand-récepteur de mort cellulaire. La caspase-8 est capable d'activer la protéine proapoptotique bid de la famille bcl-2 localisée sur la membrane externe de la mitochondrie et mener à la relâche du cytochrome c et l'activation de la caspase-9 (Li *et al.*, 1998a).

Mécanisme médié par le réticulum endoplasmique

Un troisième mécanisme a récemment été identifié à l'aide d'une souris knock-out pour le gène de la caspase-12 (Nakagawa *et al.*, 2000). La caspase-12 est localisée dans le RE et est activée par différents stress qui peuvent affecter le RE comme un débalancement dans l'homéostasie du Ca^{2+} et une accumulation de protéines dans le réticulum. Bien que d'autres caspases puissent être activées comme c'est le cas à la suite de l'activation initiale de la caspase-12, cette dernière se suffit à elle-même pour déclencher une mort ayant les caractéristiques de l'apoptose (Nakagawa *et al.*, 2000).

Autophagie

Un autre type de mort cellulaire qui peut présenter des caractéristiques de l'apoptose, est l'autophagie. L'autophagie est d'abord un phénomène physiologique par lequel les organelles sont recyclées ou par lequel une cellule privée de nutriments peut retarder l'apoptose ou l'oncose en s'alimentant de sa propre substance (Seglen et Bohley, 1992). Les organelles sont séquestrées dans un lysosome, un compartiment riche en hydrolases capables de cliver les protéines, lipides, acides nucléiques et les carbohydrates

(Klionsky et Emr, 2000). Habituellement, comme c'est le cas lors de l'autophagie des segments externes des photorécepteurs (Reme *et al.*, 1999), le phénomène n'est pas associé à la mort cellulaire. Par contre, il peut arriver qu'une cellule meurt par autolyse comme c'est le cas des cellules MCF-7 de carcinome du sein traitées avec le tamoxifen (Bursch *et al.*, 1996). Lors de cette autophagie globale, il y a formation d'un autophagosome, une vacuole à double membrane dérivée de zones du RE dépourvues de ribosomes (Dunn, 1990a). La vacuole s'acidifie et des lysosomes fusionnent avec l'autophagosome. La vacuole mature et devient un autolysosome à membrane simple (Dunn, 1990b). Durant cette mort, les mitochondries et le RE sont souvent dilatés, de même que l'appareil de Golgi. Il y a une condensation nucléaire, mais pas aussi remarquable que dans l'apoptose. La membrane plasmique perd sa fonction et des blebs apparaissent comme lors de l'oncose. Lors de l'autophagie, l'activation des caspases est possible et peut contribuer à la mort cellulaire (Camougrand *et al.*, 2003).

L'oncose

L'oncose est caractérisée par le gonflement de la cellule et des organelles, du *blebbing* et une augmentation de la perméabilité membranaire (Fig. 16, page 116) par des mécanismes basés sur la défection des pompes ioniques (Na^+/K^+ ATPase) de la membrane plasmique. L'oncose est causée par des agents toxiques, l'ischémie ou tout autre agent capable d'interférer avec la production d'ATP et la perméabilité membranaire menant à la fragmentation non spécifique de l'ADN, une disparition du noyau (caryolyse) et finalement à la lyse cellulaire habituellement suivie d'une réaction inflammatoire (Wyllie *et al.*, 1980). Le gonflement de la cellule et les mécanismes y menant ne sont pas bien connus et l'oncose pourrait avoir plusieurs points communs avec l'apoptose puisque

l'oncose est souvent accompagnée par la condensation de la chromatine et qu'une surexpression de bcl-2 peut protéger les cellules neurales d'une mort oncotique causée par une déplétion de GSH (Kane *et al.*, 1995). Dans une lignée de cellules Junkat (JB-6) déficientes en caspase-8, la multimérisation forcée de la protéine associée FADD à FAD induit une mort indépendante des caspases sans fragmentation de l'ADN, fragmentation ou condensation de la cellule et du noyau, mais avec un gonflement cellulaire typique de l'oncose (Kawahara *et al.*, 1998). Un autre phénotype similaire à l'apoptose, mais pas identique dans l'oncose est le *blebbing* par opposition au bourgeonnement (*budding*) observé dans l'apoptose. Les blebs sont typiques de la mort oncotique. Ils sont remplis de fluides et habituellement dénués d'organelles. Ils se forment à partir de la membrane plasmique déjà gonflée et prête à éclater; les blebs sont vraisemblablement dus à une dysfonction entre la membrane plasmique et le cytosquelette et peuvent être réversibles (Majno et Joris, 1995).

Alternatives à l'apoptose et à l'oncose

D'autres morts cellulaires s'apparentant à l'apoptose ont été mises en évidence, notamment celles impliquant le granzyme B, une sérine protéase et la calpaïne, une cystéine protéase dépendante du Ca^{2+} (Heusel *et al.*, 1994; Alimonti *et al.*, 2001; Gil-Parrado *et al.*, 2002). Ces voies sont moins classiques et peu connues.

Méthodes de détection de la mort cellulaire

L'oncose ou une cellule nécrotique peut facilement être identifiée par des colorants nucléaires imperméables à la membrane plasmique. C'est le cas avec l'iodure de propidium (PI) qui marque l'ADN des cellules perméabilisées par la perte d'intégrité

et peut être observé en microscopie à fluorescence. Les cellules marquées témoignent d'une membrane plasmique endommagée comme c'est le cas lors de la lyse de la membrane plasmique commune aux cellules oncotiques (Nieminen *et al.*, 1992). Un autre marqueur de l'ADN couramment utilisé est le Hoescht 33342 qui lui par contre est perméable aux membranes et se lie donc à l'ADN de toutes les cellules mortes et vivantes. Il permet de faire ressortir selon l'intensité du marquage, la condensation de l'ADN dans les cellules apoptotiques. Par contre, cette méthode ne doit pas être utilisée seule, car certaines cellules oncotiques peuvent aussi présenter une certaine forme de condensation (Columbano, 1995). En plus de permettre la liaison du PI, la lyse de la membrane cellulaire permet la mesure de l'activité d'une enzyme cytosolique, la déshydrogénase lactique (LDH). En fournissant au milieu extra cellulaire le substrat de l'enzyme, il est possible d'évaluer l'activité de la LDH qui est proportionnelle à l'importance de la lyse cellulaire (Allain *et al.*, 1973).

La viabilité cellulaire peut être facilement et rapidement évaluée par un essai MTT. Le *3-(4,5-dimethyl thiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) est un sel de tétrazolium que la mitochondrie transforme par des déshydrogénases succiniques dans les cellules viables laissant des cristaux de formazan de couleur pourpre insolubles dans l'eau (Mosmann, 1983; Hamid *et al.*, 2004). Une fois solubilisés dans une solution d'éthanol acidifiée, les cristaux peuvent être quantifiés au spectrophotomètre.

Par immunobuvardage de type Western, il est possible de mettre en évidence l'activité des caspases pour certains substrats, par exemple les autres caspases, la lamine et PARP. Malheureusement, cette technique n'a pas l'avantage d'être très spécifique, car elle englobe toute une population cellulaire et dilue donc considérablement le signal

(McCarthy et Evan, 1998). La formation d'échelle (*ladder formation*) présentée par les fragments d'ADN internucléosomal peut aussi être mise en évidence sur gel d'électrophorèse ou *in situ* par la méthode de *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling* (TUNEL). Des dUTP marqués sont enzymatiquement couplés aux extrémités 3'-OH des fragments d'ADN et peuvent ainsi être détectés immunohistochimiquement (Gavrieli *et al.*, 1992). Par contre, il faut utiliser ces méthodes avec une certaine réserve, car les phénomènes qui y sont mis en évidence ne sont pas toujours entièrement exclusifs à la mort apoptotique (Dong *et al.*, 1997; Saikumar *et al.*, 1999).

Finalement, la cytofluométrie en flux (FACS) permet de trier une population cellulaire sur les bases de leur liaison à une sonde fluorescente. Typiquement le FACS sert à détecter la phosphatidylsérine (PS) localisée sur le côté externe des membranes plasmiques des cellules apoptotiques. L'annexine V marquée d'une fluorochrome se lie à PS et en permet la détection (Vermees *et al.*, 1995). Par contre, l'annexine V peut aussi pénétrer la cellule perméabilisée et se lier à la PS localisée sur la face interne de la membrane plasmique (Saikumar *et al.*, 1999). C'est pour cette raison qu'un double marquage avec PI est souvent utilisé pour identifier les cellules ayant perdu l'intégrité de la membrane plasmique (Brush, 2000).

Mort cellulaire induite par le stress oxydatif

Les ROS comme le H_2O_2 , $\cdot OH$ et $O_2\cdot^-$ sont connus pour les dommages qu'ils peuvent causer à l'ADN chromosomal et aux autres composantes cellulaires résultant en dégradation de l'ADN, dénaturation protéique et peroxydation lipidique. Malheureusement, les mécanismes impliqués dans ces phénomènes ne sont pas

complètement compris. La plupart des agents produisant des ROS induisent une mort apoptotique en causant une peroxydation lipidique et des dommages à l'ADN (Higuchi et Matsukawa, 1997). Durant une hyperoxie, la dégénérescence de la vascularisation rétinienne a été associée à une apoptose qui peut être empêchée par le VEGF (Alon *et al.*, 1995) selon une voie de signalisation impliquant PI3-K/Akt activant dans la transduction de signaux de survie cellulaire (Karsan, 1998; Carmeliet *et al.*, 1999). Dans d'autres situations, les ROS, le NO et les hydroperoxydes se sont avérés d'importants médiateurs de la cytotoxicité dont l'apoptose de cellules neurales (Greenlund *et al.*, 1995; Slater *et al.*, 1995; Jacobson, 1996). Parmi les défenses antioxydantes de l'organisme, le GSH est le plus important. Une déplétion intracellulaire du GSH par le L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) ou le glutamate par exemple, cause l'apoptose (Pereira et Oliveira, 1997). La déplétion du GSH cause un dérangement dans la membrane plasmique qui relâche la PLA₂ et la PLC (Beetens et Herman, 1983). Dans ces conditions, l'ajout exogène d'AA occasionne une peroxydation lipidique qui transforme l'apoptose en cours en oncose (Higuchi et Yoshimoto, 2002). Le GSH et la glutathion peroxydase (GPx), chargés de transformer H₂O₂ en H₂O, jouent un rôle majeur en contrôlant l'état redox de la cellule et en étant le mécanisme de défense primé pour protéger la cellule des dommages causés par les ROS; aussi certains vont même jusqu'à suggérer que la formation d'hydroperoxydes dans les tissus endommagés est sous le contrôle presque exclusif des niveaux de GSH (Higuchi, 2003).

CHAPITRE 2

Hypothèse, modèle et études expérimentales

Formulation de l'hypothèse

La rétinopathie du prématuré (ROP) est une maladie multifactorielle dont la pathogenèse est majoritairement inconnue. La toxicité de l'oxygène à forte dose est un phénomène reconnu qui participe à la vaso-oblitération rétinienne caractérisant la première phase de la ROP. La rétine représente un tissu particulièrement sensible au stress oxydant. Elle a un taux de consommation d'oxygène très élevé et rapide, même en condition normoxique propice à la formation de ROS (Rodieck, 1973). La rétine a le plus haut taux d'acides gras polyinsaturés (PUFA) de tous les tissus (Daemen, 1973). Par les doubles liaisons qui les caractérisent, les PUFA sont les substrats de choix pour la peroxydation par les ROS et la lumière est un initiateur connu de la formation de radicaux oxygénés (Delmelle, 1979). La prématurité vient compliquer la situation, car la rétine immature n'est pas préparée à faire face à un stress oxydatif de grande importance. Plusieurs enzymes et antioxydants ne sont pas présents en quantité suffisante pour réduire le stress (Smith *et al.*, 1992; Behndig *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999) et les prématurés ne sont pas capables de réguler leur synthèse à la hausse comme c'est le cas normalement pour la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase chez le sujet mature (Frank et Sosenko, 1991).

Les mécanismes par lesquels un stress oxydatif induit une cytotoxicité au niveau de la cellule endothéliale sont inconnus, mais impliquent sûrement des ROS puisqu'elles sont produites et causent la peroxydation lipidique (Tripathi et Tripathi, 1984; Penn, 1990; Penn *et al.*, 1997) et puisqu'une supplémentation en vitamine E réduit la sévérité de la ROP (Phelps et Rosenbaum, 1977; Penn *et al.*, 1992). Il a été démontré que l'atténuation de la phase de vaso-oblitération entraîne moins d'ischémie et de

néovascularisation, cette dernière envahissant le corps vitré et cause les séquelles associées à la ROP (Penn *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 2001). Durant un stress oxydatif, le facteur d'agrégation plaquettaire (PAF) et le thromboxane A₂ (TXA₂) sont produits en quantité abondante, mais la vaso-oblitération s'effectue avant qu'il y ait agrégation plaquettaire ou début de réaction inflammatoire (Beauchamp *et al.*, 2001; Beauchamp *et al.*, 2002). Chez le nouveau-né et particulièrement chez le prématuré, le NO est produit de manière plus importante. La NO synthase (NOS) est surexprimée et son action relaxante est plus importante que chez l'adulte. Au niveau de la choroïde, ce phénomène participe à l'augmentation des débits sanguins et contribue à augmenter le stress oxydatif au niveau de la rétine (Hardy *et al.*, 1996b), alors que le NO produit dans la rétine peut interagir avec les ROS pour former un stress nitrosatif toxique.

L'hypothèse de travail est la suivante : **le thromboxane A₂, le facteur d'activation plaquettaire et le monoxyde d'azote, autrement que par leurs effets vasomoteurs, sont d'importants médiateurs de la vaso-oblitération rétinienne telle qu'observée lors de la rétinopathie induite par l'oxygène, et ce, par des mécanismes impliquant un stress oxydant et nitrosatif.**

Modèle expérimental

Les expériences effectuées pour les besoins de cette thèse ont été faites en utilisant le modèle de rats nouveau-nés exposés à 80 % d'oxygène durant une période continue pouvant aller de 2 à 9 jours. À la naissance, le rat nouveau-né présente une vascularisation rétinienne équivalente à celle d'un fœtus humain de 24 à 26 semaines (Ricci, 1990). Chez le rat comme chez l'humain, les vaisseaux rétiniens proviennent du

mésenchyme et forment deux couches de capillaires, une superficielle qui est complètement formée vers P11, alors qu'une couche plus profonde se développe jusqu'à P15 (Henkind et DeOliveira, 1967). Le rat a donc en commun avec l'humain et les primates, le développement du réseau sanguin rétinien, impliquant des types cellulaires semblables, à partir de l'artère rétinienne centrale qui émerge du nerf optique. L'hyperoxie chez le rongeur est un très bon modèle de rétinopathie ischémique, c'est le plus proche de la ROP humaine, et il mime aussi certains aspects cliniques de la rétinopathie diabétique (Campochiaro, 2000).

Toutes les expériences effectuées sur les animaux ont été préalablement approuvées par le comité d'éthique du Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine. Certaines drogues et techniques utilisées lors de ces expériences ont été décrites dans le chapitre 1. Celles qui ne l'auraient pas été, le sont dans les prochains chapitres qui décrivent en détails, les études expérimentales résumées ci-dessous.

Les études expérimentales

1) Beauchamp, M. H., Sennlaub, F., Speranza, G., Gobeil, F. Jr., Checchin, D., Kermorvant-Duchemin, E., Abran, D., Hardy, P., Lachapelle, P., Varma, D. R., and Chemtob, S., Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy, *Free Radic Biol Med* 37 : 1885-1894 (2004).

Les données expérimentales récoltées *in vivo* et *ex vivo* démontrent que, dans la rétine, pendant toute la période de l'hyperoxie, l'expression de NOS demeure augmentée, et ce, principalement au niveau de la vascularisation (eNOS). Durant une hyperoxie de courte durée, les systèmes enzymatiques antioxydants sont moins performants et sont responsables de l'augmentation des produits de peroxydation et des espèces nitrogénées

réactives. Dans une hyperoxie à long terme, on assiste à une normalisation des niveaux d'antioxydant et des indicateurs de stress oxydatif. Ainsi, dans le modèle animal de rétinopathie induite par l'oxygène, l'inhibition à court terme de NOS est bénéfique alors qu'elle empire la vaso-oblitération à plus long terme. Ce phénomène est corrélé par une expression de VEGFR-2 augmentée durant l'hyperoxie à court terme en présence de l'inhibiteur de NOS et une expression déficiente à long terme dans les mêmes conditions. Le NO semble donc être cytotoxique lors de l'hyperoxie à court terme alors qu'à long terme il semble être cytoprotecteur. Dans les deux cas, des désactiveurs de radicaux libres ou d'espèces nitrogénées réactives ont un effet bénéfique.

2) Beauchamp, M. H., Martinez-Bermudez, A. K., Gobeil, F., Jr., Marrache, A. M., Hou, X., Speranza, G., Abran, D., Quiniou, C., Lachapelle, P., Roberts, J., 2nd, Almazan, G., Varma, D. R., and Chemtob, S. Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy, *J Appl Physiol* 90 : 2279-2288 (2001).

Les données expérimentales démontrent que le thromboxane A₂ est produit en quantité abondante dans la rétine lors d'un stress oxydatif. Les études *in vivo* par l'utilisation du modèle animal de rétinopathie induite par l'oxygène chez le rat nouveau-né démontrent que le thromboxane participe à la vaso-oblitération rétinienne puisqu'un antagoniste du récepteur TP de même qu'un inhibiteur de la synthèse de thromboxane préviennent une partie de la destruction microvasculaire. Les études *ex vivo* et *in vitro* ont aidé à caractériser cette cytotoxicité du thromboxane qui est fonction du dosage et de la durée d'exposition. Les autres prostaglandines vasoconstrictrices ne causent pas de toxicité et la mort cellulaire présente une double spécificité : elle est spécifique aux cellules endothéliales de type neuronal. L'isoprostane 8-iso-PGF_{2α}, un marqueur de peroxydation augmente en fonction de la concentration de TXA₂. Dans ce qui semble être

une boucle de rétroaction positive, le 8-iso-PGF_{2α} a un effet cytoxique sur les cellules endothéliales médié par une synthèse de TXA₂. Le processus de mort cellulaire endothéliale s'enclenche dans les quatre heures suivant la mise en contact des cellules avec le thromboxane et est à son maximum entre 24 et 48 heures. La mort cellulaire ne présente pas les caractéristiques de l'apoptose autre que sa durée, alors que l'intégrité de la membrane plasmique semble être atteinte.

3) Beauchamp, M. H., Marrache, A. M., Hou, X., Gobeil, F., Jr., Bernier, S. G., Lachapelle, P., Abran, D., Quiniou, C., Brault, S., Peri, K. G., Roberts, J., 2nd, Almazan, G., Varma, D. R., and Chemtob, S. Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 3327-3337 (2002).

Tout comme le TXA₂, le PAF est abondamment produit durant un stress oxydatif. Dans le modèle *in vivo* de vaso-oblitération, un bloqueur du PAFR prévient une partie de la dégénérescence microvasculaire. Les études *ex vivo* et *in vitro* sur des microvaisseaux et les cultures cellulaires nous permettent de conclure que la cytotoxicité du PAF présente les mêmes caractéristiques que celles imputées au TXA₂. Cette similitude vient du fait que la mort cellulaire endothéliale causée par le PAF est dépendante d'une synthèse de TXA₂ proportionnelle à celle du PAF. La mort induite par le PAF-TXA₂ montre une indépendance vis-à-vis les caspases malgré des indicateurs propres habituellement à l'apoptose.

Trois articles forment les trois prochains chapitres. Les trois articles sont publiés. Ci-dessous, se trouve la référence complète de ces articles.

Chapitre 3 **Beauchamp, M. H.**, Sennlaub, F., Speranza, G., Gobeil, F. j., Checchin, D., Kermorvant-Duchemin, E., Abran, D., Hardy, P., Lachapelle, P., Varma, D. R., and Chemtob, S., Redox-dependent effects of nitric oxide

on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy, *Free Radic Biol Med*, 37:1885-1894 (2004).

- Chapitre 4 **Beauchamp, M. H.**, Martinez-Bermudez, A. K., Gobeil, F., Jr., Marrache, A. M., Hou, X., Speranza, G., Abran, D., Quiniou, C., Lachapelle, P., Roberts, J., 2nd, Almazan, G., Varma, D. R., and Chemtob, S. Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy, *J Appl Physiol*, 90, 2279-2288 (2001).
- Chapitre 5 **Beauchamp, M. H.**, Marrache, A. M., Hou, X., Gobeil, F., Jr., Bernier, S. G., Lachapelle, P., Abran, D., Quiniou, C., Brault, S., Peri, K. G., Roberts, J., 2nd, Almazan, G., Varma, D. R., and Chemtob, S. Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 3327-3337 (2002).

CHAPITRE 3

Les effets du monoxyde d'azote sur l'intégrité microvasculaire sont redox-dépendants lors de la rétinopathie induite par l'oxygène

Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy

Martin H. Beauchamp,¹ Florian Sennlaub,¹ Giovanna Speranza,^{1,2} Fernand Gobeil jr,³ Daniella Checchin,^{1,2} Elsa Kermorvant-Duchemin,¹ Daniel Abran,⁴ Pierre Hardy,¹ Pierre Lachapelle,⁵ Daya R. Varma,² and Sylvain Chemtob^{1,2}

¹Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, Research Center of Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5; ²Departments of Pharmacology and Therapeutics and of ⁵Ophthalmology, McGill University, Montréal, Québec, H3G 1Y6, ³Institut de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Fleurimont, Québec, Canada, J1H 5N4; ⁴Theratechnologies Inc, Ville St-Laurent, Québec, H4S 2A4.

Corresponding author:

Sylvain Chemtob, M.D., Ph.D., FRCPC.

Department of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology

Hôpital Ste-Justine, Research Center

3175 Ch. Côte-Ste-Catherine

Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Tel: (514) 345-4729; Fax: (514) 345-4801

Running title: NO and endothelial cell survival

Keywords: nitric oxide synthase, vasoobliteration, retina, CuDIPS, VEGF.

Abrégé

Opposing effects have been ascribed to NO on retinal microvascular survival. We investigated if changes in the redox state may contribute to explain apparent conflicting actions of NO in a model of oxygen-induced retinal vasoobliteration. Retinal microvascular obliteration was induced by exposing 7 day old rat pups (P7) for 2 or 5 days to 80% O₂. The redox state of the retina was assessed by measuring reduced glutathione, and oxidative and nitrosative products malondialdehyde and nitrotyrosine. The role of NO on vasoobliteration was evaluated by treating animals with NOS inhibitors (L-NA) and by determining NOS isoform expression and activity; the contribution of nitrosative stress was also determined in animals treated with the degradation catalyst of peroxynitrite FeTPPS or with the superoxide dismutase mimetic CuDIPS. eNOS, but not nNOS or iNOS, expression and activity were increased throughout the exposure to hyperoxia. These changes were associated with an early (2 days hyperoxia) decrease in reduced glutathione, and an increase in malondialdehyde and nitrotyrosine. CuDIPS, FeTPPS and L-NA treatments for these 2 days of hyperoxia nearly abolished the vasoobliteration. In contrast, during 5 days exposure to hyperoxia when the redox state rebalanced, L-NA treatment aggravated the vasoobliteration. Interestingly, VEGFR-2 expression was respectively increased by NOS inhibition after short-term (2 days) exposure to hyperoxia and decreased during the longer hyperoxia exposure. Data disclose that the dual effects of NO on newborn retinal microvascular integrity in response to hyperoxia *in vivo* depend on the redox state and seem mediated at least in part by VEGFR-2.

Introduction

Ischemic proliferative retinopathies such as retinopathy of prematurity (ROP) and of diabetes are characterized by a vasoobliterative phase leading to vascular rarefaction, which as a result of inner retinal hypoxia predisposes in turn to a vasoproliferative phase. The sensitivity of retinal microvascular endothelium to relatively high oxygen tension is particularly pronounced in the developing subject [1-4]. A notable mechanism implicated in oxygen-induced cytotoxicity relates to oxidative stress. Several lines of evidence point to a role for oxidant stress in the genesis of vasoobliteration in ROP. 1) Impaired antioxidant defenses represented by a decreased ratio of reduced to oxidized glutathione is observed in subjects who develop ROP [3] ; 2) exposure to oxygen significantly reduces levels of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD) activity in the retina [4] , and more importantly triggers peroxidation [5]; and 3) antioxidant supplementation attenuates the retinopathy in animal models [4,6,7] as well as in humans [8].

Interestingly, the free radical nitric oxide (NO) can exert either cytoprotective or cytotoxic effects on endothelium [9-17]. Accordingly, consistent with reports in other tissues [18-20] a role for NO generated from endothelial (eNOS) as well as inducible (iNOS) isoforms of NO synthase (NOS) has been invoked in retinal vasoobliteration [21] as well as neovascularization [22,23]. Although, it is generally assumed that higher concentrations of NO are associated with cytotoxicity [9,17,24] expression of the high NO-generating iNOS has been found to correlate positively with vascular density in colorectal and breast carcinomas [16,25].

However, there is increasing evidence that the reaction product of superoxide ($O_2^{\cdot -}$) with NO notably peroxynitrite, partakes in endothelial toxicity [9,17,24,26]. Upon

hyperoxia exposure of newborn mice either eNOS-deficient or treated with the NOS inhibitor L-NA from postnatal day (P) 7 to P9 one observes diminished nitration products of peroxynitrite and retinal vasoobliteration [21]; of note, such short-term exposure to hyperoxia reduces SOD activity [4]. On the other hand, more prolonged exposure to hyperoxia surprisingly reverses the vasoobliteration leading to accelerated revascularization [27], possibly due to a waning of the oxidative stress as glutathione generation augments [28]. Thus the deleterious or beneficial actions of NO on retinal microvasculature in response to hyperoxia might depend on the respective levels of other free radicals such as $O_2^{\cdot-}$ and the redox balance. We therefore hypothesized that NO in the presence of a redox potential shifted towards an oxidative environment, such as when $O_2^{\cdot-}$ concentrations are relatively high, elicits detrimental nitrosative stress to the retinal microvasculature *in vivo*; while comparable concentrations of NO when the redox balance is shifted towards a reduced environment favors endothelial cell survival.

Hence, we investigated the time-dependent changes and role of NO and redox state in relation to retinal vasoobliteration in a rat pup model of oxygen-induced retinopathy. Our results indicate that upon exposure to hyperoxia an increase in NO along with a short-term oxidative shift in redox state is observed in the retina relatively depleted of microvasculature. Normalization of the redox potential by SOD mimetics, by enhancers of peroxynitrite degradation, or by NOS inhibition prevented the retinal vasoobliteration. However, upon longer duration of exposure to hyperoxia the redox state rebalanced and NOS inhibition aggravated the vasoobliteration. Respective sequential increases and decreases in the expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 were observed following NOS inhibition. Our findings reveal that the redox

potential is an essential determinant of the effects of NO on retinal microvasculature *in vivo*, which seem mediated at least in part by VEGFR-2; observations highlight that the use of NOS inhibitors in this condition must take into account the delicate balance between the dual actions of NO on retinal microvascular integrity.

Matériels et méthodes

Animal preparation

Newborn Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, Québec) were used according to a protocol of Ste-Justine Hospital Research Center Animal Care Committee. Oxygen-induced retinopathy was induced in newborn rats according to an established protocol [7,29-32]. Rats were maintained along with their dams from postnatal (P) day 7 to P12 in custom-built chambers at $80 \pm 0.1\%$ oxygen, controlled by a computer assisted Oxycycler (BioSpherix Ltd, Redfield, NY). Control rats were kept in room air (21% O₂). We opted to expose rats to oxygen at this stage of development in order to elicit vasoobliteration unconfounded by arrest in normal neovascularization of the nerve fiber layer which occurs from P1-P7. The continuous exposure to hyperoxia favors vasoobliteration [29,30,33], while alternate exposure to high and low concentrations of oxygen associated with a recovery period in normoxia following the period of hyperoxia facilitate development of neovascularization [1,34].

Pups were randomly selected to receive immediately before and during 80% O₂ exposure daily 50 μ L intraperitoneal injection of the following treatments (n= 4 per group): vehicle (50% DMSO), non-selective NOS inhibitors N-nitro-L-arginine (L-NA, Sigma Chemicals, St.Louis, MO) (10 mg•kg⁻¹ twice), 7-nitroindazole Na (7-NINa,

Tocris, Ellisville, MO) ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ thrice), nNOS and iNOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)imidazole (TRIM, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), iNOS inhibitor N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamide dihydrochloride (1400W, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ twice), SOD mimetic copper [II] [3,5-diisopropylsalicylate acid]₂ (CuDIPS, Calbiochem, Mississauga, ON) ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), or degradation catalyst of peroxynitrite iron III porphyrin 5,10,15,20-tetrakis[4-sulfonatophenyl]prophyrinato iron chloride (FeTPPS, Calbiochem) (10 mg/kg , Calbiochem, Mississauga, ON) [35]. Control rats maintained at 21% O₂ received the same treatments. Rats were sacrificed by decapitation at P7, P8, P9 or P12 and retinas flat mounted and stained for endothelial cells as described below.

Vascular staining

Eyes were removed and fixed overnight at 4°C in 4% v/v formaline. The retinas were isolated and flat mounts were prepared for adenosine diphosphatase (ADPase) staining as described [29-31,36]. Briefly, retinas were washed in 50 mM Trizma-maleate buffer at 4°C and incubated at 37°C in ADPase incubation medium (0.2 M Tris maleate, 3 mM lead nitrate, 6 mM MgCl₂, and 1 mg/ml ADP); retinas were washed at room temperature with buffer and placed in a 1:10 dilution of ammonium sulfide for 1 min to allow reaction with ADPase. Retinas were mounted, photographed (MTI CCD-72, Dage, Michigan City, MI) and vascular density was calculated for the full retinal surfaces, using the imaging software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), and normalized relative to 21% O₂-exposed animals.

NADPH-diaphorase histochemistry

NADPH-diaphorase (NADPH-d), which reflects the activity of NOS isoforms, was performed on the retinal flat mounts of rat pups according to a previously described method [37-39]. Briefly, the eyes were fixed overnight in 4% v/v formaline. Retinas were isolated and incubated for 2 h at 37°C in water bath in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.3% Triton X-100, 0.5 mM MgCl₂, 0.01 M sodium azide, 0.1% nitroblue tetrazolium, and 0.1% NADPH. Digital pictures of the flatmounts were taken with a Nikon DMX 1200 mounted on a Nikon SMZ800 stereomicroscope (Nikon, Japan) and analyzed with Image Pro Plus 4.5 software to localize NOS isoforms and evaluate relative activity according to staining intensity which was corrected for the background intensity.

Western blots

Expression of different NOS isoforms, VEGFR-1 and -2, and VEGF was evaluated by western blot. Briefly, the retinas were isolated and snap frozen immediately after sacrifice. Each retina was re-suspended in 75 µl of lysis buffer in H₂O (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Laval, Québec)). Tissues were snap frozen in liquid N₂ and thawed repeatedly (4 times) to enhance tissue lysis. Tubes were kept on ice and vortexed every 10 min for 1 h followed by centrifugation at 21,000 x g for 10 min at 4°C. SDS-sample buffer (Tris-HCl 250 mM, pH 6.8; SDS 8%, glycerol 40%, β-mercaptoethanol 8%, bromophenol blue 0.04%, Boston BioProducts Inc., Ashland, MA) was added and samples boiled for 5 min then frozen at -20°C until used.

Aliquots (50 μg of protein) were run on 7.5% SDS-PAGE. Proteins were transferred on polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, blocked for 4 h in TTBS 5% milk at room temperature, and probed with either nNOS (1:1000 dilution), iNOS (1:500 dilution), eNOS (1:1000 dilution) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), or VEGFR-2 (Flk-1/KDR) (1:250' dilution) or VEGFR-1 (flt-1) (1:1000 dilution) (Chemicon, Temecula, CA) overnight at 4°C. After washing with TTBS (3 x 10 min) and incubation with a corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at room temperature for 90 min, membranes were washed (4 x 10 min) and incubated at room temperature in Western Blot Chemiluminescence Plus Reagent (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) for 3 min and then visualized with PhosphoImager (Fuji, Japan). Densitometry analyses were performed using Image Pro Plus 4.5 software.

Nitrite measurement

NO concentrations were assessed by measuring its major stable metabolite nitrite [39]. Retinas were immediately isolated and placed in a mixture of 500 μL Krebs buffer (mM: NaCl 120, KCl 4.5, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.0, NaHCO_3 27, KH_2PO_4 1.0, glucose 10) and 100 μL of L-arginine (200 μM , Sigma Chemicals, St.Louis, MO). Two retinas were pooled and placed in 37°C bath for 1 h. Preparation time prior to incubation was less than 1 min per eye. After the incubation, 100 μL of buffer was passed through a rubber membrane with a 250 μL Hamilton micro-syringe to avoid contact with surrounding air and injected into a chemiluminescence analyzer Sievers 280i Nitric Oxide Analyzer (Sievers, Boulder, CO) to directly measure nitrite (NO_2^-); KNO_2 was used as standard.

Reduced glutathione measurement

Pups prepared as described above were sacrificed at P7, P8, P9 or P12 to measure reduced glutathione (GSH) concentrations, a general marker of the redox state. Retinas were extracted and placed in 5% metaphosphoric acid (HPLC grade) in a volume (μ l) 5 times the weight (mg). The samples were homogenized on ice with Omni 2000 (12 000 rpm, 2X10 seconds) and centrifuged for 1 min at 10,000 x g. The supernatant was frozen in liquid N₂ and stored at -80°C for GSH measurement; this whole procedure starting from tissue extraction lasted <4 min. On the day of the experiment, the supernatant was diluted 1:5 in HPLC grade water and standard curve for GSH (0.5 μ M to 50 μ M) was constructed in 1% metaphosphoric in HPLC grade water. GSH was measured by capillary electrophoresis with the P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA) using eCAP capillaries (75 μ m i.d. x 50 cm) [40]. Peaks were analyzed with computer software 32 Karat 5.0 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Some samples were spiked with the standard to clearly identify GSH peaks.

Malondialdehyde and protein nitration assay

The product of peroxidation, malondialdehyde, was determined as previously described [41]. Briefly, less than 1 min after the animals were killed, each retina was isolated and grinded 2 x 30 sec with Omni homogenizer in a buffer containing butylhydroxytoluene (BHT: 5 mM Tris, 0.02% ASA, 0.5 mM EGTA) and centrifuged at 1,000 x g for 10 min. To each sample was added 0.33% 2-thiobarbituric acid (TBA) in water mixed with glacial acetic acid and then heated at 95°C for 60 min. HPLC grade n-butanol

was added, samples were vortexed and spin down at 1000 x g for 10 min. The upper phase was read with spectrophotometer at 532 nm.

Tyrosine nitration was determined by slot-blot as described [42], as a marker of nitrosative stress. Briefly, retina was put in the buffer (~75 μ l) and sonicated 3 x 10 sec on ice. Lysate was centrifuged at 12,000 x g at 4°C for 30 min. Tris-buffered saline (TBS: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) was added to final volume of 100 μ l. PVDF membrane was placed in Hybri-slot Manifold apparatus (BRL, MD), and 200 μ l of TBS was added to each well; 100 μ l of TBS-diluted protein solution was allowed to passively diffuse for 3 h. The wells were then washed 3 times with 100 μ l TBS. Membrane was removed from apparatus and washed briefly with TTBS and put in a blocking buffer for 2 h at room temperature. Membrane was incubated overnight at 4°C with anti-nitrotyrosine polyclonal antibodies (10 μ g/well, Upstate, Lake Placid, NY). Washes, secondary incubation, revelation and densitometry techniques and analyses were the same as previously described above for western blots. Membranes were stripped in buffer (100 μ M β -mercaptoethanol, 2% w/v SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) at 60°C for 30 min with agitation, rinsed with TTBS for 30 min, and reprobbed with β -actin 1:40,000 (Novus Biologicals, Littleton, CO) monoclonal antibody to normalize for loading.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey or Dunnetts tests for comparison among means. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Values are presented as means \pm SEM.

Résultats

Expression of NOS isoforms, localization of NOS activity and nitrite generation.

Exposure to 80% O₂ from P7 to P9 or P7 to P12 caused a significant vasoobliteration of the retinal vasculature compared to 21% O₂ controls, as expected; the vasoobliteration was slightly attenuated after the longer exposure to hyperoxia (Fig. 1b, 1f, and 1i). Expression of eNOS was augmented during exposure to hyperoxia relative to normoxia (Fig. 2a); nNOS was not augmented and iNOS was not detected under both conditions (data not shown). Similarly, intensity of NADPH-d staining on the vasculature (but not the parenchyma) increased comparably upon short- and longer-term exposure to hyperoxia (Fig. 2b), and there was a corresponding increase in retinal NO₂⁻ concentrations which was inhibited by L-NA but not by the nNOS / iNOS specific inhibitor TRIM (Fig. 2c) pointing to major role for eNOS as reported [21].

Glutathione, malondialdehyde and nitrotyrosine concentrations

Because the redox state is largely dependent upon glutathione levels, which in turn influence nitration and peroxidation [43,44], we measured reduced glutathione (GSH) concentrations, protein tyrosine nitration, and the advanced product of peroxidation malondialdehyde. Two days after exposure to hyperoxia (P7-P9) GSH concentrations were markedly decreased (by ~30%; Fig. 3a), and correspondingly malondialdehyde and nitrotyrosine levels increased (Fig. 3b). These changes (relative to normoxia) subsided as the hyperoxic period was extended for 5 days (Fig. 3).

Contribution of NO, peroxynitrite and SOD on O₂-induced retinal microvascular degeneration

Microvascular degeneration occurs mostly within a couple of days of exposure to hyperoxia [45], and is mediated by NO [21] as well as by O₂^{•-} [4]. To decipher the interplay of NO and O₂^{•-} we exposed rat pups to short-term hyperoxia (P7-P9, when SOD is transiently down regulated [4]) and to longer-term hyperoxia (P7-P12, when SOD levels renormalize around P8-P10 [4]), following treatments with NOS inhibitors L-NA or 7-NINA, SOD mimetic CuDIPS and peroxynitrite degradation catalyst FeTPPS. The oxygen-induced retinal vasoobliteration at P9 was markedly and comparably diminished by L-NA, 7-NINA (data not shown), CuDIPS and FeTPPS (Fig. 1); these treatments in normoxia-raised animals did not affect vascular density. In contrast, by P12 when the redox state had renormalized in hyperoxia-exposed rats (Fig. 3) L-NA treatment (P7-P12) resulted in augmented microvascular degeneration, while the earlier benefit of CuDIPS (and FeTPPS [not shown]) was sustained (Fig. 1); the selective n/iNOS inhibitor TRIM and the iNOS specific inhibitor 1400W, did not affect retinal vascular density (data not shown) consistent with lack of expression (iNOS) or its increase (nNOS) during hyperoxia.

VEGFR-1 and -2 expression and regulation by hyperoxia and NO

Because the growth and survival of the retinal microvasculature [45] is greatly affected by VEGFR-1 and -2 [46], we examined if the effects of NOS inhibition on retinal vascular density in oxygen-exposed rat pups are associated with corresponding changes in these important receptors. The expression of VEGFR-1 and -2 was not

affected by exposure to hyperoxia. However, after 2 days of NOS inhibition in oxygen-exposed animals VEGFR-2 expression was significantly increased, and by 5 days of NOS inhibition the reverse was observed as VEGFR-2 expression decreased (Fig. 4); VEGFR-1 expression was unaffected. Noticeably, the changes in VEGFR-2 following NOS inhibition corresponded to those of vascular density (Fig. 1).

Discussion

Exposure of immature retinal vasculature to high oxygen levels leads to microvascular degeneration in various species, including human [2,47]. This degeneration is mediated by NO [21] and occurs in the early phase of oxygen exposure [2,21]. During sustained oxygen exposure the microvasculature regenerates [27]. Assuming eNOS activity is increased during more prolonged hyperoxia as suggested in some other tissues [48,49], one could presume an abated oxidative stress under this latter condition, since cytoprotective properties of NO [50] seem mostly observed when the redox balance is shifted towards a reduced environment, while the reverse is true for its cytotoxic properties [9,17,24, 26]. We proceeded to investigate this inference on retinal microvasculature of the developing subject. Our findings reveal comparable increases in retinal NO levels in the early and later response to hyperoxia largely contributed by eNOS, which in turn exert opposing effects on retinal microvascular integrity depending upon the redox state of the tissue and seem partly mediated by VEGFR-2. These observations highlight the complex dual role of NO during the progressive genesis of retinovascular pathology, and the delicate balance disrupted by interfering simply with actions of this major mediator.

Nitrosative stress has been shown to be important in NO-mediated endothelial cell injury [21,26]. NO provides the biological precursor for these nitrating agents. NO can form nitrating agents in a number of ways, including reaction with superoxide to form peroxynitrite and through enzymatic oxidation of nitrite to form NO_2^+ [17,26]. The redox state of the tissue is crucial in the generation of nitrating agents [51]. In the retina, oxygen-induced microvascular degeneration is not only dependent of NO [21] but also by

$O_2^{\cdot-}$ [4]. The endogenous Cu,Zn SOD is transiently down regulated in oxygen exposed animals [4] and normalizes during longer term exposure of rat pups (P8 to 10) [4]. This decrease activity of an important free radical scavenger could lead to high $O_2^{\cdot-}$ levels and a high redox state in the retina during short-term oxygen exposure to oxygen, favoring the generation of toxic nitrating agents and the consumption of reduced glutathione [52]. Thus, to detect changes in the redox state we measured GSH levels [44]. One notes an early drop in GSH with a rise in peroxidation and nitration products (Fig. 3), which is associated with a marked retinal vasoobliteration prevented by the SOD mimetic CuDIPS, the peroxynitrite degradation catalyst FeTPPS as well as by the NOS inhibitor L-NA (Fig. 1). However, in an apparent paradox as exposure to hyperoxia is prolonged (for 5 days) microvascular degeneration was not exacerbated (Fig. 1) in spite of sustained increased concentrations of NO (Fig. 2c); in fact, by further prolonging exposure to hyperoxia normal revascularization enhanced [27]. Interestingly, as the period of exposure to hyperoxia is extended the redox state rebalanced (Fig. 3) as reported in other tissues [28]; consequently, as would be expected CuDIPS and FeTPPS did not exert additional effects on retinal microvascular integrity by extending the treatment to P12 (Fig. 1). Correspondingly, protein tyrosine nitration increased in short- but not in longer-term O_2 -exposed animals (Fig. 3), predictably due to diminished generation and rapid ongoing disposal [53] of these nitrated products. Along with these redox-dependent changes NO is likely to exert prosurvival/proliferative effects [50]. Of relevance, the cytoprotective effects of NO may on one hand signal activation of the prosurvival/proliferative receptor VEGFR-2 [11-14,18,19,54,55] but also modulate its expression [14,56,57; see below]. Furthermore, we observed a significant increase of protein tyrosine

nitration in short but not in long term exposed animals, suggesting that nitrating agents are only generated in short term hyperoxia (fig 2). Accordingly, (partial) removal of NO during longer-term exposure to hyperoxia may curtail microvascular survival and ensuing density as observed in the present study with L-NA (Fig. 1), especially since expression of VEGF *per se* also decreases; while this is not the case in normoxia-raised animals. Altogether, our findings underline the importance of the redox state, rather than simply the NO concentration as proposed [15,24], in governing opposing actions of NO on retinal vasculature *in vivo*; in this process observations also highlight the differences in NO actions during short- and longer-term exposure to hyperoxia in the developing retina.

Using a similar model exposed to hyperoxia at the same time of retinovascular development our findings on short-term effects of L-NA on vascular density are consistent with those reported [21]. However, a preretinal neovascular role for NO arising largely from eNOS based on mice with disrupted eNOS genes, has been documented in oxygen-induced retinopathy by the same authors and others [21,22]. Preretinal neovascularization occurs during the post-hyperoxic ischemic phase. These latter observations may at first seem incongruent with the present ones based on the redox-dependent effects of NO, since oxidant stress is also detected during ischemia [58] and microvascular cytotoxicity would be predicted rather than survival/proliferation. However, exposure to the diminished eNOS activity in animals with disrupted eNOS gene took place throughout the hyperoxic as well as the post-hyperoxic ischemic phase [21,22]; thus, one cannot distinguish the specific time of action of NO which is further complicated by compensatory increases in the activities especially of nNOS [59].

In order to further decipher mechanisms by which NO exerts its divergent effects during short- and longer-term hyperoxia we studied the expression of VEGFR-1 (flt1) and VEGFR-2 (flk1/KDR), which are major receptors that are modulated by oxidant stress [60] and in models of ROP [61]. Inhibition of NOS during the early period of exposure to hyperoxia associated with a nitrosative stress resulted in increased VEGFR-2 expression and preservation of retinal microvascular density (Figs. 1,4). Whereas NOS inhibition during the longer duration of exposure to hyperoxia when the redox state was rebalanced led to decreased VEGFR-2 expression and aggravated vasoobliteration.

The absence of effects of hyperoxia or NOS inhibition on VEGFR-1 receptor may result from differential regulation of VEGFR-1 and -2. The expression of VEGFR-2 is regulated by NF- κ B, [56] unlike that of VEGF and VEGFR-1 which is mainly regulated by the hypoxia inducible factor [62]. Accordingly, the most marked changes in expression of these receptors in oxygen-induced retinopathy are observed during the post-hyperoxic ischemic period when immunoreactivity is found to increase albeit mainly confined to preretinal neovascular buds [61,63]. But during hyperoxia coincidental increases in NO and reactive oxygen species may interfere with NF- κ B activation [57], and in turn in VEGFR-2 expression [56]. Of interest, VEGFR-2 expression was slightly reduced by short-term hyperoxia; although VEGFR-2 expression appeared unchanged during longer exposure to hyperoxia (Fig. 4), by correcting for an approximate 30% loss of microvasculature (Fig. 1), expression of this receptor would be increased correspondingly. Accordingly, NOS inhibition in the presence of a nitrosative stress would be expected to secure NF- κ B activation but in its absence would activate it [64], and result in corresponding changes in VEGFR-2 expression [56] as we have observed

(Fig. 4), consistent with reports in other tissues on redox-dependent effects of NOS inhibition on VEGFR-2 expression [14,65,66]. Finally, although some have attributed a cytoprotective role mostly for VEGFR-1 [46] which is not modulated by NOS inhibition in the present study, one cannot exclude a cell survival role for VEGFR-2 [67].

Taken together, our studies highlight that the redox state is a very important modulator of the complex opposing actions of NO on microvascular endothelium integrity in particular in oxygen-induced retinopathy, and that these effects seem likely in part dependent upon expression of VEGFR-2; a diagram depicting the sequential contribution of NO, its synthases, antioxidants and oxidants, and VEGFR-2 during short- and longer-term hyperoxic stress is presented in Fig. 5. To our knowledge this is the first time that such a mechanism is uncovered in the same tissue *in vivo*, which provides an explanation for the apparent contradictions regarding the role of NO on retinal (and possibly other tissue) endothelial cell survival. In addition, the present findings may also apply to ischemia during which an oxidative stress is observed [58]; in this case NOS activity resulting in a nitrosative stress [68] inhibited revascularization of the ischemic retina [23]. In sum the use of NOS inhibition in conditions such as oxygen-induced retinopathy model of ROP must be weighed against the delicate balance between the dual actions of NO on retinal microvascular integrity; we propose that antioxidants might be a safer alternative.

Figures

Figure 1.

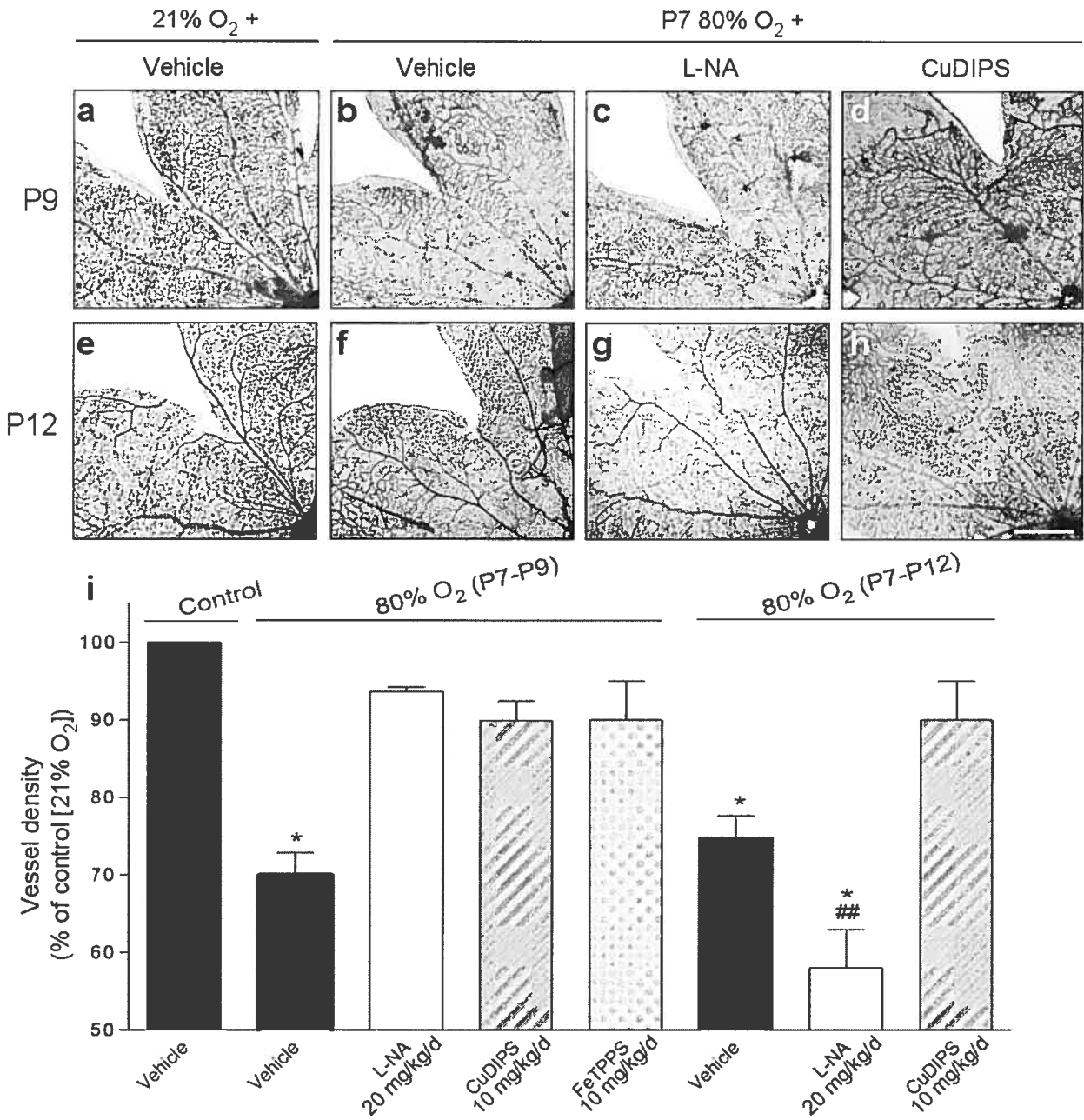


Figure 1. Effects of NOS inhibition and antioxidants on oxygen-induced vasoobliteration. Rat pups exposed to oxygen (80 % O₂) or room from P7 to P12 were treated daily (ip) with L-NA (20 mg•kg⁻¹), CuDIPS (10 mg•kg⁻¹), FeTPPS (10 mg•kg⁻¹) or vehicle (DMSO). Rats were killed either on P9 or P12 to extract retinas for determination of vascular density (by ADPase staining). Rats exposed to 21% O₂ and treated with the same drugs did not exhibit changes in vascular density (not shown). Scale bar = 250 μm. Values are mean±SEM of vessel density relative to that in vehicle-treated 21% O₂-exposed rats (controls); n=3-5 retinas from different pups. * p<0.01 compared to all other values without asterisks; ## p<0.05 compared to corresponding value of 80% O₂-exposed vehicle-treated rats P7-P12.

Figure 2.

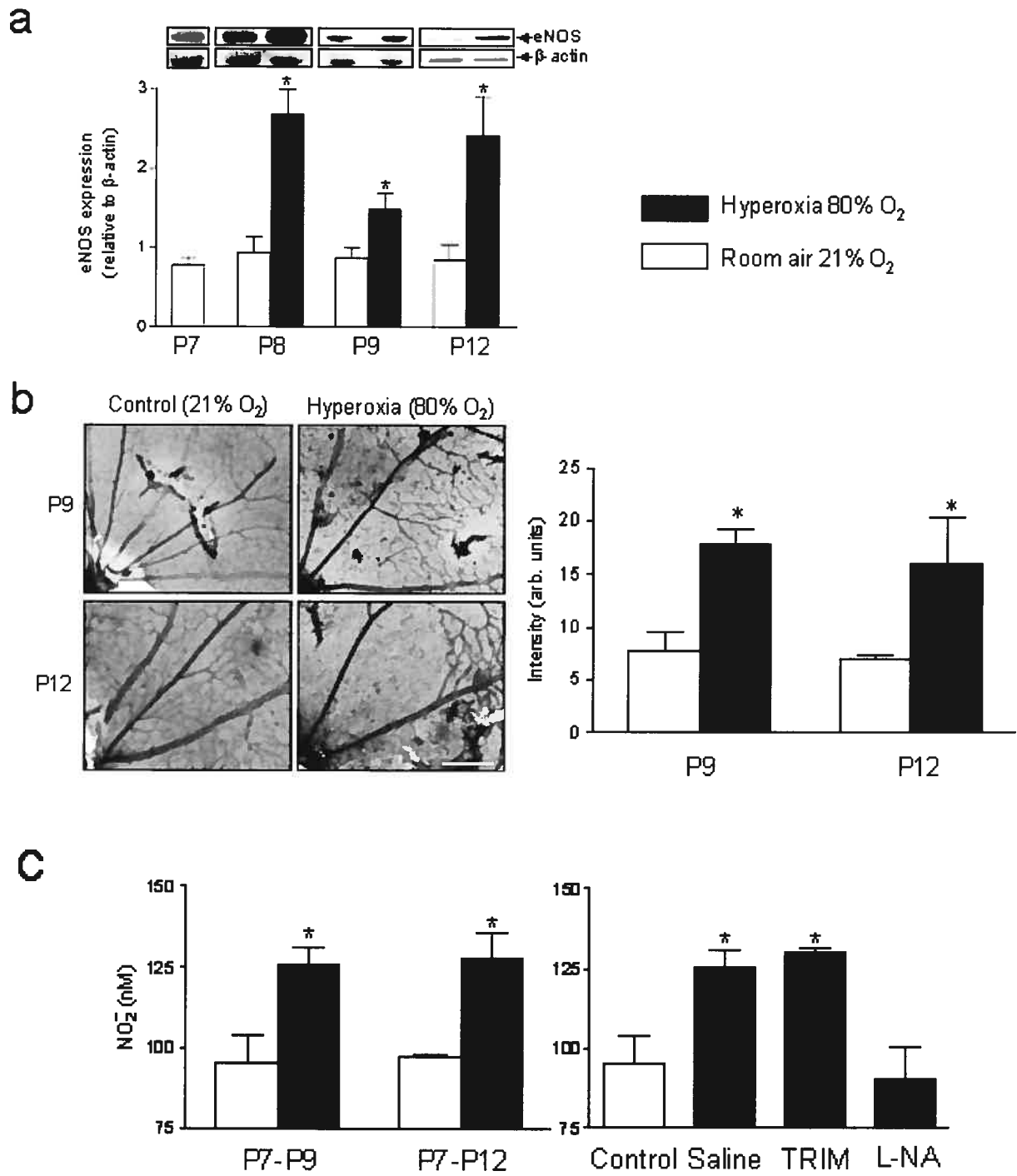


Figure 2. Expression of eNOS, NADPH-d reactivity and nitrite generation in retina exposed to hyperoxia. a) Western blots and corresponding densitometric analysis of eNOS immunoreactivity in retinas of rat pups exposed to 80% O₂ or room air from P7 to P12. Each experiment was repeated at least 3 times with samples from 3 separate experiments. Values are mean ± SEM of 3 experiments each repeated 3 times; * p<0.05 compared to same day control (21% O₂). b) NADPH-d reactivity in retinas of animals treated as in (a). Photomicrograph of retinas reveals NADPH-d-stained vasculature; histogram displays relative intensity of vascular staining by controlling for background intensity, which was unaltered by hyperoxia exposure. Scale bar: 125 μm. Values are mean ± SEM of n=3-4 retinas per treatment group; * p<0.05 compared to same day control; arb. refers to arbitrary. c) Nitrite generation in retinas of rat pups prepared as in (a). Range on abscissa (left panel) refers to period of exposure to hyperoxia. Animals exposed to hyperoxia from P7 to P9 received either vehicle (saline), L-NA or TRIM. Values are mean ± SEM; n=5 per treatment. *p<0.01 compared to values without asterisks.

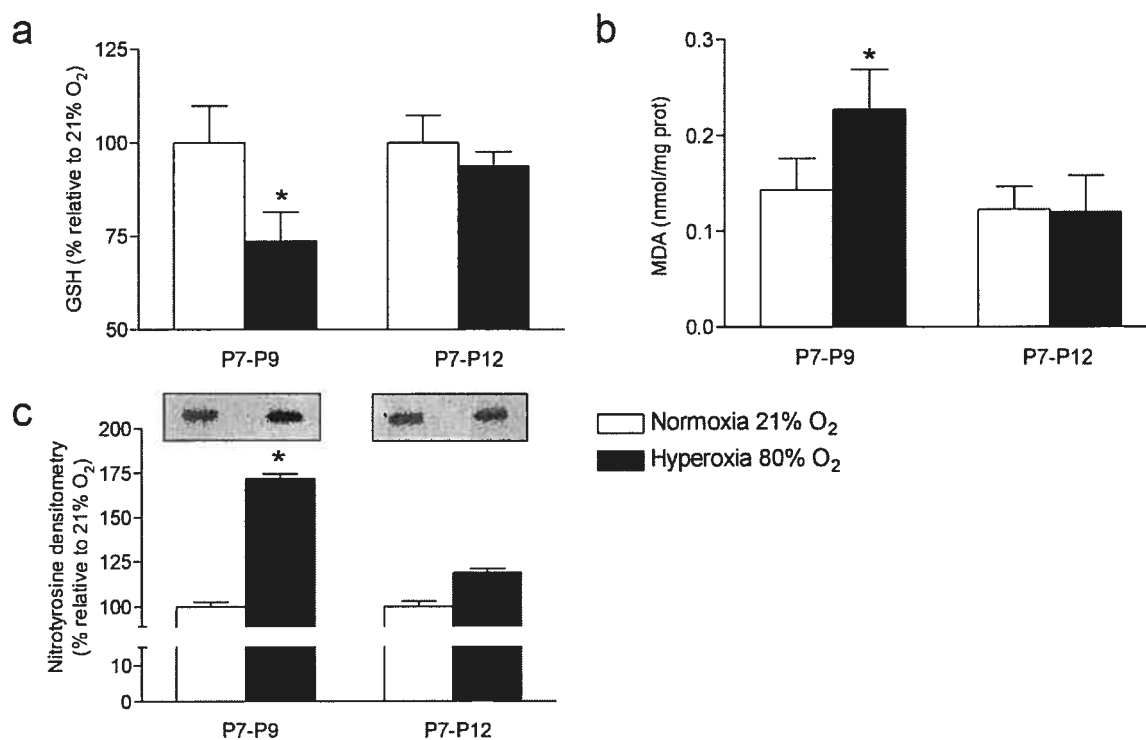


Figure 3. Glutathione, malondialdehyde and nitrotyrosine levels in retinas of rats exposed to hyperoxia. Rat pups were exposed to oxygen (80 % O₂) or room air as in Fig. 1. Animals were killed at P9 or P12 to determine a) reduced glutathione (GSH), b) malondialdehyde (MDA) concentrations and c) nitrotyrosine immunoreactivity in retinas. Values are mean \pm SEM each of 4-9 different retinas; * $p < 0.05$ compared to 21% O₂ controls.

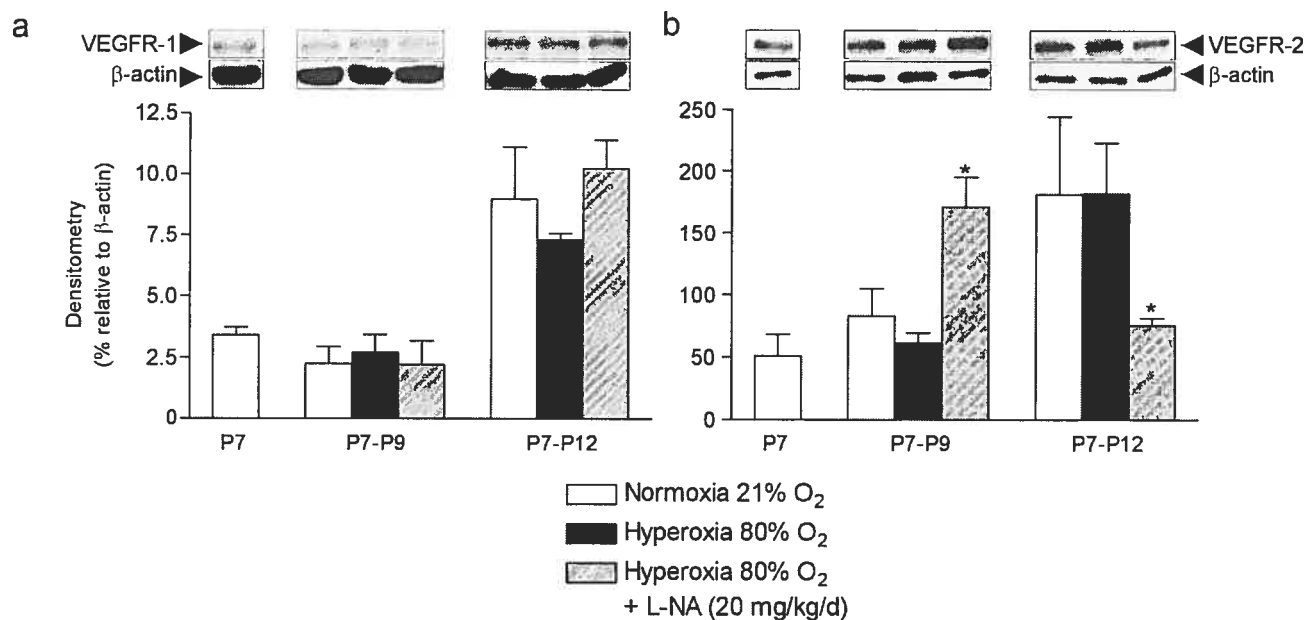


Figure 4. Modulation of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2 expression in retinas by hyperoxia and NOS inhibition. Rat pups were prepared as described in Fig. 3. VEGFR-1, VEGFR-2 and β -actin expression was determined by western blot analysis; VEGFR-1 and -2 densitometric analyses controlled for those of β -actin are presented in histograms. Values are mean \pm SEM, each of 4 experiments. * $p < 0.05$ compared to corresponding same day values without asterisks.

Figure 5.

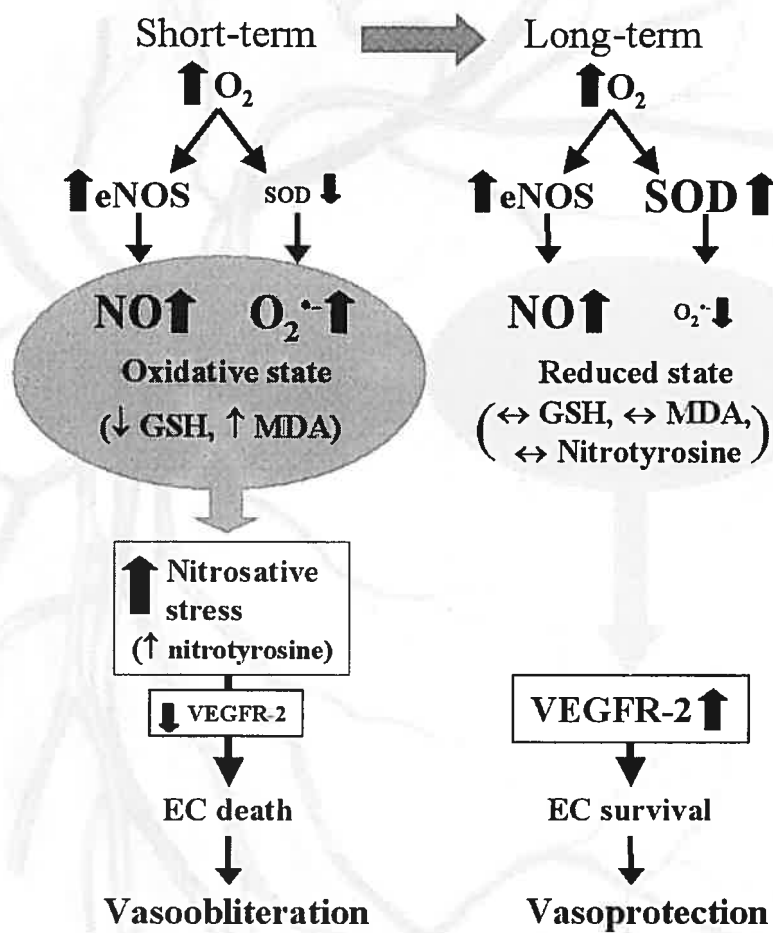


Figure 5. Effects of NO on retinal microvascular integrity during short- and longer-term exposure to hyperoxia. Short-term exposure to hyperoxia increases eNOS expression and decreases SOD activity in the retina [4]. NO in the presence of an oxidative environment (associated with decreased GSH and increased MDA levels) leads successively to a nitrosative stress (resulting in increased nitrotyrosine formation), a down-regulation of VEGFR2 and a microvascular degeneration. Upon longer exposure to hyperoxia, eNOS expression remains upregulated but SOD activity renormalizes [4]; this reestablishes a reduced redox state (resuming normal GSH levels and decreased MDA and nitrotyrosine concentrations), which leads consecutively to increased VEGFR-2 expression (relative to short-term hyperoxia and to diminished microvascular density) and to endothelial cell survival. The symbols and abbreviations refer to the following: ↑ increase; ↓ decrease; ↔ same as room air control; eNOS: endothelial nitric oxide synthase (activity); SOD: superoxide dismutase (activity); NO: nitric oxide; $O_2^{\bullet-}$: superoxide anion; MDA: malondialdehyde; GSH: reduced glutathione; VEGFR-2: VEGF receptor 2; EC: endothelial cell.

Remerciements

The authors would like to acknowledge the help and technical assistance of Hendrika Fernandez. Supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, the March of Dimes Birth Defects Foundation, the Heart and Stroke Foundation of Québec, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, Le Réseau de Recherche en Santé de la Vision and La Fondation du NO. MH Beauchamp, F Sennlaub and S Chemtob are recipients respectively of studentship, fellowship and Scientist awards from the Canadian Institutes of Health Research; F Gobeil jr and P Hardy are recipients of scholarships from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec; D Checchin is recipient of studentship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada; S Chemtob also holds a Canada Research Chair (perinatology).

Références

- [1] Smith, L. E.; Wesolowski, E.; McLellan, A.; Kostyk, S. K.; D'Amato, R.; Sullivan, R.; D'Amore, P. A. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35:101-11; 1994.
- [2] Madan, A.; Penn, J. S. Animal models of oxygen-induced retinopathy. *Front. Biosci.* 8:d1030-43; 2003.
- [3] Papp, A.; Nemeth, I.; Karg, E.; Papp, E. Glutathione status in retinopathy of prematurity. *Free Radic. Biol. Med.* 27:738-43; 1999.
- [4] Niesman, M. R.; Johnson, K. A.; Penn, J. S. Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. *Neurochem. Res.* 22:597-605; 1997.

- [5] Penn, J. S. Oxygen-induced retinopathy in the rat: possible contribution of peroxidation reactions. *Doc. Ophthalmol.* 74:179-86; 1990.
- [6] Phelps, D. L.; Rosenbaum, A. L. Vitamin E in kitten oxygen-induced retinopathy. II. Blockage of vitreal neovascularization. *Arch. Ophthalmol.* 97:1522-6.; 1979.
- [7] Penn, J. S.; Tolman, B. L.; Bullard, L. E. Effect of a water-soluble vitamin E analog, trolox C, on retinal vascular development in an animal model of retinopathy of prematurity. *Free Radic. Biol. Med.* 22:977-84; 1997.
- [8] Brion, L. P.; Bell, E. F.; Raghuvver, T. S. Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4:CD003665; 2003.
- [9] Davis, K. L.; Martin, E.; Turko, I. V.; Murad, F. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:203-36; 2001.
- [10] Parenti, A.; Morbidelli, L.; Ledda, F.; Granger, H. J.; Ziche, M. The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J.* 15:1487-9.; 2001.
- [11] Ziche, M.; Morbidelli, L.; Choudhuri, R.; Zhang, H. T.; Donnini, S.; Granger, H. J.; Bicknell, R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 99:2625-34.; 1997.
- [12] Papapetropoulos, A.; Garcia-Cardena, G.; Madri, J. A.; Sessa, W. C. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 100:3131-9.; 1997.

- [13] Tsurumi, Y.; Murohara, T.; Krasinski, K.; Chen, D.; Witzendichler, B.; Kearney, M.; Couffinhal, T.; Isner, J. M. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat. Med.* 3:879-86; 1997.
- [14] Tuder, R. M.; Flook, B. E.; Voelkel, N. F. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 95:1798-807; 1995.
- [15] Shen, Y. H.; Wang, X. L.; Wilcken, D. E. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett.* 433:125-31; 1998.
- [16] Vakkala, M.; Kahlos, K.; Lakari, E.; Paakko, P.; Kinnula, V.; Soini, Y. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 6:2408-16; 2000.
- [17] Halliwell, B.; Zhao, K.; Whiteman, M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic. Res.* 31:651-69.; 1999.
- [18] Murohara, T.; Asahara, T.; Silver, M.; Bauters, C.; Masuda, H.; Kalka, C.; Kearney, M.; Chen, D.; Symes, J. F.; Fishman, M. C.; Huang, P. L.; Isner, J. M. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin. Invest.* 101:2567-78.; 1998.
- [19] Lee, P. C.; Salyapongse, A. N.; Bragdon, G. A.; Shears, L. L., 2nd; Watkins, S. C.; Edington, H. D.; Billiar, T. R. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 277:H1600-8; 1999.

- [20] Sennlaub, F.; Courtois, Y.; Goureau, O. Nitric oxide synthase-II is expressed in severe corneal alkali burns and inhibits neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40:2773-9.; 1999.
- [21] Brooks, S. E.; Gu, X.; Samuel, S.; Marcus, D. M.; Bartoli, M.; Huang, P. L.; Caldwell, R. B. Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:222-8; 2001.
- [22] Ando, A.; Yang, A.; Mori, K.; Yamada, H.; Yamada, E.; Takahashi, K.; Saikia, J.; Kim, M.; Melia, M.; Fishman, M.; Huang, P.; Campochiaro, P. A. Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J. Cell. Physiol.* 191:116-24; 2002.
- [23] Sennlaub, F.; Courtois, Y.; Goureau, O. Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. *J. Clin. Invest.* 107:717-25.; 2001.
- [24] Wink, D. A.; Mitchell, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25:434-56; 1998.
- [25] Cianchi, F.; Cortesini, C.; Fantappie, O.; Messerini, L.; Schiavone, N.; Vannacci, A.; Nistri, S.; Sardi, I.; Baroni, G.; Marzocca, C.; Perna, F.; Mazzanti, R.; Bechi, P.; Masini, E. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 162:793-801; 2003.
- [26] Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:1620-4.; 1990.

- [27] Gu, X.; Samuel, S.; El-Shabrawey, M.; Caldwell, R. B.; Bartoli, M.; Marcus, D. M.; Brooks, S. E. Effects of sustained hyperoxia on revascularization in experimental retinopathy of prematurity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:496-502; 2002.
- [28] Coursin, D. B.; Cihla, H. P.; Will, J. A.; McCreary, J. L. Adaptation to chronic hyperoxia. Biochemical effects and the response to subsequent lethal hyperoxia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:1002-6; 1987.
- [29] Beauchamp, M. H.; Marrache, A. M.; Hou, X.; Gobeil, F., Jr.; Bernier, S. G.; Lachapelle, P.; Abran, D.; Quiniou, C.; Brault, S.; Peri, K. G.; Roberts, J., 2nd; Almazan, G.; Varma, D. R.; Chemtob, S. Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:3327-37; 2002.
- [30] Beauchamp, M. H.; Martinez-Bermudez, A. K.; Gobeil, F., Jr.; Marrache, A. M.; Hou, X.; Speranza, G.; Abran, D.; Quiniou, C.; Lachapelle, P.; Roberts, J., 2nd; Almazan, G.; Varma, D. R.; Chemtob, S. Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. *J. Appl. Physiol.* 90:2279-88; 2001.
- [31] Lachapelle, P.; Dembinska, O.; Rojas, L. M.; Benoit, J.; Almazan, G.; Chemtob, S. Persistent functional and structural retinal anomalies in newborn rats exposed to hyperoxia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77:48-55; 1999.
- [32] Reynaud, X.; Dorey, C. K. Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35:3169-77; 1994.
- [33] Ricci, B. Oxygen-induced retinopathy in the rat model. *Doc. Ophthalmol.* 74:171-7; 1990.

- [34] Penn, J. S.; Tolman, B. L.; Henry, M. M. Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35:3429-35; 1994.
- [35] Salvemini, D.; Wang, Z. Q.; Stern, M. K.; Currie, M. G.; Misko, T. P. Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:2659-63; 1998.
- [36] Lutty, G. A.; McLeod, D. S. A new technique for visualization of the human retinal vasculature. *Arch. Ophthalmol.* 110:267-76; 1992.
- [37] Dumont, I.; Peri, K. G.; Hardy, P.; Hou, X.; Martinez-Bermudez, A. K.; Molotchnikoff, S.; Varma, D. R.; Chemtob, S. PGE₂, via EP₃ receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period. *Am. J. Physiol.* 275:R1812-21; 1998.
- [38] Kuchiiwa, S.; Kuchiiwa, T.; Mori, S.; Nakagawa, S. NADPH diaphorase neurones are evenly distributed throughout cat neocortex irrespective of functional specialization of each region. *Neuroreport* 5:1662-4; 1994.
- [39] Najarian, T.; Marrache, A. M.; Dumont, I.; Hardy, P.; Beauchamp, M. H.; Hou, X.; Peri, K.; Gobeil, F., Jr.; Varma, D. R.; Chemtob, S. Prolonged hypercapnia-evoked cerebral hyperemia via K(+) channel- and prostaglandin E(2)-dependent endothelial nitric oxide synthase induction. *Circ. Res.* 87:1149-56; 2000.
- [40] Camera, E.; Rinaldi, M.; Briganti, S.; Picardo, M.; Fanali, S. Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 757:69-78; 2001.

- [41] Recknagel, R. O.; Glende, E. A., Jr. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol.* 105:331-7; 1984.
- [42] Daiber, A.; Bachschmid, M.; Kavakli, C.; Frein, D.; Wendt, M.; Ullrich, V.; Munzel, T. A new pitfall in detecting biological end products of nitric oxide-nitration, nitros(y)lation and nitrite/nitrate artefacts during freezing. *Nitric Oxide* 9:44-52; 2003.
- [43] Ghezzi, P.; Bonetto, V. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3:1145-53; 2003.
- [44] Schafer, F. Q.; Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30:1191-212; 2001.
- [45] Alon, T.; Hemo, I.; Itin, A.; Pe'er, J.; Stone, J.; Keshet, E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.* 1:1024-8; 1995.
- [46] Shih, S. C.; Ju, M.; Liu, N.; Smith, L. E. Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity. *J. Clin. Invest.* 112:50-7; 2003.
- [47] Garner, A.; Ashton, N. Vaso-obliteration and retrolental fibroplasia. *Proc R Soc Med* 64:774-7; 1971.
- [48] Atochin, D. N.; Demchenko, I. T.; Astern, J.; Boso, A. E.; Piantadosi, C. A.; Huang, P. L. Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23:1219-26; 2003.

- [49] Potter, C. F.; Kuo, N. T.; Farver, C. F.; McMahon, J. T.; Chang, C. H.; Agani, F. H.; Haxhiu, M. A.; Martin, R. J. Effects of hyperoxia on nitric oxide synthase expression, nitric oxide activity, and lung injury in rat pups. *Pediatr. Res.* 45:8-13; 1999.
- [50] Dimmeler, S.; Zeiher, A. M. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ.* 6:964-8; 1999.
- [51] Radi, R.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Naviliat, M.; Cayota, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 30:463-88; 2001.
- [52] Arteel, G. E.; Briviba, K.; Sies, H. Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett.* 445:226-30; 1999.
- [53] Tabrizi-Fard, M. A.; Maurer, T. S.; Fung, H. L. In vivo disposition of 3-nitro-L-tyrosine in rats: implications on tracking systemic peroxynitrite exposure. *Drug Metab. Dispos.* 27:429-31; 1999.
- [54] Gilead, A.; Neeman, M. Dynamic remodeling of the vascular bed precedes tumor growth: MLS ovarian carcinoma spheroids implanted in nude mice. *Neoplasia* 1:226-30; 1999.
- [55] Ferrara, N.; Gerber, H. P.; LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9:669-76; 2003.
- [56] Illi, B.; Puri, P.; Morgante, L.; Capogrossi, M. C.; Gaetano, C. Nuclear factor-kappaB and cAMP response element binding protein mediate opposite transcriptional effects on the Flk-1/KDR gene promoter. *Circ. Res.* 86:E110-7; 2000.
- [57] Garban, H. J.; Bonavida, B. Nitric oxide disrupts H₂O₂-dependent activation of nuclear factor kappa B. Role in sensitization of human tumor cells to tumor necrosis factor-alpha -induced cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 276:8918-23; 2001.

- [58] Huster, D.; Reichenbach, A.; Reichelt, W. The glutathione content of retinal Muller (glial) cells: effect of pathological conditions. *Neurochem. Int.* 36:461-9; 2000.
- [59] Al-Shabrawey, M.; El-Remessy, A.; Gu, X.; Brooks, S. S.; Hamed, M. S.; Huang, P.; Caldwell, R. B. Normal vascular development in mice deficient in endothelial NO synthase: possible role of neuronal NO synthase. *Mol. Vis.* 9:549-58; 2003.
- [60] Wagenaar, G. T.; Ter Horst, S. A.; Van Gastelen, M. A.; Leijser, L. M.; Mauad, T.; Van Der Velden, P. A.; De Heer, E.; Hiemstra, P. S.; Poorthuis, B. J.; Walther, F. J. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 36:782-801; 2004.
- [61] Robbins, S. G.; Rajaratnam, V. S.; Penn, J. S. Evidence for upregulation and redistribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors flt-1 and flk-1 in the oxygen-injured rat retina. *Growth Factors* 16:1-9; 1998.
- [62] Gerber, H. P.; Condorelli, F.; Park, J.; Ferrara, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272:23659-67; 1997.
- [63] McLeod, D. S.; Taomoto, M.; Cao, J.; Zhu, Z.; Witte, L.; Lutty, G. A. Localization of VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1) and effects of blocking it in oxygen-induced retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:474-82; 2002.
- [64] Lander, H. M.; Ogiste, J. S.; Pearce, S. F.; Levi, R.; Novogrodsky, A. Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J. Biol. Chem.* 270:7017-20; 1995.
- [65] Shihab, F. S.; Bennett, W. M.; Isaac, J.; Yi, H.; Andoh, T. F. Nitric oxide modulates vascular endothelial growth factor and receptors in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 63:522-33; 2003.

- [66] Wang, J.; Morita, I.; Onodera, M.; Murota, S. I. Induction of KDR expression in bovine arterial endothelial cells by thrombin: involvement of nitric oxide. *J. Cell Physiol.* 190:238-50; 2002.
- [67] Sennlaub, F.; Chemtob, S. VEGFR-1: a safe target for prophylaxis of retinopathy of prematurity? *Pediatr. Res.* 55:1-2; 2004.
- [68] Sennlaub, F.; Courtois, Y.; Goureau, O. Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy. *J. Neurosci.* 22:3987-93; 2002.

CHAPITRE 4

Rôle du thromboxane dans la dégénérescence
microvasculaire rétinienne lors de la
rétinopathie induite par l'oxygène

Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy

Martin H. Beauchamp,¹ Ana Katherine Martinez-Bermudez,^{1,2} Fernand Gobeil Jr.,¹ Anne Marilise Marrache,^{1,2} Xin Hou,¹ Giovanna Speranza,^{1,2} Daniel Abran,¹ Christiane Quiniou,¹ Pierre Lachapelle,³ Jackson Roberts II,⁴ Guillermina Almazan,² Daya R. Varma,² and Sylvain Chemtob^{1,2}

¹Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, Research center of Hôpital Ste-Justine, Montreal, Canada H3T 1C5, ²Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Canada H3G 1Y6, ³Department of Ophthalmology, McGill University, Montreal, Canada H3G 1Y6, and ⁴Departments of Pharmacology and Medecine, Vanderbilt University, Nashville, TN, 37232-6602.

Running title: TXA₂-induced endothelial cell death

Corresponding author:

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

Department of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology

Hôpital Ste-Justine, Research Center

3175 Côte Ste. Catherine

Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Tel: (514) 345-4729; Fax: (514) 345-4801



Key words: endothelium; retina; necrosis; apoptosis; peroxidation

Abrégé

Microvascular degeneration is an important event in oxygen-induced retinopathy (OIR), a model of retinopathy of prematurity. Because oxidant stress abundantly generates thromboxane A₂ (TxA₂), we tested whether TxA₂ plays a role in retinal vasoobliteration of OIR and contributes to such vascular degeneration by direct endothelial cytotoxicity. Hyperoxia-induced retinal vasoobliteration in rat pups (80% O₂ exposure from postnatal days 5-14) was associated with increased TxB₂ generation and was significantly prevented by TxA₂ synthase inhibitor CGS-12970 (10 mg · kg⁻¹ · day⁻¹) or TxA₂-receptor antagonist CGS-22652 (10 mg · kg⁻¹ · day⁻¹). TxA₂ mimetics U-46619 (EC₅₀ 50 nM) and I-BOP (EC₅₀ 5 nM) caused a time- and concentration-dependent cell death of neuroretinovascular endothelial cells from rats as well as newborn pigs but not of smooth muscle and astroglial cells; other prostanoids did not cause cell death. The peroxidation product 8-iso-PGF₂, which is generated in OIR, stimulated TxA₂ formation by endothelial cells and triggered cell death; these effects were markedly diminished by CGS-12970. TxA₂-dependent neuroretinovascular endothelial cell death was mostly by necrosis and to a lesser extent by apoptosis. The data identify an important role for TxA₂ in vasoobliteration of OIR and unveil a so far unknown function for TxA₂ in directly triggering neuroretinal microvascular endothelial cell death. These effects of TxA₂ might participate in other ischemic neurovascular injuries.

Introduction

Oxygen-induced retinopathy (OIR) is an established model of retinopathy of prematurity (ROP) (14, 43, 54). OIR is associated with vascular cell injury culminating in microvascular degeneration, which precedes an abnormal neovascularization (7, 8, 14, 42, 43, 54). This microvascular degeneration leads to ischemia (10), which is thought to contribute to the structural and functional changes observed in OIR (35, 55). Oxidant stress plays an important role in the retinal vasoobliteration of OIR (48, 52, 53). Endothelial cells seem particularly susceptible to peroxidation-induced injury (17, 34); pericytes, smooth muscle cells, and perivascular astrocytes are relatively resistant (9, 17, 25). The mediators of oxidant stress-induced cell death are complex and not fully known. Thromboxane A₂ (TxA₂) is abundantly generated after an oxidant stress (15, 21, 24) and contributes to neurovascular injury, including injury to the retina (20, 30, 44); however, its specific role in retinal vasoobliteration in OIR has not been demonstrated. Many of the vascular actions of TxA₂ have been attributed to vasoconstriction and platelet aggregation (21). However, endothelial cytotoxicity in OIR occurs before platelet aggregation (6, 14, 43). In addition, TxA₂ generation and hemodynamic compromise after an oxidant stress to newborn retina are independent of platelet aggregation (15). Thus it is possible that TxA₂ may also cause other effects on microvasculature, more specifically vascular endothelial cells.

It has recently been shown that TxA₂ affects intercellular communication by modifying expression of intercellular adhesion molecules (31), as well as by affecting the distribution of gap junctions on endothelial cells (5). TxA₂ can augment the effects of oxidant stress by increasing oxygen radical generation (40). Moreover, TxA₂ has been

found to cause death of immature murine thymocytes (65). However, direct evidence that TxA_2 induces death of other primary cells, and especially in this context of neuroretinal microvascular endothelial cells, has never been reported. Corroboration of this inference may further our understanding of the pathogenesis of ROP. We, therefore, tested the hypothesis that TxA_2 plays a role in the microvascular degeneration of OIR, to which direct cytotoxic actions of TxA_2 on neuroretinal microvascular endothelial cells can contribute. Data support our hypothesis and disclose a previously undescribed function of TxA_2 .

Matériels et méthodes

Animals.

Newborn Sprague-Dawley rats (Charles River, St. Constant, Quebec) and 1- to 3-day-old Yorkshire piglets (Fermes Ménard, L'Ange-Gardien, Quebec) were used according to a protocol of the Hôpital Sainte-Justine Animal Care Committee.

OIR.

OIR was induced as described by our laboratory (35) and others (48, 52, 54). Briefly, rats were placed in an $80 \pm 5\%$ oxygen environment from postnatal days 5-14; controls were maintained in room air (21% O_2). By 5 days of age, the retinal vasculature of rats reached $\sim 30\%$ of its distance to the periphery, which it attains by 14 days of age (28); this allows testing of the desired effect of hyperoxia on degeneration of existing vessels (7, 8). Pups were randomly selected to receive throughout the study period intraperitoneal injections of 50 μL DMSO (vehicle), selective TxA_2 synthase inhibitor

CGS-12970 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) or TxA₂-receptor antagonist CGS-22652 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$); the efficacy of doses used has previously been demonstrated (3, 16). Animals were killed on day 15, and retinal flat mounts were prepared for ADPase staining (35, 39). Retinas were photographed (MTI CCD-72, Dage, Michigan City, MI) and magnified on screen to $\times 100$ to allow us to visualize the microvasculature more clearly. Vascular density was calculated for the full retinal surface by using the software program Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Vascular density in study groups was compared with that of untreated groups raised in 21% O₂, and their values were set as 100%.

Cell count on microvessels from the nervous system.

Neuroretinal microvessels from rats (10-14 days old) and piglets were isolated as previously reported (36). Isolated microvessels were dispersed in Hanks' balanced salt solution media and filtered twice through 25- μm nylon mesh to obtain mostly capillaries. Filtrate predominantly contained endothelium, as these small microvessels were immunoreactive to factor VIII but not to smooth muscle-specific actin (36). Freshly isolated microvessels were incubated for 48 h in endothelium growth media in the absence or the presence of U-46619. Cell death was assessed by using membrane-impermeable and -permeable DNA-binding dyes propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 (41, 45), respectively. Hoechst 33342 identifies all cells, and PI incorporates if cell membrane is disrupted (dying cells). Microvessels were loaded for 30 min at 37°C with PI and Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and visualized with an immersion objective ($\times 400$) placed directly onto the culture medium using red and ultraviolet filters. Images were

acquired with a digital camera attached to a microscope (Axioskop, Zeiss, Germany). To enhance reproducibility, cells were only counted in microvessels containing >20 endothelial cells. The proportion of dying cells was estimated as the ratio of PI-positive cells relative to all cells (stained with Hoechst 33342).

Cell cultures.

Because the U-46619-induced proportion of cell death of neuroretinal microvessels from rat and pig was similar (see Fig. 2), and because a large number of rat pup retinas would be required to isolate microvessels from their small eyes for endothelial cell culture, we cultured retinovascular endothelial, smooth muscle, and astroglial cells from piglets as described (29, 36). The retinal structures and the development of the pig retinal vasculature have characteristics similar to those of humans (11).

Microvessels were suspended in selective endothelial growth media (Clonetics). Confluent cells were trypsinized and subcultured. Cell viability was verified by trypan blue exclusion and was >95%. Endothelial cells were identified by anatomic structure and positive reactivity to factor VIII and negative reactivity to smooth muscle-specific actin and glial fibrillary acidic protein antibodies (GFAP). A similar technique was used for smooth muscle cell culture. The latter were identified by their spindle-shaped appearance and positive reactivity to smooth muscle-specific actin and negative reactivity to factor VIII and GFAP antibodies.

Neuroretinal astroglial cells were also cultured (29, 36). Essentially, retinas were homogenized and filtered through 230- and 150- μm nylon mesh, and the filtrate was centrifuged at 1,000 g for 7 min, resuspended in DMEM with 10% fetal calf serum, and

incubated in air with 5% CO₂ at 37°C. Macrophages were removed with a rotary shaker at 225 rpm for 3 h. Purity of astrocytes was assessed by immunoreactivity to GFAP (>95%).

To further investigate species independence and endothelial-type cytotoxicity to TxA₂ mimetics, the effects of the latter were tested on endothelial cells from different tissues from humans. Specifically, effects of U-46619 were tested on human endothelial cells from adult brain (46), as well as on human endothelial cells from aorta, dermis, and umbilical vein.

Cell viability assays.

Confluent cells (5-15 passages) were reseeded in DMEM (without fetal calf serum) for 24 h and then incubated for up to 48 h with stable specific TxA₂ mimetics U-46619 and [1S-[1 α , 2 α , (Z),3 β (1E,3S*),4 α]]-7-[3-[3-hydroxy-4-(4-iodophenoxy)-1-butenyl]-7-oxabicyclo[2.1.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid (I-BOP) or with the relevant peroxidation product 8-iso-PGF_{2 α} , which elicits thromboxane production (29, 36). In some experiments, TxA₂-receptor antagonist L-670596 (0.1 μ M) (22, 29, 36) was added 20 min before treatment with U-46619. Cell viability was estimated by reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (38). At the end of the experiment, MTT (0.5 mg/ml in PBS, pH 7.2) was incubated with cells for 2.5 h at 37°C. The medium was then drained, the formazan product was solubilized with acidified (40 mM HCl) isopropanol, and optical density was measured at 600 nm. Characterization of the type of cell death (necrosis or apoptosis) was studied by using membrane-impermeable and -permeable DNA-binding dyes PI and Hoechst 33342, respectively (41,

45). Cells were loaded for 15 min at 37°C with PI and Hoechst 33342 (5 µg/ml) and visualized with an immersion objective placed directly onto the culture medium using red and ultraviolet filters. PI-positive cells (necrotic cells) and cells with fragmented or condensed nuclei and intact membrane (apoptotic cells) were determined in five fields per well.

Contribution of apoptosis was further studied by inhibition of major effector caspase-6, caspase-9, and preferentially caspase-3 using Z-D(OMe)-E(OMe)-V-D(OMe)-FMK (Z-DEVD-FMK; 10-50 µM) (67). Z-DEVD-FMK was added to cultured (porcine) retinovascular endothelial cells 1 h before a 48-h exposure to either U-46619 (0.5 µM), the known apoptosis-inducing ceramide (8 µM) (27), or nonapoptotic-inducing concentrations of H₂O₂ (0.5 mM) (23). The latter two were used as positive and negative controls. Based on pilot experiments, 50 µM Z-DEVD-FMK was selected as it provided maximum efficacy. For similar purposes, poly(ADP-ribose)polymerase inhibition using nicotinamide (12) (1-100 nM) was also tested. Cell viability was assessed by MTT assay.

Measurement of DNA fragmentation and lactate dehydrogenase.

DNA fragmentation was determined by a terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)-based technique using a commercial kit (Apoptag). Endothelial cells were grown on coverslips and treated with U-46619 for different time periods. Cells were washed twice with cold PBS, fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 10 min, washed twice in PBS, and postfixed in ethanol-acetic acid (2:1) for 5 min at -20°C. After they were washed, cells were incubated with terminal transferase and FITC-conjugated dUTP for 1 h at 37°C in a humid chamber.

The reaction was stopped by incubation with stop wash buffer (from kit) for 10 min at room temperature. Nuclei were counterstained with PI, washed, and mounted with Imm-mount. Cells were visualized under fluorescence microscope.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured as follows (2). Briefly, 800 μ l of reaction medium (80 mM Tris \cdot HCl, 200 mM NaCl, 0.2 mM NADH) were added to 200 μ l of the culture medium in a spectrophotometer cuvette. The reaction was started by adding 1.5 mM pyruvate (final). LDH activity was measured by spectrophotometric intensity changes at 340 nm. The LDH content was determined by using the following equation: $[\Delta \text{ optical density} / \Delta \text{ time (min)}] \times 9,682 = \text{units LDH/liter (2)}$, where Δ is change.

Thromboxane and 8-iso-PGF₂ α assays.

TxB₂ (stable TxA₂ metabolite) in retinas of animals exposed to hyperoxia was extracted by using octadecylsilyl silica columns and was measured by radioimmunoassay (15, 29, 36). Cross-reactivity of the antibody for other prostanoids is <2%, and interassay variability is <5%. Similar measurements were made on culture media of cells.

Isoprostanes were extracted from tissues as for TxB₂ (15, 29, 36), reflecting the free active unesterified isoprostane (36), and was measured by immunoassay technique with a commercial kit, as described by the manufacturer (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) and previously utilized (36). The cross-reactivity of the antibody with TxB₂, PGE₂, and PGF₂ α is $\leq 0.1\%$; intra- and interassay variability was $\leq 5\%$.

Chemicals and materials.

CGS-22652 and CGS-12970 were gifts from Ciba-Geigy (Summit, NJ), and L-670596 from Merck Frosst (Pointe-Claire, Quebec). Brain endothelial cells were generously provided by the National Research Council of Canada (Ottawa, Ontario). The following materials were purchased: human aortic, dermal, and umbilical vein endothelial cells (Clonetics); ceramide, DMSO, nicotinamide, MTT, and PI (Sigma Chemical, St. Louis, MO); U-46619, I-BOP, 16,16-dimethyl-PGE₂, and 8-iso-PGF₂ α (Cayman Chemical); Hoechst 33342 (Polysciences, Warrington, PA); Z-DEVD-FMK (R&D Systems, Minneapolis, MN); TxB₂ radioimmunoassay kit (Amersham); antibodies to factor VIII, smooth muscle-specific actin, and GFAP (Dako, Carpinteria, CA); FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA); Apoptag direct fluorescein kit (Intergen, Gaithersburg, MD); and other materials were purchased from Fisher (Montreal, Quebec).

Statistical analysis.

Data were analyzed by one- or two-way ANOVA factoring for treatment and concentration or time, followed by the Tukey-Kramer method for comparison among means. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Values are presented as means \pm SE.

Résultats

Role of TxA₂ in hyperoxia-induced retinal microvascular degeneration.

Control [vehicle (DMSO)-treated animals] exhibited a fully vascularized retina at 15 days of age as expected (6, 8, 14, 28). Exposure of rat pups to 80% O₂ caused a

marked increase in retinal TxB_2 levels compared with levels observed in animals exposed to 21% O_2 (Fig. 1A). The hyperoxia induced the expected retinal vasoobliteration (Fig. 1, B and C) (6-8, 54). TxA_2 synthase inhibitor CGS-12970 decreased TxB_2 levels and significantly attenuated the 80% O_2 -induced decrease in retinal vessel density. This vasoobliteration was similarly diminished by TxA_2 -receptor antagonist CGS-22652. CGS-12970 and CGS-22652 did not affect retinal vessel density of control rats maintained at 21% O_2 .

Effect of U-46619 on isolated retinal microvessels.

The effect of the stable TxA_2 mimetic U-46619 on microvascular cell death was tested directly on retinal microvessels ($\leq 25 \mu\text{m}$) containing primarily endothelial cells (factor VIII positive and smooth muscle actin negative). U-46619 increased PI incorporation in rat retinal microvasculature, which is indicative of cell death (Fig. 2A), such that the proportion of PI-positive cells relative to all cells (which stain to Hoechst 33342) was significantly augmented by U-46619. To ascertain these observations, this effect was also tested in the pig, which, although debated, has been used to produce an OIR (60, 62). U-46619 also caused increased PI incorporation in newborn pig retinal microvessels (Fig. 2B).

Effects of thromboxane mimetics on cell viability.

Effects of TxA_2 (mimetics) were tested directly on retinovascular endothelial cells from the piglet because a large number of rat pup retinas would otherwise be needed. U-46619 and I-BOP caused time- (Fig. 3, A and B) and concentration-dependent (Fig. 3C)

death of retinovascular endothelial cells in culture (as reflected by a decrease in MTT). EC_{50} for U-46619 and I-BOP was ≈ 50 and 5 nM, respectively (48 h). Selective TxA_2 -receptor antagonist L-670596 completely prevented U-46619-induced endothelial cell death (Fig. 3D), substantiating the selectivity of TxA_2 mimetic actions. Other major prostanoids with vasoconstrictor properties comparable to TxA_2 , namely 16,16-dimethyl PGE_2 (stable analogs of PGE_2) and fenprostalene (stable analogs of $PGF_{2\alpha}$), did not affect endothelial cell viability (Fig. 3D).

In all experiments presented above, media contained U-46619 or I-BOP throughout the study period. To determine whether a shorter duration of exposure to TxA_2 mimetics could induce cell death, the media were changed after different exposure times with a new one excluding U-46619; control cells were subjected to similar media changes. Cell death was quantified (by MTT assay) 48 h after the addition of U-46619 or the vehicle. Exposure to U-46619 (0.5 μM) for 4 h was sufficient to trigger cell death of the same magnitude as was observed after a longer duration of exposure (Fig. 3E).

In contrast to effects observed on retinovascular endothelial cells, U-46619 elicited negligible cell death of retinovascular smooth muscle cells and astrocytes (Fig. 3F).

Effect of endogenously generated thromboxane on cell death.

OIR is associated with an oxidant stress (48, 52) and hence is expected to stimulate formation of the major peroxidation product 8-iso- $PGF_{2\alpha}$ (36, 57), which can generate thromboxane in the retina (36). Indeed, 8-iso- $PGF_{2\alpha}$ levels in the rat retina 1 day after exposure to hyperoxia were 396 ± 21 pg/mg protein and were significantly ($P < 0.01$) higher than in the control retina (88 ± 12 pg/mg protein). We examined

whether 8-iso-PGF₂ α could induce a TxA₂-dependent endothelial cell death; this would establish a role for endogenously produced thromboxane on endothelial cell viability. 8-Iso-PGF₂ α caused a rapid increase in thromboxane formation by retinovascular endothelial cells and induced cell death, both of which were significantly prevented by the thromboxane synthase inhibitor CGS-12970 (Fig. 4). In untreated cells, TxB₂ levels remained <70 pg/10⁶ cells over the 24-h study period.

Nature of retinovascular endothelial cell death.

The decrease in MTT in retinovascular endothelial cells (Fig. 3) was consistent with a corresponding increase in PI incorporation (Fig. 5, *b* and *d*). The number of cells with intact membranes and fragmented or condensed chromatin (Fig. 5*a*) as well as TUNEL-positive cells (Fig. 5*c*) (indicative of apoptosis) was $\leq 8\%$, even after 48-h exposure to U-46619 (Fig. 5*d*). In accordance with these observations, the caspase inhibitor Z-DEVD-FMK (50 μ M) only slightly reduced U-46619-triggered cell death, whereas, as anticipated, cell death induced by ceramide (27) was totally prevented by Z-DEVD-FMK and that by H₂O₂ (0.5 mM) was unaffected (23) (Fig. 5*e*). Similarly, inhibition with nicotinamide (12) (1-100 nM) of the poly(ADP-ribose)polymerase also involved in apoptosis did not prevent U-46619-induced cell death ($n = 4$). In contrast, LDH release in response to U-46619 (indicative of necrosis) increased in a time-dependent manner (Fig. 5*f*).

Effects of thromboxane mimetic on endothelial cells from different human tissues.

To further ascertain U-46619-induced neurovascular endothelial cytotoxicity, effects of this TxA_2 mimetic were tested on human endothelial cells from (adult) brain (46) and other tissues. U-46619 caused death of endothelial cells from brain but not from aorta, dermis, or umbilical vein (Fig. 6). Hence data suggest that neurovascular endothelial cells are particularly susceptible to TxA_2 -elicited toxicity.

Discussion

The mechanisms underlying the microvascular degeneration observed in the OIR, a model of ischemic retinopathy (10, 54) comparable to ROP (6-8, 42), are mostly unknown. The present study was conducted to determine whether TxA_2 played a role in retinal microvascular obliteration in OIR and, if so, to determine whether TxA_2 could contribute to microvascular degeneration by inducing endothelial cytotoxicity. Our data support this inference and provide evidence for a novel function for TxA_2 as an inducer of retinovascular endothelial cell death.

The cytotoxic effect of TxA_2 (Figs. 2 and 3) is relatively cell type selective because it was observed in neuroretinovascular endothelial cells but not in smooth muscle and astroglial cells. Also, TxA_2 (mimetics) did not affect endothelial cells from nonneural tissues (Fig. 6). Inhibitors of endogenous TxA_2 generation prevented cell death (Figs. 1 and 4); hence it may be inferred that TxA_2 also contributes to the retinal microvascular degeneration observed *in vivo*. This cytotoxic action of TxA_2 is unlikely to be caused entirely by its vasoconstrictor effects, because other vasoconstrictor prostanoids (PGE_2

and $\text{PGF}_{2\alpha}$ analogs) did not cause cell death (Fig. 3D). Similarly, it is improbable that it is simply due to platelet aggregation (6-8, 14, 15, 42).

Cultures of endothelial cells were performed on retinal vessels of newborn pigs because of the small number of microvessels available in rat pup retinas. However, the newborn pig is born with a fully vascularized retina (11), in contrast to the rat (28) and premature infant (6). On the other hand, retinal structures and vasculature and their development in the pig have characteristics similar to those of the human (11). Despite differences between rat and pig retinas, TxA_2 -induced cell death was similar in the microvessels of rat and pig (Fig. 2). This implies a species-independent cytotoxic effect of TxA_2 on neuroretinal vascular endothelial cells (Figs. 2 and 6).

An important role for TxA_2 in retinal vasoobliteration of OIR is suggested by the data showing the prevention of the loss of ADPase staining in endothelial cells (39) by TxA_2 synthase and receptor blockers CGS-12970 and CGS-22652 (Fig. 1). Although ADPase can also be found in pericytes and smooth muscle cells (39), because the TxA_2 mimetics U-46619 and I-BOP induced death of endothelial but not smooth muscle cells (Fig. 3), the loss of vascular staining in OIR is more likely consistent with the requirement of endothelium for pericyte survival (19). One can argue that, whereas TxA_2 production is stimulated by oxidant stress (15, 21, 24), because the latter is known to contribute to the retinal vasoobliteration in OIR (48, 52), the protective effects of TxA_2 synthase and receptor blockers CGS-12970 and CGS-22652 on vasoobliteration may be explained by postulated antioxidant properties of these agents. However, these types of compounds do not block the oxidant stress-induced increase in peroxidation products (15). Furthermore, it should be noted that results obtained with CGS-12970 and CGS-22652 contrast with

those reported with the cyclooxygenase inhibitor indomethacin, which was associated with greater vasoobliteration in OIR (47). This apparent discrepancy can be due to the lack of specificity of indomethacin, which compromises circulation (50), and/or by inhibition of the formation of the cytoprotective prostaglandins such as PGI₂ and PGE₂ (56, 66). All in all, based on evidence previously reported (47, 50, 56, 66) and especially presented in this study (Figs. 1-4), the prostanoid TxA₂ seems to mediate the effects of oxidant stress (15, 29, 36) by contributing significantly to the microvascular degeneration in OIR and possibly ROP.

TxA₂ exerts known functions that may contribute to vasoobliteration, notably platelet aggregation and vasoconstriction (21). Platelet aggregation is involved in other forms of ischemic neuropathies (51). However, studies of oxidant stress on impaired ocular hemodynamics (15) and many others on OIR reveal an early endothelial cytotoxicity that is independent of platelet aggregation (6-8, 14, 42), although this can be detected later (42). The degree of retinal vasoconstriction evoked by TxA₂ is unlikely to result in vasoobliteration (1), as supported by the effects of other important retinal vasoconstrictors such as (analogs of) PGF_{2α}, which are equally released under oxidant stresses (15) but did not cause cell death (Fig. 3D). Hence, effects of TxA₂ other than platelet aggregation and vasoconstriction probably also contribute to the retinal vasoobliteration associated with OIR.

Indeed, a major finding of this study is the direct and relatively selective thromboxane-induced cytotoxicity to retinovascular endothelial cells (Fig. 3); this effect was observed by using different TxA₂ mimetics and prevented by a selective TxA₂-receptor antagonist (Fig. 3, A-D). Although oxidant stress can stimulate TxA₂ generation

in neural tissues over long durations (Figs. 1 and 4; Ref. 61), data suggest a triggering action of TxA_2 in inducing retinovascular endothelial cell death; exposure of cells for only 4 h to U-46619 was sufficient to induce cell death detected 48 h later (Fig. 3E). The increased vulnerability of retinovascular endothelial cells to TxA_2 cannot simply be explained by a limited expression of TxA_2 receptors in astrocytes and certainly not in smooth muscle cells (26, 32, 33). Similarly, the effect of TxA_2 on retinovascular endothelial cells also seems to distinguish itself from that on other endothelial cells (Fig. 6). Consistent with our observations, it has been reported that TxA_2 causes migration of renal microvascular endothelial cells (18) but not of human umbilical vein endothelial cells (5), which are also known to contain TxA_2 receptors (32). This probably reflects the heterogeneity of endothelium (63), such as, for instance, the distinct properties of glomerular and brain endothelium. Hence, differences in cellular phenotypes contribute to cell-specific TxA_2 -induced effects. Altogether, our data strongly suggest that TxA_2 is cytotoxic to neuroretinal microvascular endothelium, which might contribute to the retinal vasoobliteration of OIR.

Retinovascular endothelial cell death induced by TxA_2 (using the mimetic U-46619) does not seem to be due primarily to apoptosis. Nuclear condensation and DNA fragmentation were observed in $\leq 8\%$ of cells (Fig. 5, *a*, *c*, and *d*). Inhibition of major effector caspases only slightly reduced TxA_2 mimetic-induced cell death (Fig. 5*e*); a similar inefficacy of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor nicotinamide (12) was observed. On the other hand, U-46619 caused a time-dependent increase in PI incorporation and LDH release, indicative of membrane disruption and suggestive of necrosis (Fig. 5, *b*, *d*, and *f*). Nonetheless, because of the relatively long lag time (24 h)

between TxA_2 mimetic treatment and detection of cell death (Fig. 3, *A* and *B*), one cannot totally exclude a form of cell death intermediate between apoptosis and necrosis as proposed for other cells and termed "necrapoptosis" (37, 59).

The mechanisms for TxA_2 -induced cytotoxicity of neuroretinal vascular endothelial cells are not clear. A possibly important mechanism may involve cellular mobilization and incorporation of calcium by TxA_2 (4). There is strong evidence that an increase in intracellular calcium can induce both necrotic and apoptotic cell death processes (49, 64). Changes in cellular calcium can activate specific phospholipases and proteases, disrupt mitochondrial permeability transition pores, which results in arrest in ATP production, and stimulate the generation of reactive oxygen species (49, 64), which can in turn sustain a self-destructive cycle (13). Interestingly, we found that treatment of retinovascular endothelial cells with U-46619 caused a fourfold increase in hydroperoxides, consistent with other reports (40), and, more importantly, the induced cell death was prevented by the antioxidant U-74389G (data not shown). Studies on mechanisms of TxA_2 -induced neuroretinovascular endothelial cell death are presently under investigation.

In conclusion, this study unveils for the first time an important role for a specific factor in the retinal microvascular degeneration of OIR, namely TxA_2 . Also, TxA_2 may contribute in this process through a previously undescribed function, specifically by directly inducing retinovascular endothelial cell death. We speculate that TxA_2 -induced microvascular endothelial degeneration could contribute to the pathogenesis of ROP and other ischemic retinopathies and perhaps encephalopathies (21, 24, 30, 44, 58).

Figures

Figure 1.

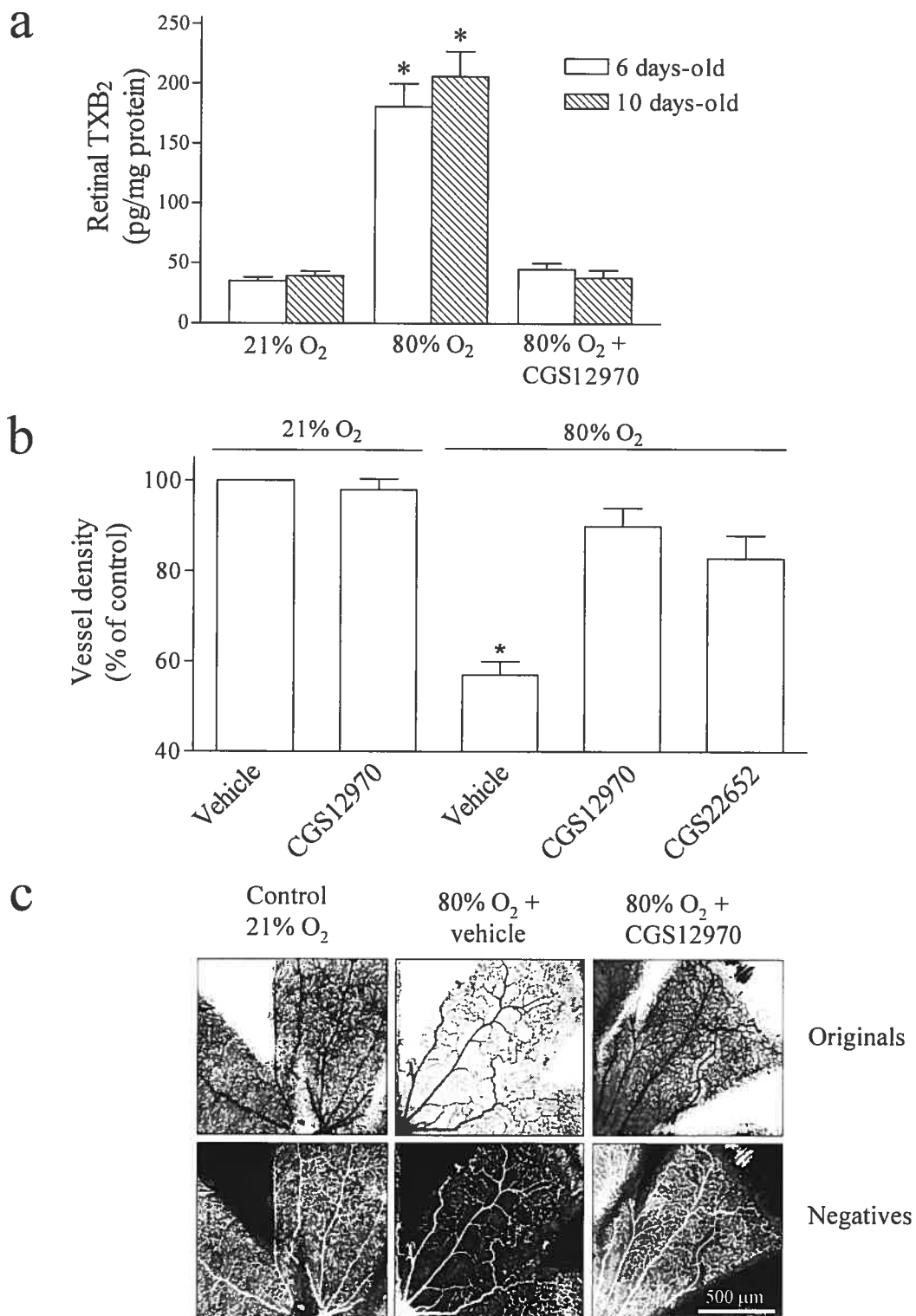


Figure 1. A: effects of thromboxane A₂ (TxA₂) synthase inhibitor CGS-12970 and TxA₂-receptor antagonist CGS-22652 on hyperoxia-induced vasoobliteration in rats. Rats were exposed from postnatal days 5-14 to air or 80% O₂ (as described in MATERIALS AND METHODS). TxB₂, thromboxane B₂. B: pups were randomly assigned throughout study period to intraperitoneal injections of 50 µl of vehicle DMSO, selective TxA₂ synthase inhibitor CGS-12970 (10 mg · kg⁻¹ · day⁻¹), or TxA₂-receptor antagonist CGS-22652 (10 mg · kg⁻¹ · day⁻¹). Rats were killed on day 15, and retinal flat mounts were stained with ADPase. Vascular density was calculated for the total retinal surface, and results are presented as percent difference from untreated animals raised in air. Values in histogram are means ± SE of 4-5 retinas for A and 5-16 retinas for B. * *P* < 0.01 compared with all other values. C: original and negative photomicrographs presented are magnified to clearly display the microvasculature. Scale bar is 500 µm.

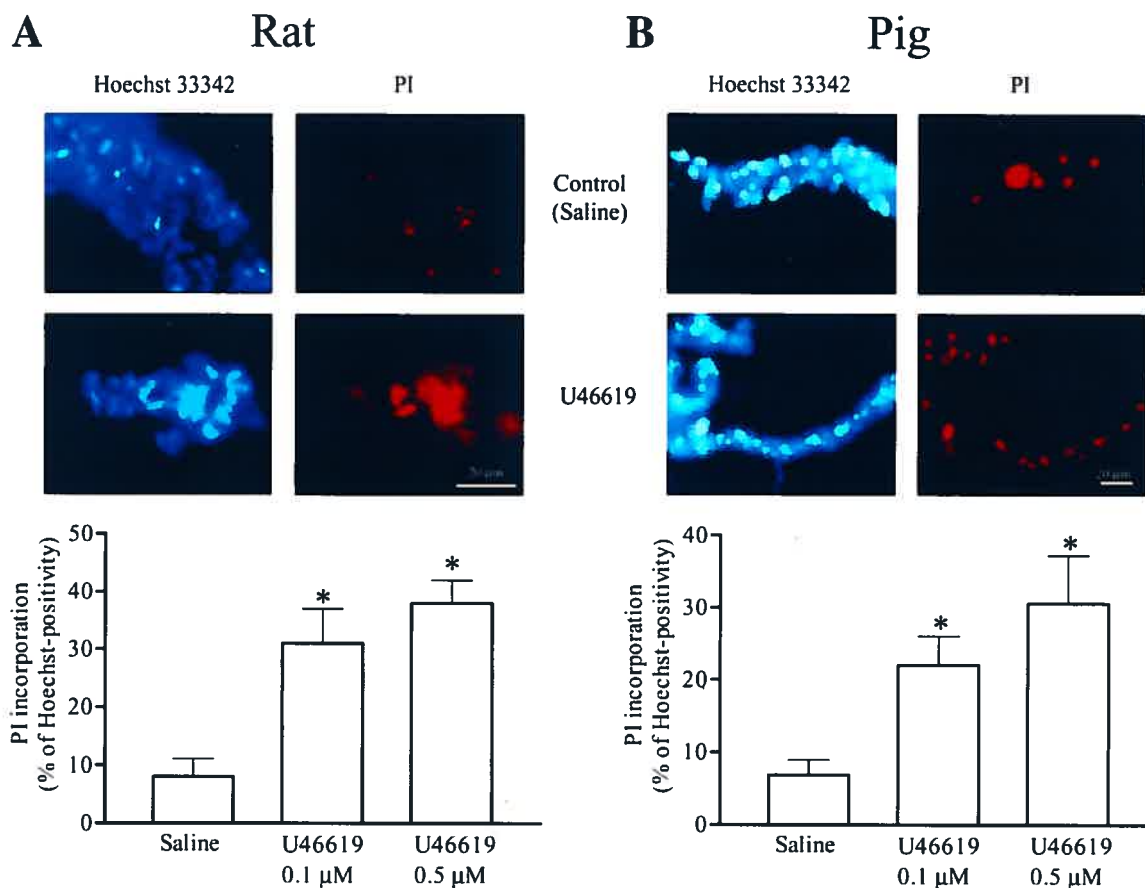


Figure 2. Cytotoxic effects of U-46619 on freshly isolated rat pup (A) and newborn pig (B) neuroretinal microvessels. Microvessels ($\leq 25 \mu\text{m}$) containing primarily endothelium (factor VIII positive and smooth muscle actin negative) from 10- to 14-day-old rats and 1- to 3-day-old piglets were incubated for 24 h with U-46619 and then stained with Hoechst 33342 (identifies all cells) and propidium iodide (PI) as described in MATERIALS AND METHODS. Staining was visualized with an immersion objective placed directly onto the culture medium using red and ultraviolet filters. Note significant incorporation of PI in microvessel cells treated with U-46619, indicating cellular membrane disruption. Scale bars represent $20 \mu\text{m}$. Values in histograms are means \pm SE of proportion of PI-positive cells (relative to all cells stained with Hoechst 33342) in 3 experiments performed in quadruplicate. * $P < 0.05$ compared with saline-treated (control) microvessels (by ANOVA and comparison among means).

Figure 3.

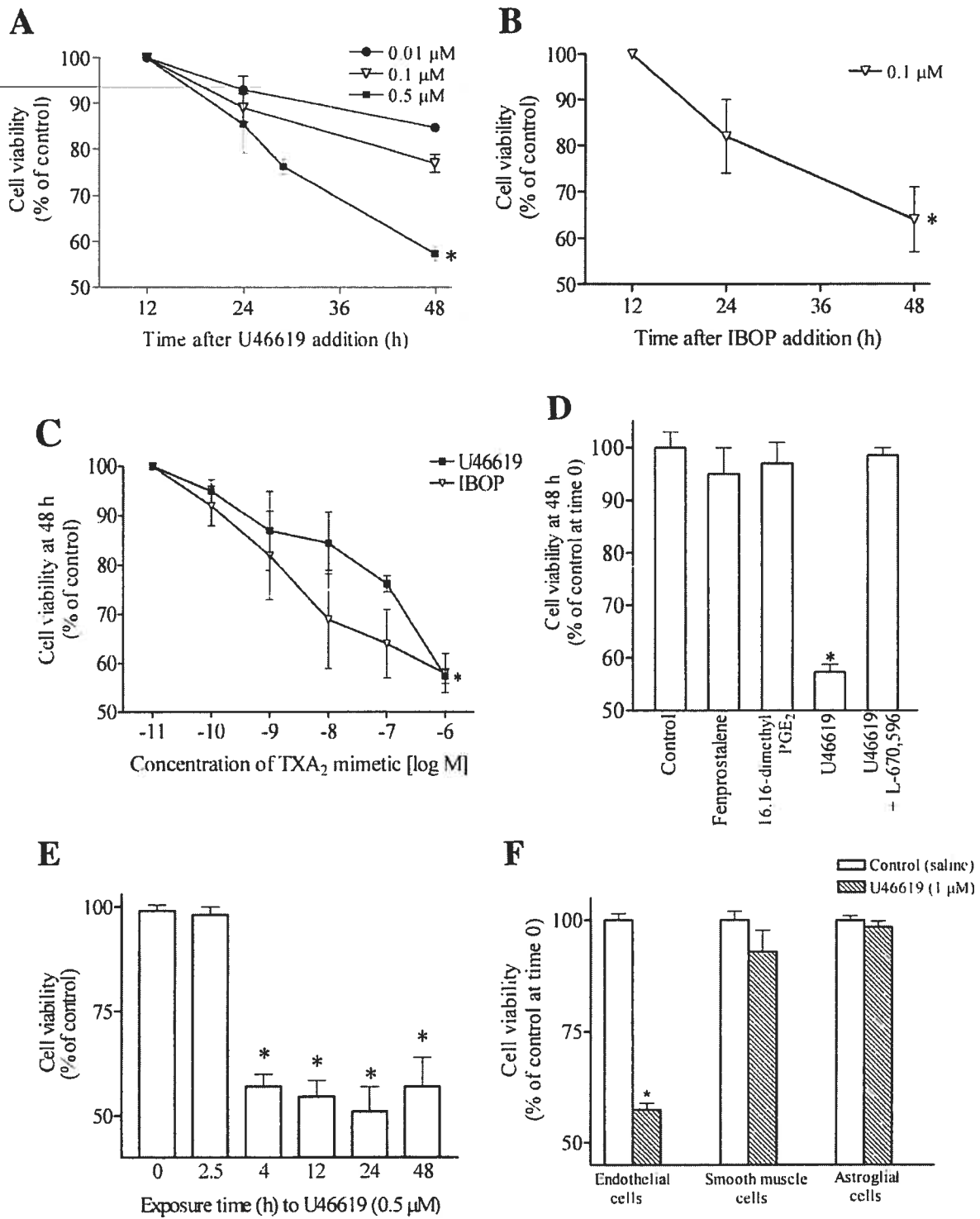


Figure 3. Time (*A* and *B*), concentration (*C*), and prostanoid dependence and cell specificity of effects of TxA_2 mimetics U-46619 (*A* and *C*) and I-BOP (*B* and *C*) on cell viability. Cultured porcine neuroretinal microvascular endothelial cells were treated with U-46619 or I-BOP, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed at 48 h, unless otherwise indicated (in *A*). Cell viability in untreated cells was $\geq 95\%$. * $P < 0.05$ compared with values at 12 h (*A* and *B*) and other concentrations of U-46619 at corresponding time as well as to 10^{-11} M TxA_2 mimetics (*C*) (1- or 2-way ANOVA factoring for time and concentrations). *D*: effects of (1 μM) contractile prostanoids fenprostalene and 16,16-dimethyl-PGE₂ and of U-46619 in presence of selective TxA_2 -receptor blocker L-670596 (0.1 μM) (22). * $P < 0.01$ compared with control (vehicle-treated) value. *E*: effects of variable exposure time to U-46619 (0.5 μM) on cell viability. Cell death was assayed at 48 h; cell death was quantified (by MTT assay) 48 h after addition of U-46619 or vehicle to media containing the cells. * $P < 0.01$ compared with control (vehicle-treated) value. *F*: effects of U-46619 (1 μM) on retinal smooth muscle and astroglial cells. * $P < 0.01$ compared with control values. Values are means \pm SE of 3-6 (*A*, *B*, *C*, *F*), 3-4 (*D*), or 4-7 (*E*) experiments, each performed in quadruplicate and expressed as percentage of control.

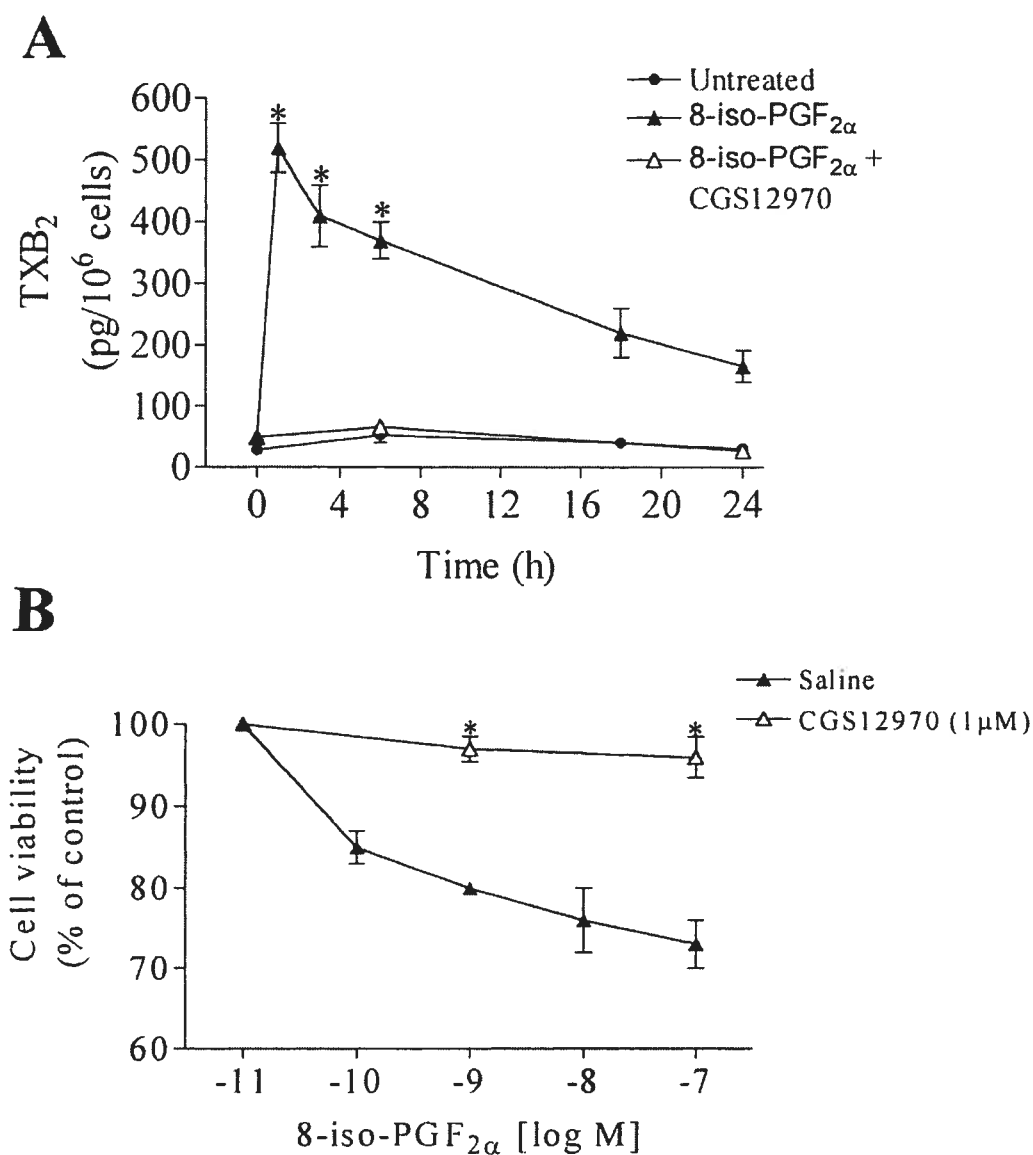


Figure 4. Effects of 8-iso-PGF_{2α} on thromboxane generation (A) and TxA₂-dependent death of retinal microvessel endothelial cells (B). Cultured endothelial cells were exposed to 8-iso-PGF_{2α} (100 nM) for 48 h. TxB₂ levels in media were measured at indicated times, and cell death was determined by MTT assay at 48 h in the absence and presence of TxA₂ synthase inhibitor CGS-12970 (1 μM). * *P* < 0.01 compared with other values at corresponding times or concentrations and to initial values (2-way ANOVA factoring for time or concentration and treatment).

Figure 5.

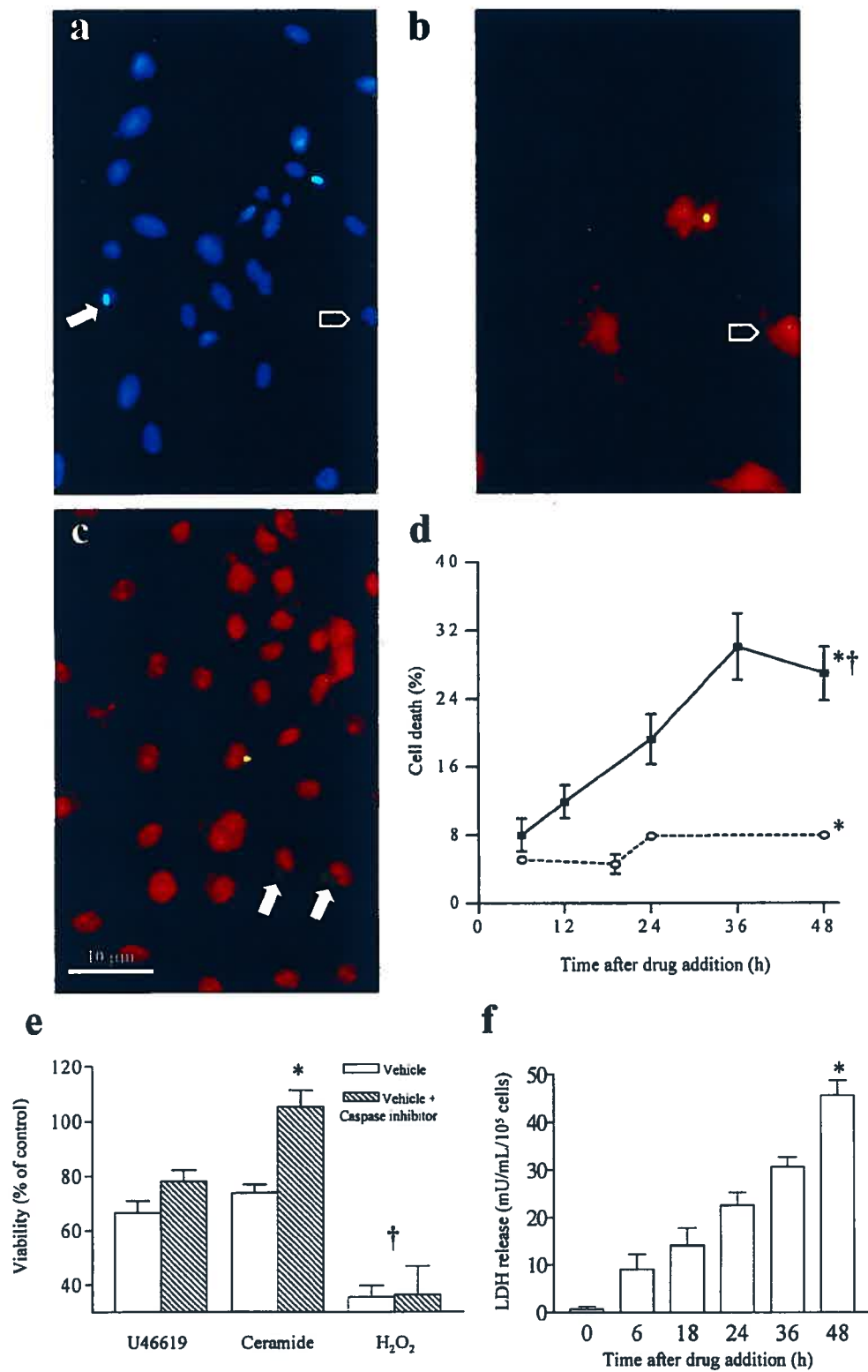


Figure 5. Effects of U-46619 on chromatin condensation, PI incorporation, DNA fragmentation, and lactate dehydrogenase (LDH) release by porcine cerebrovascular endothelial cells, and contribution of caspase in U-46619-induced cell death. *a*: Chromatin staining of cells with membrane-permeable Hoechst 33342 (identifies cells) was done 48 h after exposure to U-46619 (0.5 μ M). Solid arrow indicates few cells containing condensed chromatin (intense fluorescence). *b*: Chromatin staining of the same cells as in *a* using membrane-impermeable PI, which reflects membrane disruption, which is indicative of necrotic cell death. Open arrow points to a cell without chromatin condensation in *a* and the same cell permeable to PI in *b*. Other PI-positive cells are not indicated in *a* to avoid overcrowding. *c*: *In situ* staining of 3'OH DNA fragments [terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining] of endothelial cells exposed for 24 h to U-46619 (0.5 μ M). Note rare positively (green) stained nuclei. Scale bar represents 10 μ m. *d*: Time course of PI incorporation (■) and TUNEL-positive cells (O) exposed to U-46619 (0.5 μ M). Values are means \pm SE of percentage of cells viewed in 5 fields/coverslip on 3 separate preparations, each performed in triplicate. * $P < 0.01$ compared with basal values (1-way ANOVA); † $P < 0.01$ compared with TUNEL-positive cells. *e*: Effects of effector caspase inhibitor Z-D(OMe)-E(OMe)-V-D(OMe)-FMK (Z-DEVD-FMK) (50 μ M) on cell death induced by U-46619 (0.5 μ M), ceramide (8 μ M), or H₂O₂ (0.5 mM). Cells were preincubated (hatched bars) or not (open bars) with Z-DEVD-FMK, and viability was determined by MTT assay. Values are means \pm SE of percentage of controls of 3 separate experiments, each performed in triplicate. * $P < 0.01$ compared with ceramide alone; † $P < 0.05$ compared with other treatments. *f*: LDH activity in the endothelial cell media at different time periods after addition of U-46619 (0.5 μ M). Values are means \pm SE. * $P < 0.05$ compared with other values (1-way ANOVA).

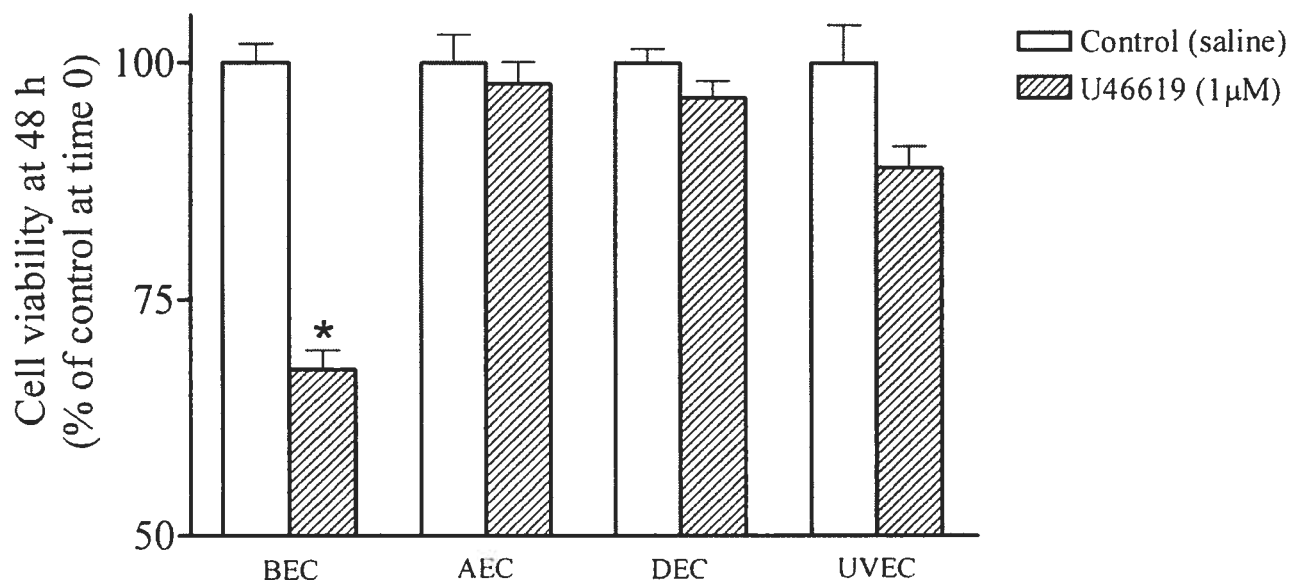


Figure 6. Effects of U-46619 on endothelial cells from different human tissues. Cells were treated with U-46619, and MTT assay was performed at 48 h. Cell viability in untreated cells was $\geq 95\%$. Values are means \pm SE of 3-5 experiments, each performed in triplicate and expressed as percentage of control. * $P < 0.01$ compared with control (vehicle-treated) value. BEC, brain; AEC, aortic; DEC, dermal; and UVEC, umbilical vein endothelial cells.

Remerciements

We thank Hendrika Fernandez for technical assistance and Les Fermes Ménard Inc. (L'Ange Gardien, Quebec) for generous supply of piglets. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, the Hospital for Sick Children Foundation, the March of Dimes Birth Defects Foundation, the Heart and Stroke Foundation of Québec, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, and National Institute of General Medical Sciences Grants GM-42056 and GM-15431. M. H. Beauchamp and X. Hou are recipients of studentship and fellowship awards, respectively, from the Research Center of Hôpital Ste-Justine; and A. M. Marrache, F. Gobeil, and S. Chemtob are recipients of studentship, fellowship, and Scientist awards, respectively, from the Medical Research Council of Canada.

Références

1. Abran, D, Varma DR, Li DY, and Chemtob S. Reduced responses of retinal vessels of the newborn pig to prostaglandins but not to thromboxane. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 168-173, 1994.
2. Allain, CC, Henson CP, Nadel MK, and Knoblesdorff AJ. Rapid single-step kinetic colorimetric assay for lactate dehydrogenase in serum. *Clin Chem* 19: 223-227, 1993.
3. Ambler, J, Butler KD, Ku EC, Maguire ED, Smith JR, and Wallis RB. CGS 12970: a novel, long acting thromboxane synthetase inhibitor. *Br J Pharmacol* 86: 497-504, 1985.
4. Arita, H, Nakano T, and Hanasaki K. Thromboxane A₂: its generation and role in platelet activation. *Prog Lipid Res* 28: 273-301, 1989.
5. Ashton, AW, Yokota R, John G, Zhao S, Suadicanani SO, Spray DC, and Ware JA.

- Inhibition of endothelial cell migration, intercellular communication, and vascular tube formation by thromboxane A_2 . *J Biol Chem* 274: 35562-35570, 1999.
6. Ashton, N. Oxygen and the growth and development of retinal vessels. In vivo and in vitro studies. The XX Francis I Proctor Lecture. *Am J Ophthalmol* 62: 412-435, 1966.
 7. Ashton, N. Some aspects of the comparative pathology of oxygen toxicity in the retina. Donders lecture, 1967. *Br J Ophthalmol* 52: 505-531, 1968.
 8. Ashton, N, and Blach R. Studies in developing retinal vessels. VIII. Effect of oxygen on the vessels of the ratling. *Br J Ophthalmol* 45: 321-340, 1961.
 9. Auge, N, Pieraggi MT, Thiers JC, Negre-Salvayre A, and Salvayre R. Proliferative and cytotoxic effects of mildly oxidized low-density lipoproteins on vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 309: 1015-1020, 1995.
 10. Berkowitz, BA. Adult and newborn rat inner retinal oxygenation during carbogen and 100% oxygen breathing. Comparison using magnetic resonance imaging delta PO_2 mapping. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 2089-2098, 1996.
 11. Bloodworth, JM, Jr, Gutgesell HP, Jr, and Engerman RL. Retinal vasculature of the pig. Light and electron microscope studies. *Exp Eye Res* 4: 174-178, 1965.
 12. Bowes, J, Piper J, and Thiemermann C. Inhibitors of the activity of poly (ADP-ribose) synthase reduce the cell death caused by hydrogen peroxide in human cardiac myoblasts. *Br J Pharmacol* 124: 1760-1766, 1998.
 13. Chakraborti, T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, and Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* 11: 77-85, 1999.
 14. Chan-Ling, T, and Stone J. Retinopathy of prematurity: origins in the architecture of the retina. *Prog Retin Eye Res* 12: 155-178, 1992.

15. Chemtob, S, Hardy P, Abran D, Li DY, Peri K, Cuzzani O, and Varma DR. Peroxide-cyclooxygenase interactions in postasphyxial changes in retinal and choroidal hemodynamics. *J Appl Physiol* 78: 2039-2046, 1995.
16. Cohen, DS, McMartin DN, Marietta MP, Zane PA, and Lappe RW. CGS 22652: a new potent thromboxane A₂ receptor antagonist with selective thromboxane A₂ synthase properties. *Cardiovasc Drug Rev* 10: 379-391, 1992.
17. D'amore, PA, and Sweet E. Effects of hyperoxia on microvascular cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 23: 123-128, 1987.
18. Daniel, TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, and Marnett LJ. Thromboxane A₂ is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 59: 4574-4577, 1999.
19. Davies, P, Smith BT, Maddalo FB, Langleben D, Tobias D, Fujiwara K, and Reid L. Characteristics of lung pericytes in culture including their growth inhibition by endothelial substrate. *Microvasc Res* 33: 300-314, 1987.
20. De la Cruz, JP, Moreno A, Ruiz-Ruiz MI, Garcia-Campos J, and Sanchez de la Cuesta F. Effect of WEB 2086-BS, an antagonist of platelet-activating factor receptors, on retinal vascularity in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 360: 37-42, 1998.
21. FitzGerald, GA, Healy C, and Daugherty J. Thromboxane A₂ biosynthesis in human disease. *Fed Proc* 46: 154-158, 1987.
22. Ford-Hutchinson, AW, Girard Y, Lord A, Jones TR, Cirino M, Evans JF, Gillard J, Hamel P, Leveille C, Masson P, The pharmacology of L-670,596, a potent and selective thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 989-993, 1989.

23. Gardner, AM, Xu FH, Fady C, Jacoby FJ, Duffey DC, Tu Y, and Lichtenstein A. Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 22: 73-83, 1997.
24. Grover, GJ, Sleph PG, and Parham C. The role of thromboxane A₂ in reperfusion injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 188: 504-508, 1988.
25. Halks-Miller, M, Henderson M, and Eng LF. Alpha tocopherol decreases lipid peroxidation, neural necrosis, and reactive gliosis in reaggregate cultures of fetal rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 45: 471-484, 1986.
26. Hanasaki, K, Nakano K, Kasai H, Kurihara H, and Arita H. Identification of thromboxane A₂ receptor in cultured vascular endothelial cells of rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 1352-1357, 1988.
27. Hannun, YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274: 1855-1859, 1996.
28. Henkind, P, and De Oliveira LF. Development of retinal vessels in the rat. *Invest Ophthalmol* 6: 520-530, 1967.
29. Hou, X, Gobeil F, Jr, Peri K, Speranza G, Marrache AM, Lachapelle P, Roberts J, 2nd, Varma DR, Chemtob S, and Ellis EF. Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F_(2t)-isoprostane (8-iso-prostaglandin F_{2α}) in immature pig periventricular brain microvessels. *Stroke* 31: 516-524, 2000.
30. Iijima, T, Sawa H, Shiokawa Y, Saito I, Ishii H, Nakamura Z, and Sankawa H. Thromboxane synthetase inhibitor ameliorates delayed neuronal death in the CA1 subfield of the hippocampus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosurg Anesthesiol* 8: 237-242, 1996.

31. Ishizuka, T, Suzuki K, Kawakami M, Hidaka T, Matsuki Y, and Nakamura H. Thromboxane A₂ receptor blockade suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression by stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 312: 367-377, 1996.
32. Kent, KC, Collins LJ, Schwerin FT, Raychowdhury MK, and Ware JA. Identification of functional PGH₂/TxA₂ receptors on human endothelial cells. *Circ Res* 72: 958-965, 1993.
33. Kitanaka, J, Hashimoto H, Sugimoto Y, Sawada M, Negishi M, Suzumura A, Marunouchi T, Ichikawa A, and Baba A. cDNA cloning of a thromboxane A₂ receptor from rat astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1265: 220-223, 1995.
34. Kondo, T, Kinouchi H, Kawase M, and Yoshimoto T. Differential release of hydrogen peroxide between astroglial cells and endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Lett* 215: 103-106, 1996.
35. Lachapelle, P, Dembinska O, Rojas LM, Benoit J, Almazan G, and Chemtob S. Persistent functional and structural retinal anomalies in newborn rats exposed to hyperoxia. *Can J Physiol Pharmacol* 77: 48-55, 1999.
36. Lahaie, I, Hardy P, Hou X, Hassessian H, Asselin P, Lachapelle P, Almazan G, Varma DR, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd, and Chemtob S. A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-iso-prostaglandin F_{2α} on retinal vessels. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 274: R1406-R1416, 1998.
37. Lemasters, JJ. Mechanisms of hepatic toxicity. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 276: G1-G6, 1999.

38. Loo, DT, and Rillema JR. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol* 57: 251-264, 1998.
39. Luty, GA, and McLeod DS. A new technique for visualization of the human retinal vasculature. *Arch Ophthalmol* 110: 267-276, 1992.
40. Matsuo, Y, Kihara T, Ikeda M, Ninomiya M, Onodera H, and Kogure K. Role of platelet-activating factor and thromboxane A₂ in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain. *Brain Res* 709: 296-302, 1996.
41. McGahon, AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, and Green DR. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol* 46: 153-185, 1995.
42. McLeod, DS, Brownstein R, and Luty GA. Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 300-311, 1996.
43. McLeod, DS, Crone SN, and Luty GA. Vasoproliferation in the neonatal dog model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1322-1333, 1996.
44. Ment, LR, Stewart WB, Petroff OA, and Duncan CC. Thromboxane synthesis inhibitor in a beagle pup model of perinatal asphyxia. *Stroke* 20: 809-814, 1989.
45. Moore, A, Donahue CJ, Bauer KD, and Mather JP. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methods Cell Biol* 57: 265-278, 1998.
46. Muruganandam, A, Herx LM, Monette R, Durkin JP, and Stanimirovic DB. Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *FASEB J* 11: 1187-1197, 1997.
47. Nandgaonkar, BN, Rotschild T, Yu K, and Higgins RD. Indomethacin improves oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Pediatr Res* 46: 184-188, 1999.

48. Niesman, MR, Johnson KA, and Penn JS. Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. *Neurochem Res* 22: 597-605, 1997.
49. Orrenius, S, McCabe MJ, Jr, and Nicotera P. Ca^{2+} -dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett* 64-65: 357-364, 1992.
50. Parys-Van Genderdeuren, R, Malcolm D, Varma DR, Aranda JV, and Chemtob S. Dissociation between prostaglandin levels and blood flow to the retina and choroid in the newborn pig after nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3378-3384, 1992.
51. Patrono, C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 330: 1287-1294, 1994.
52. Penn, JS, Tolman BL, and Bullard LE. Effect of a water-soluble vitamin E analog, trolox C, on retinal vascular development in an animal model of retinopathy of prematurity. *Free Radic Biol Med* 22: 977-984, 1997.
53. Raju, TN, Langenberg P, Bhutani V, and Quinn GE. Vitamin E prophylaxis to reduce retinopathy of prematurity: a reappraisal of published trials. *J Pediatr* 131: 844-850, 1997.
54. Reynaud, X, and Dorey CK. Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3169-3177, 1994.
55. Reynaud, X, Hansen RM, and Fulton AB. Effect of prior oxygen exposure on the electroretinographic responses of infant rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2071-2079, 1995.
56. Robert, A, Nezamis JE, Lancaster C, and Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH,

- hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* 77: 433-443, 1979.
57. Roberts, LJ, 2nd, and Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta* 1345: 121-135, 1997.
58. Siesjo, BK, Agardh CD, and Bengtsson F. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1: 165-221, 1989.
59. Simm, A, Bertsch G, Frank H, Zimmermann U, and Hoppe J. Cell of AKR-2B fibroblasts after serum removal: a process between apoptosis and necrosis. *J Cell Sci* 110: 819-828, 1997.
60. Sisson T. The effect of light and various concentrations of oxygen on the retina of the newborn pig. In: *Retinopathy of Prematurity Conference Syllabus*. Washington, DC: 1981, p. 581-599.
61. Stevens, MK, and Yaksh TL. Time course of release in vivo of PGE₂, PGF_{2α}, 6-keto-PGF_{1α}, and TXB₂ into the brain extracellular space after 15 min of complete global ischemia in the presence and absence of cyclooxygenase inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 790-798, 1988.
62. Tasman, W. Vitreoretinal changes in cicatricial retrolental fibroplasia. *Trans Am Ophthalmol Soc* 68: 548-594, 1970.
63. Thorin, E, and Shreeve SM. Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol Ther* 78: 155-166, 1998.
64. Trump, BF, and Berezesky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 9: 219-228, 1995.
65. Ushikubi, F, Aiba Y, Nakamura K, Namba T, Hirata M, Mazda O, Katsura Y, and Narumiya S. Thromboxane A₂ receptor is highly expressed in mouse immature

thymocytes and mediates DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* 178: 1825-1830, 1990.

66. Weber, TJ, Monks TJ, and Lau SS. PGE₂-mediated cytoprotection in renal epithelial cells: evidence for a pharmacologically distinct receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* 273: F507-F515, 1997.

67. Zaks, TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, and Restifo NP. Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 162: 3273-3279, 1999.

CHAPITRE 5

Le facteur d'activation plaquettaire lors de la
vaso-oblitération rétinienne: implications dans la
rétinopathie du prématuré

Platelet-activating factor in retinal vasoobliteration: implications in retinopathy of prematurity

Martin Hervé Beauchamp¹, Anne Marilise Marrache^{1,2}, Xin Hou, M.D., Ph.D.¹, Fernand Gobeil jr, Ph.D.¹, Sylvie G. Bernier, Ph.D.¹, Pierre Lachapelle, Ph.D.³, Daniel Abran, Ph.D.⁴, Christiane Quiniou, M.Sc.¹, Sonia Brault, M.Sc.^{1,2}, Krishna G. Peri, Ph.D.⁴, Jackson Roberts II, M.D.⁵, Guillermina Almazan, Ph.D.², Daya R. Varma, M.D., Ph.D.², and Sylvain Chemtob, M.D., Ph.D.^{1,2}

¹Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, Research center of Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec H3T 1C5, Departments of ²Pharmacology and Therapeutics and ³Ophthalmology, McGill University, Montréal, Québec H3G 1Y6
⁴Theratechnologies, Saint-Laurent, Québec, Canada H4S 2A4, ⁵Department of Pharmacology, Vanderbilt University, Nashville, TN 37232-6602

Running title: PAF-induced endothelial cell death

Corresponding author:

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

Department of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology

Hôpital Sainte-Justine, Research Center

3175 Ch. Côte Ste-Catherine

Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Tel: (514) 345-4729; Fax: (514) 345-4801



Keywords: endothelium, retina, necrosis, apoptosis, peroxidation

Abrégé

Purpose. To test whether platelet-activating factor (PAF) directly causes retinovascular endothelial cell (EC) death.

Methods. Retinovascular density was calculated in rat pups exposed to 80% O₂ from postnatal days (P)6 to P14 (to produce oxygen-induced retinopathy [OIR]), using the adenosine diphosphatase (ADPase) technique, in animals treated with distinct PAF receptor blockers (PCA-4248, BN52021, or THG315). PAF levels were then measured in the retinas. Viability of ECs from piglets and humans in response to C-PAF (a stable PAF analogue) was determined by the reduction of the tetrazolium salt 3-(4,5-dimethyl thiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) by viable cells, incorporation of propidium iodide (PI), TUNEL assay, and release of lactate dehydrogenase. Release of thromboxane (TX) was measured in the cell media.

Results. PAF levels in retina were markedly increased by exposure of isolated rat retinas to H₂O₂ (1 μM) and of rat pups placed in 80% O₂. Exposure to 80% O₂ induced retinal vasoobliteration, which was equally significantly inhibited (~ 60%) by all PAF receptor blockers tested. C-PAF increased incorporation of PI by isolated rat retinal microvasculature. Also, C-PAF caused time- and concentration-dependent death of cultured retinal ECs, which was prevented by the PAF receptor antagonist CV-3988. This effect of C-PAF was selective on retinal and neurovascular ECs, but not on other ECs. DNA fragmentation (TUNEL) was hardly detected, and inhibition of apoptosis-related processes by nicotinamide, cyclosporin A, and Z-DEVD-FMK and Z-VAD-FMK (caspase inhibitors) barely protected against death in EC, whereas C-PAF increased release of lactate dehydrogenase, implying that necrosis is the nature of EC death. Finally,

C-PAF-induced cell death was preceded by an increase in TXB₂ levels and was prevented by TXA₂ synthase inhibition (with CGS12970).

Conclusions. The data suggest PAF plays a major role in vasoobliteration in OIR by triggering death of neuroretinal microvascular ECs. The cell death seems to be mediated at least in part by TXA₂. These effects of PAF may participate in ischemic retinopathies such as diabetes and retinopathy of prematurity.

Introduction

Oxidant stress plays an important role in the retinal vasoobliteration associated with diabetic retinopathy,^{1,2} retinopathy of prematurity,^{3,4,5} and possibly retinitis pigmentosa.^{6,7} Oxygen-induced retinopathy (OIR) is a commonly used model of vascular cell injury, culminating in the microvascular degeneration that precedes abnormal neovascularization, which is characteristic of retinopathy of prematurity and diabetes.^{3,8,9,10,11,12} This microvascular degeneration leads to ischemia, which is thought to contribute to the structural and functional changes observed in OIR.^{13,14} Endothelial cells seem particularly susceptible to peroxidation-induced injury,¹⁵ whereas pericytes, smooth muscle cells, and perivascular astrocytes are relatively resistant.^{15,16,17,18} The mediators of oxidant stress-induced cell death are complex and not fully known.

Platelet-activating factor (PAF) is abundantly generated after oxidant stress^{19,20} and contributes to neurovascular injury, including that in the retina^{21,22,23,24} but its specific role in retinal vasoobliteration in OIR has not been demonstrated. Many of the vascular actions of PAF have been attributed to vasoconstriction and platelet aggregation.^{25,26} However, endothelial cytotoxicity in OIR occurs before platelet aggregation.^{8,12,27} In

addition, hemodynamic compromise after oxidant stress in the retina are independent of platelet aggregation.²⁸ Moreover, OIR in the young rat provides an adequate model to distinguish vascular- and platelet-induced effects, because platelets from the rat are insensitive to PAF.²⁹ Thus, it is possible that PAF also causes other effects on microvasculature, more specifically on endothelial cells.

PAF can augment effects of oxidant stress by increasing the generation of oxygen radicals.^{30,31} Moreover, PAF-acether has been found to modulate apoptosis in immature T-cell lines.³² However, direct evidence that PAF induces death of other primary cells and, especially in this context, of neuroretinal microvascular endothelial cells has never been reported. Corroboration of this inference may further our understanding of the pathogenesis of vascular degeneration in ischemic retinopathies. We therefore tested the hypothesis that PAF plays a role in the microvascular degeneration of OIR, which can be caused by direct cytotoxic action of PAF on neuroretinal microvascular endothelial cells. In addition, because PAF can stimulate the production of thromboxane (TX)A₂,^{33,34} and the latter has recently been reported to induce endothelial cytotoxicity directly,³⁵ we investigated whether PAF-induced retinovascular endothelial cell death is mediated through TXA₂. Data support our hypothesis and disclose a previously undescribed function of PAF.

Matériels et méthodes

Animals.

Newborn and adult Sprague-Dawley rats (Charles River, St.-Constant, Québec, Canada) and 1- to 3-day-old Yorkshire piglets (Fermes Ménard, L'Ange-Gardien,

Québec, Canada) were used according to a protocol of the Hôpital Sainte-Justine Animal Care Committee and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Chemicals and Materials.

THG315 was a gift from Theratechnologies, Inc. (Saint-Laurent, Québec), CGS12970 from Ciba-Geigy (Summit, NJ), and L-670596 from Merck-Frosst (Kirkland, Québec, Canada). Human brain endothelial cells were generously provided by the National Research Council of Canada (Ottawa, Ontario, Canada). The following materials were purchased: human aortic, dermal and umbilical vein endothelial cells (Clonetics, San Diego, CA); C-PAF (1-*O*-hexadecyl-2-*N*-methylcarbamyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), BN52021 (Ginkgolide B), CV-3988, and PCA-4248 (Biomol Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA); poly-L-lysine, ceramide, dimethyl sulfoxide (DMSO), nicotinamide, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), and propidium iodide (PI; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Hoechst 33342 (Polysciences, Warrington, PA); antifade reagent (Fluoroguard; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA); platelet-activating factor scintillation proximity assay kit (Amersham, Oakville, Ontario, Canada); antibodies to factor VIII, smooth muscle-specific actin, and glial fibrillary acetic protein (GFAP; Dako, Carpinteria, CA); FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA); PAF receptor antibody (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI); a direct fluorescein kit (Apoptag; Intergen, Gaithersburg, MD); Z-DEVD-FMK and Z-VAD-FMK (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN); Hamilton syringe (Hamilton Co., Reno, NV); annexin-V-FITC kit

(Biosource, Camarillo, CA); 1-*O*-octadecyl,[octadecyl-9,10-³H(*N*)]-2-acetyl-*sn*-glyceryl-3-phosphorylcholine (specific activity: 160 Ci/mmol; NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA); other materials were purchased from Fisher Scientific (Montréal, Québec, Canada).

Intravitreal Injections.

Retinovascular degeneration was studied in rat pups as reported.^{13,36,37} Briefly, rats were placed in an 80% ± 5% oxygen environment from postnatal days (P)6 to P9. Control animals were maintained in room air (21% O₂). Time of exposure to hyperoxia was chosen according to maximum susceptibility of vasculature to oxidant stress,³⁸ to allow testing of the effect of hyperoxia on degeneration of existing vessels.^{3,11} Molecularly distinct PAF antagonists were used to ascertain effects: PCA-4248, a derivative from dihydropyridine antagonists devoid of calcium channel antagonist activity; THG315, a protease-resistant peptidomimetic noncompetitive antagonist of PAF receptor; and BN52021 (Ginkgolide B), a widely used PAF antagonist.³⁹ On P6 to P8, pups were first anesthetized with intraperitoneal injection of a ketamine (100 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) solution delivered in a volume of 50 μL with a 30-gauge 2.5-cm needle on a 100-μL syringe (Hamilton, Reno, NV). PCA-4248,³⁹ BN52021,²³ or THG315 (EC₅₀, 50 nM) were then injected in a volume of 0.5 μL (within 10 to 15 seconds) once daily into the vitreous (in proximity with the optic nerve) of one eye to achieve estimated concentrations of 1 μM, and isotonic saline was administered in the contralateral eye. A 34-gauge 1-cm needle fixed to a 1-μL syringe (Hamilton) mounted on a micromanipulator was used, and eye volume was estimated at approximately 35 μL,

based on spheric volume calculation of nasotemporal equatorial diameter and volume-to-weight ratio determination,^{40,41} both of which were in concordance. Retinal vascularity was assessed on P9, by the adenosine diphosphatase (ADPase) histochemical technique,⁴² as previously described by us.¹³ Retinas were photographed (DMC Ie; Polaroid Corp., Cambridge, MA), and vascular density was determined on computer (Image-Pro Plus, ver. 4.1; Media Cybernetics, Silver Spring, MD) as reported.³⁵

Oxygen-Induced Retinopathy.

To assess more fully the role of PAF in vasoobliteration in OIR, rat pups were maintained in an 80% ± 5% O₂ environment from P5 to P14, when normal retinal vasculature reaches the periphery,⁴³ as we¹³ and others^{4,5,10} have described. Control animals were maintained in room air (21% O₂). Furthermore, the involvement of PAF and efficacy of PAF receptor antagonists was studied after systemic administration. Pups were randomly assigned to receive, throughout the study period, intraperitoneal injections of 50 μL DMSO (vehicle) or effective doses^{44,45} of PAF receptor antagonist BN52021 (2 mg/kg per day). Animals were killed on day 15 and retinal flatmounts prepared for ADPase staining.^{13,42} Retinas were photographed and vascular density calculated as described. Vascular density in study groups was compared with that in untreated animals raised in 21% O₂, for which values were set at 100%.

Isolation of Microvessels from Retina.

Neuroretinal microvessels from rats (10–14 days of age) and piglets were isolated as previously reported.⁴⁶ Isolated microvessels were dispersed in Hanks' balanced salt

solution (HBSS) and filtered twice through 70- μ m nylon mesh to obtain mostly capillaries. The filtrate predominantly contained endothelium, because these small microvessels were immunoreactive to factor VIII but not to smooth muscle-specific actin.⁴⁶ Freshly isolated microvessels were incubated on poly-L-lysine-coated glass coverslips overnight in endothelium growth media exposed to the PAF-stable analogue C-PAF (100 nM) with or without CV-3988 (1 μ M), a PAF structural analogue showing specific PAF receptor antagonist activity.³⁹ Cell death was assessed by using membrane-impermeable and -permeable DNA-binding dyes—respectively, propidium iodide (PI) and Hoechst 33342.^{47,48} Hoechst 33342 identifies all cells, and PI is incorporated into the cell if the membrane is disrupted (as in dying cells). Microvessels were loaded for 10 minutes at 37°C with PI and Hoechst 33342 (1 μ g/mL and 5 μ g/mL, respectively) and visualized (200x) with red and ultraviolet filters. Images were acquired with a digital camera (Spot RT Slider; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) attached to a microscope (Axioskop 2; Zeiss, Oberkochen, Germany). To enhance reproducibility, cells were counted only in microvessels containing more than 20 endothelial cells.

Cell Culture.

To investigate whether C-PAF-induced neuroretinal cytotoxicity occurs in other species, the effects of C-PAF were also tested on neuroretinal microvessels from pigs. Of relevance, oxygen distribution in the pig retina⁴⁹ resembles that in the rat retina⁵⁰ and, more important, in retinas of higher mammals including primates.⁵¹ Moreover, retinal structures and vascular development in the pig share similar characteristics with those of humans.⁵² Hence, because the C-PAF-induced proportion of cell death in neuroretinal

microvessels of rats and pigs was similar (see Fig. 3), and because a large number of rat pup retinas would be required to isolate microvessels for culture of endothelial cells, we used microvessels from retinas of piglets (1–2 days of age) to culture endothelial cells, as described.^{46,53}

Microvessels were placed in culture flasks with EGM-2 MV in a selective endothelial growth medium containing the following growth factors (0.1% human epithelial growth factor [hEGF], 0.04% hydrocortisone, 5% fetal bovine serum [FBS], 0.1% vascular endothelial growth factor [VEGF], 0.4% hFGF-B [with heparin], 0.1% R3-IGF-1, 0.1% ascorbic acid, 0.1% heparin 0.1%, 0.1% GA-1000; Clonetics, Palo Alto, CA) to promote endothelial cell growth.³⁵ Cells were grown in 12-well plates, trypsinized, and subcultured. Cell viability was verified by trypan blue exclusion and was 95% or more. Endothelial cells were identified by structural phenotype, positive reactivity to factor VIII, and negative reactivity to smooth muscle-specific actin GFAP. In addition, pericytes were cultured from retinal microvessels, as described,⁵⁴ in DMEM containing 20% fetal calf serum, which promotes pericyte proliferation but not that of endothelial cells. Pericytes were identified by characteristic elongated stellate morphology, positive reactivity to smooth muscle-specific actin and negative reactivity to factor VIII.

To further investigate species independence and endothelial cell-type cytotoxicity to PAF, the effects of the latter were tested on endothelial cells from different tissues of humans. The effects of C-PAF were also tested on human endothelial cells from adult brain⁵⁵ and on human endothelial cells from aorta, umbilical vein, and dermis microvessels.

Cell Viability Assays.

Cells (5–15 passages) at approximately 80% confluence were reseeded in DMEM (without fetal calf serum) for 18 to 24 hours (to synchronize the cell cycle) and then incubated for up to 48 hours with the stable specific PAF mimetic C-PAF or the TXA₂ mimetics U46619 or I-BOP. In some experiments the PAF receptor antagonist CV-3988 (1 μM)⁵⁶ or the TXA₂ synthase inhibitor CGS12970 (1 μM)⁵⁷ was added 60 minutes before treatment with C-PAF. Cell viability was estimated by mitochondrial-dependent reduction of 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)⁵⁸ in wells containing approximately 60,000 cells. At the end of the experiment, MTT (0.5 mg/mL in PBS [pH 7.2]) was incubated with cells for 2 hours at 37°C. The medium was then drained and formazan product solubilized with acidified (40 mM HCl) isopropanol and optical density measured at 600 nm.

Characterization of the nature of cell death (necrosis or apoptosis) was studied using membrane-impermeable and -permeable DNA-binding dyes, PI and Hoechst 33342, respectively.^{47,48} Contribution of apoptosis in cell death was further studied by inhibition of major effector caspase-6 and -9 as well as -1, -2, and -3 using Z-DEVD-FMK or Z-VAD-FMK (10–50 μM).^{35,59} Caspase inhibitors were added to cultured retinovascular endothelial cells 1 hour before addition of either C-PAF (100 nM), the known apoptosis-inducing ceramide (8 μM)⁶⁰ or non-apoptosis-inducing concentrations of H₂O₂ (0.5 mM)⁶¹ for 48 hours. The contribution of apoptosis was further studied by determining the inhibition of apoptosis-involved poly-ADP-ribose-polymerase (PARP) and cyclophilin D (in the mitochondrial transition pore) with nicotinamide (1–100 nM) and cyclosporin A (100 nM), respectively.^{62,63} Cell viability was assessed by MTT assay.

Measurement of DNA Fragmentation and Lactate Dehydrogenase.

DNA fragmentation was determined by a TUNEL-based technique, with a commercial kit (Apoptag; Intergen). Endothelial cells were grown on coverslips and treated with C-PAF (100 nM) for different time periods. Cells were washed twice with cold PBS, fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 10 minutes, washed twice in PBS, and postfixed in ethanol and acetic acid (2:1) for 5 minutes at -20°C. After washing, cells were incubated with terminal transferase and FITC-conjugated dUTP for 1 hour at 37°C in a humid chamber. The reaction was stopped by incubation with buffer from the kit (Stop/Wash) for 10 minutes at room temperature. Nuclei were counterstained with PI, washed and mounted (Immu-mount, Shandon, Pittsburgh, PA). Cells were visualized under a fluorescence microscope.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured spectrophotometrically at 340 nm as follows.⁶⁴ Briefly, 800 μ L of reaction medium (Tris-HCl 80 mM, NaCl 200 mM, NADH 0.2 mM) was added to 200 μ L of the culture medium in a spectrophotometer cuvette. The reaction was started by adding 1.5 mM pyruvate (final). The LDH content was calculated as $(\Delta\text{optical density}/\Delta\text{time [in minutes]}) \times 9682 = \text{units LDH/volume}$.⁶⁴

Flow Cytometry Detection of Annexin V Binding.

Loss of phospholipid asymmetry at the plasma membrane resulting in exposure of phosphatidylserine residues on the outer leaflet is often used as a marker of apoptosis, but cell surface exposure of phosphatidylserine groups detected by annexin V binding can also be associated with necrosis.⁶⁵ Annexin V binding was determined on cells incubated with PAF (10^{-7} M) or ceramide (8 μ M) for 6 and 24 hours. Concomitant PI staining,

clearly reflective of necrosis, was also studied. Cells were collected with trypsin, washed twice with PBS buffer (pH 7.4), and stained with the annexin-V-FITC kit, according to the manufacturer's instructions. Intensity of fluorescence was monitored (annexin V: excitation 488 nm, emission 527 nm; incorporation of PI: excitation 488 nm, emission 599 nm) with a flow cytometer (FACScan; BD Biosciences, Lincoln Park, NJ); data were analyzed using the accompanying software (CellQuest; BD Biosciences).

PAF and TX Assays.

PAF (1-*O*-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (C16:0/C18:0 PAF) was measured from isolated retinas of 10-day-old rats exposed to 1 μ M H₂O₂ for 10 minutes and from isolated retinas from 10-day-old animals exposed to hyperoxia from P6 to P9, after extraction on octadecylsilyl silica columns, and quantified with the scintillation proximity assay (SPA)⁶⁶ kit. Cross-reactivity of the antibody for other structurally related lipids was less than 0.06% (lyso-PAF <0,01%) and interassay variability less than 5%.

TXB₂ (stable TXA₂ metabolite) formation by endothelial cells exposed to PAF was measured by radioimmunoassay after extraction on octadecylsilyl silica columns, as described.³⁵

Western Blot Analysis of PAF Receptor.

Western blot analysis of PAF receptors was performed on rat retinas (100 μ g protein), as described.⁶⁷ After an overnight incubation with the polyclonal anti-PAF

receptor antibody (1:5000), immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL), according to the manufacturer's instructions.

[³H]PAF Binding.

Saturation [³H]PAF binding was performed as previously reported.⁶⁸ Briefly, 1-*O*-octadecyl,[octadecyl-9,10-³H(N)]-2-acetyl-*sn*-glyceryl-3-phosphorylcholine (specific activity: 160 Ci/mmol; NEN Life Science Products, Inc.) was used as a labeled ligand and 10 μM unlabeled C-PAF, the nonmetabolizable form of PAF,⁶⁹ was used for assessing nonspecific binding. Saturation binding was initiated by adding (10⁶) endothelial cells to 100 μL incubation mixture for 30 minutes at 25°C. Reaction was stopped with cold 10 mM Tris-HCl buffer and samples filtered through glass microfiber filters (GF/B; Whatman, Maidstone, UK). Receptor density (B_{max}) was determined with by computer (Prism software; GraphPad, San Diego, CA).

Statistical Analysis.

Data were analyzed by one- or two-way ANOVA, factoring for treatments, followed by the Tukey-Kramer method for comparison among means. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Values are presented as the mean ± SEM.

Résultats

PAF Levels and PAF Receptor Expression in Response to Oxidant Stress.

Exposure of isolated retinas from 10 day-old rats to H₂O₂ (1 μM) for 10 minutes caused a 10-fold increase in PAF levels. Similarly, PAF levels in retinas of rat pups

exposed to 80% O₂ from P6 to P9 were significantly higher than in retinas of pups exposed to 21% O₂ (Fig. 1A) . In contrast, PAF receptor expression in retinas from 9-day-old rats exposed to hyperoxia from P6 to P9 did not differ from that in normoxia-raised animals (Fig. 1B).

Effects of Intravitreal Injections of PAF Receptor Antagonists on Retinal Vascular Density of Hyperoxia-Exposed Rats.

Rat pup retinas subjected to hyperoxia (80% ± 5% O₂) from P6 to P9 exhibited decreased vascular density (Fig. 1D) . Injection of the PAF receptor antagonists PCA-4248, BN52021, or THG315 into the vitreous (proximity of optic nerve) of one eye caused equivalent and significant preservation of microvascular density relative to the contralateral eye injected with an equivalent volume of saline (Fig. 1C 1D) . Intravitreal injection of saline did not affect ocular microvasculature, which was similar to that of the untreated contralateral eye. In addition, control animals (21% O₂) injected with the same doses and volumes of PCA-4248, BN52021, or THG315 also did not exhibit changes in vascular density.

Effects of Systemic PAF Antagonists in Vasoobliteration in OIR.

As expected,^{8,11,27,43} control animals treated with vehicle (DMSO) exhibited a fully vascularized retina at 15 days of age. Hyperoxia induced retinal vasoobliteration (Fig. 2) which was markedly attenuated by the systemically administered PAF receptor antagonist BN52021, as seen with intravitreal injections; BN52021 did not affect retinal vessel density of control rats maintained at 21% O₂.

Effects of C-PAF on Isolated Retinal Microvessels.

Effects of C-PAF on microvascular cell death was tested directly on retinal microvessels ($\leq 30 \mu\text{m}$) containing primarily endothelial cells (factor VIII-positive and smooth muscle actin-negative). C-PAF (100 nM) increased incorporation of PI in rat retinal microvasculature indicative of cell death (Fig. 3). The proportion of PI-positive cells relative to all cells (which stain to Hoechst 33342) was significantly augmented by C-PAF. C-PAF also increased incorporation of PI in newborn pig retinal microvessels. In both cases, incorporation of PI was prevented by the PAF receptor antagonist CV-3988 (Fig. 3), suggesting a species-independent effect of PAF on retinal microvascular degeneration.

Effects of PAF on Viability of Retinovascular Endothelial Cells.

Effects of PAF were tested directly on retinovascular endothelial cells. For reasons described in the Methods section, cells arose from piglet retinal microvasculature. C-PAF caused concentration- and time-dependent (Fig. 4) death of retinovascular endothelial cells in culture (as reflected by a decrease in MTT); EC_{50} for C-PAF was approximately 50 pM (at 48 hours). Selective PAF receptor antagonist CV-3988 prevented C-PAF-induced endothelial cell death (Fig. 4C).

Effects of PAF on Endothelial Cells in Human Tissues Humans and on Pericytes.

Effects of PAF mimetic C-PAF were also tested on endothelial cells from adult human brain,⁵⁵ aorta, dermis, and umbilical vein. C-PAF (100 nM) caused death of

endothelial cells from brain but not from aorta, umbilical vein, or dermis microvessels (Fig. 4D) , demonstrating tissue-specific selectivity to PAF-evoked toxicity. Tissue-specific endothelial cell vulnerability to PAF seemed independent of receptor density, because PAF receptor density was comparable in brain and umbilical vein endothelial cells (respectively, 115 ± 48 and 89 ± 37 fmol/mg protein). Porcine retinal pericytes were also marginally affected by C-PAF (Fig. 4D).

Nature of Retinovascular Endothelial Cell Death in response to PAF.

The decrease in MTT in retinovascular endothelial cells (Fig. 4) was consistent with a corresponding increase in incorporation of PI (Figs. 3,5B) . The proportion of TUNEL-positive cells (Figs. 5A,5B ; indicative of apoptosis) was 7% or less during 48 hours of exposure to C-PAF (100 nM). C-PAF caused an increase in both binding of annexin V and incorporation of PI, whereas only binding of annexin V was detected with apoptosis-inducing ceramide⁶⁰ (Fig. 5C) . Binding of annexin V was also observed with necrosis.⁶⁵ Inhibition of apoptosis-related PARP with nicotinamide (5 nM)⁶² and cyclophilin D with cyclosporin A (100 nM)⁶³ did not reduce C-PAF-elicited cell death (Fig. 5D) . Similarly, the caspase inhibitors Z-DEVD-FMK or Z-VAD-FMK (50 μ M) did not reduce C-PAF-triggered cell death, whereas cell death induced by apoptosis-evoking ceramide⁶⁰ was fully prevented by Z-DEVD-FMK and Z-VAD-FMK. Cell death induced by H₂O₂ (0.5 μ M)⁶¹ was unaffected (Fig. 5E) . In contrast, LDH release in response to C-PAF (indicative of necrosis) increased in a time-dependent manner (Fig. 5F).

Role of TXA₂ in PAF-Evoked Retinovascular Endothelial Cell Death.

Because PAF can elicit formation of TXA₂^{33,34} and TXA₂ can induce endothelial cytotoxicity,³⁵ we tested whether PAF-evoked retinovascular endothelial cell death is TXA₂ dependent. Stimulation of porcine retinal endothelial cells for 6 hours with C-PAF caused an increase in TXB₂ levels (Fig. 6A). C-PAF-induced cell death, in cultured cells as well as in retinal microvessels, was significantly attenuated by TXA₂ synthase inhibitor CGS12970 (Figs. 3C,6B). Similar to C-PAF TXA₂ mimetics U46619 and I-BOP caused cell death (Fig. 6C), as recently documented.³⁵

Discussion

Microvascular degeneration is a major feature of OIR,^{3,8,9,10,11,12} a model that shares features with retinopathy of prematurity^{3,11,12,27} as well as of diabetes. The mechanisms responsible for microvascular degeneration in OIR are mostly unknown. In the present study, we investigated whether PAF plays a role in retinal microvascular obliteration in OIR. Because this appeared to be the case, we determined whether vasoobliteration is a direct consequence of PAF-induced endothelial cell death.

An important role for PAF in retinal vasoobliteration in OIR is suggested by the relative preservation of microvasculature (ADPase-positive)⁴² by molecularly distinct PAF receptor blockers PCA-4248, BN52021, and THG315 (Figs. 1,2). Although ADPase is particularly localized in endothelium, it can also be found in pericytes and smooth muscle cells⁴²; however, induction of cell death by C-PAF was hardly detected in smooth muscle cells (data not shown), suggesting that the loss of vascular staining in OIR is either consistent with the requirement of endothelium and/or involvement of separate

factors for pericyte survival.⁷⁰ Also, because oxidant stress contributes to the retinal vasoobliteration in OIR,^{4,5} it can be argued that PAF receptor antagonists may elicit their protective effects through their antioxidant properties, as suggested for BN52021,⁷¹ but this is not the case for CV-3988, THG315, and PCA-4248.³⁹ Overall, because PAF is abundantly generated during oxidant stress,^{19,20} because it contributes to the latter by itself augmenting the generation of oxygen radical species,^{30,31} and because inhibition of its effects prevent neurovascular injury^{21,22,23,24} (present study: Figs. 1,2), PAF seems to mediate, at least in part, the effects of oxidant stress.^{20,72,73}

On the basis of its known properties PAF can contribute to vasoobliteration, notably through platelet aggregation and vasoconstriction.²⁴ However, studies of oxidant stress on impaired ocular hemodynamics²⁸ reveal an early endothelial cytotoxicity independent of platelet aggregation,^{3,8,9,11,27,28} although this can be detected later.⁹ Furthermore, the degree of retinal vasoconstriction evoked by PAF (~25% of basal diameter)⁷⁴ is unlikely to result in vasoobliteration as supported by known effects of other retinal vasoconstrictors such as prostaglandin (PG)F₂ α and PGE₂, which are released under oxidant stresses²⁸ but do not cause cell death.³⁵ It can be inferred that the role of PAF in retinal vasoobliteration (Figs. 1,2) is mediated by other mechanisms.

Indeed, a major finding of this study is the direct and relatively selective PAF-induced cytotoxicity to retinovascular endothelial cells (Fig. 4) . This toxicity evoked by PAF was not only observed in vitro on cultured endothelial cells (Figs. 4,5) but also ex vivo on freshly isolated retinal microvessels (<30 μ m, mostly endothelial cells) of distinct species (Fig. 3) . The specificity of this effect was further substantiated by prevention with PAF receptor antagonists (Fig. 4C) . Of interest, the toxic effects of PAF on

endothelial cells were tissue specific, so that C-PAF caused death of neurovascular endothelial cells, whereas dermal, aortic, and umbilical endothelial cells, and retinal pericytes were barely affected (Fig. 4D) . Although different vasomotor effects of PAF have been described, such as dilatation of renal vessels⁷⁵ and constriction of brain pial vasculature,⁷⁶ to our knowledge this is the first report to describe a selective endothelial cytotoxicity of PAF. The increased vulnerability of retinovascular endothelial cells to PAF cannot simply be explained by a limited expression of PAF receptors in the other cell types tested,²⁴ —as shown, for instance, by the similar PAF receptor density in retinovascular and umbilical vein endothelial cells. The heterogeneous nature of endothelium such as in the glomerulus and brain is likely to contribute to differences in susceptibility to PAF.⁷⁷ Altogether, our data strongly suggest that PAF is cytotoxic to neuroretinal microvascular endothelium, which may directly contribute to the retinal vasoobliteration in OIR (Figs. 1,2).

Retinovascular endothelial cell death induced by C-PAF does not seem to be primarily due to apoptosis. The proportion of DNA fragmentation (TUNEL positivity) was never greater than 6% throughout the 48-hour period of exposure to PAF. Similarly, despite binding of annexin V after 6 and 24 hours of treatment with PAF, an increase in PI was also observed at 6 hours—accordingly, annexin V binding was also detected in necrotic cell death.⁶⁵ In addition, PARP and cyclophilin D inhibitors, nicotinamide and cyclosporin A, respectively,^{62,63} were also ineffective (Fig. 5D) . Furthermore, inhibitors of major effector caspases did not prevent or diminish PAF-induced cell death (Fig. 5E) . In contrast, C-PAF caused a time-dependent increase in release of LDH, suggestive of necrosis (Fig. 5F) . Nonetheless, because of the relatively long lag time (24 hours)

between PAF treatment and detection of cell death (Fig. 4B) , one cannot totally exclude a form of cell death intermediate between apoptosis and necrosis, which has been termed necrapoptosis, as proposed for other cells.^{78,79}

We began to assess the mechanisms for PAF-induced cytotoxicity of neuroretinovascular endothelial cells, which unveils a significant role for TXA₂ (Fig. 6) . TXA₂ has recently been reported to elicit selective neuroretinal endothelial cell death, which, similar to that induced by PAF, seems to be mostly necrotic.³⁵ TXA₂ also contributes to the retinal vasoobliteration in OIR. The precise mode of action of TXA₂ in this process remains to be clearly identified. Cellular mobilization and incorporation of calcium has often been reported to be essential important in both necrotic and apoptotic cell death processes.^{80,81} PAF as well as TXA₂ are strong stimulants of cellular calcium mobilization.^{24,44,82} Increases in cellular calcium can activate specific phospholipases and proteases, disrupt mitochondrial permeability transition pores resulting in arrest in adenosine triphosphate (ATP) production, and stimulate the generation of reactive oxygen species,^{80,81} which can in turn sustain a cytotoxic cycle.⁸³ The precise mechanisms of PAF- and TXA₂-induced neuroretinovascular endothelial cytotoxicity are being investigated.

In conclusion, this study identifies for the first time an important role for PAF in the retinal microvascular degeneration of OIR. In addition, PAF may contribute in this process of neuroretinovascular degeneration through a previously undescribed function, specifically by directly inducing endothelial cell death (Figs. 3,4,5,6) . We speculate that PAF-induced microvascular endothelial degeneration could contribute to the pathogenesis

of ROP, other ischemic retinopathies such as in diabetes,⁸⁴ and perhaps ischemic encephalopathies.²³

Figures

Figure 1.

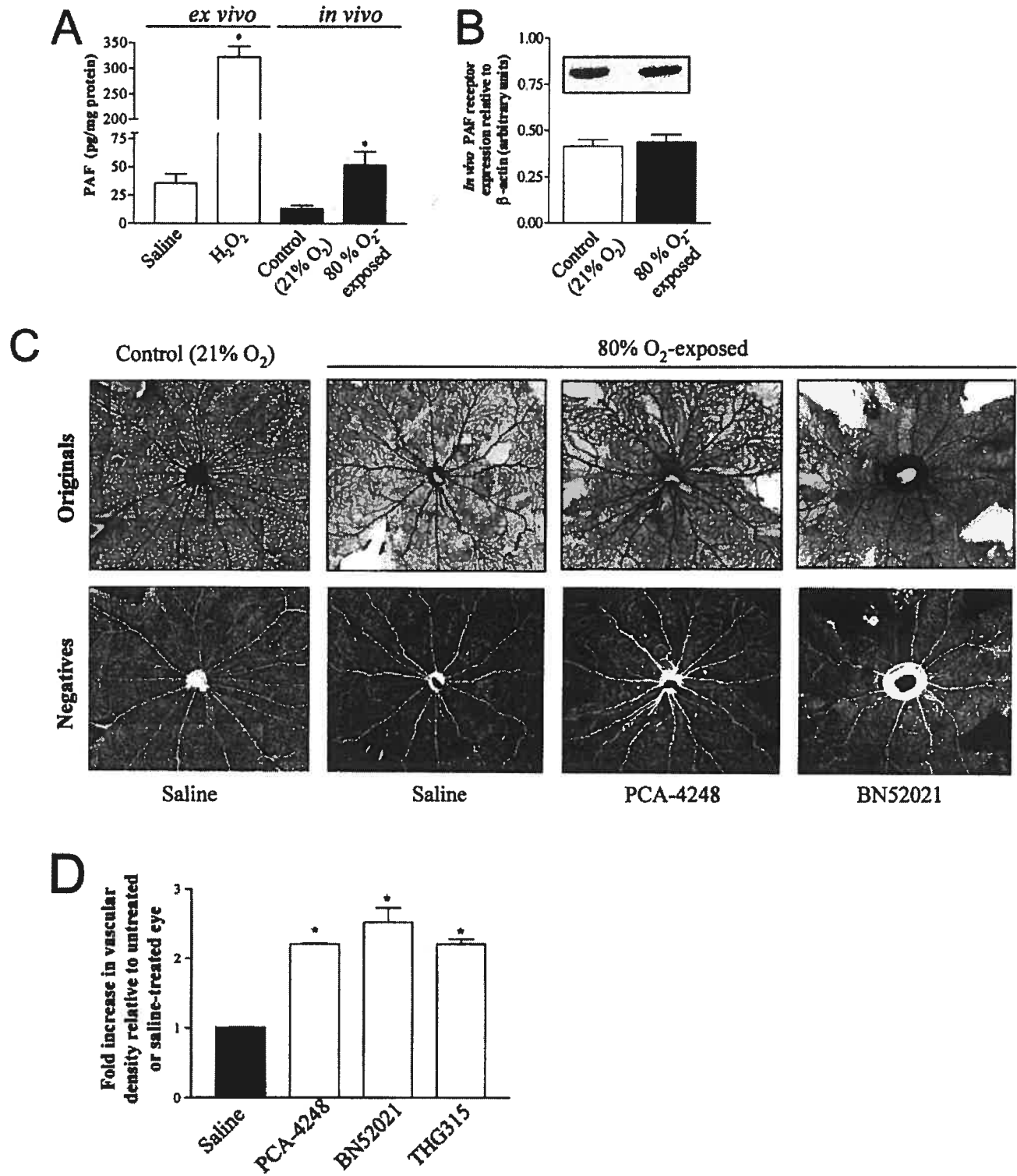


Figure 1. Effects of H₂O₂ and hyperoxia on PAF levels (**A**) and of PAF receptor antagonists on hyperoxia-induced changes in retinal vascular density (**B**). (**A**, □) Concentrations of isolated retinas from 10-day-old rats treated for 10 minutes with 1 μM H₂O₂; (■) PAF levels in retinas of rat pups subjected to normoxia (21% O₂) or hyperoxia (80% O₂) from P6 to P9. (**B**) PAF receptor immunoreactivity; representative Western blot (*boxed inset*). (**C**) Representative retinal flatmounts of 9-day-old rat pups exposed to normoxia (21% O₂) or hyperoxia, as described in (**A**), untreated or treated intravitreally with PAF receptor antagonists (PCA-4248, BN52021, or THG315). (**D**) Relative changes in vascular density of retinas treated in (**C**). Data are the mean ± SEM of results from 3 to 5 retinas (**A**, **B**) and 5 to 16 retinas (**D**); **P* < 0.01 compared with all other PAF concentrations. Magnification: (**C**) x35.

Figure 2.

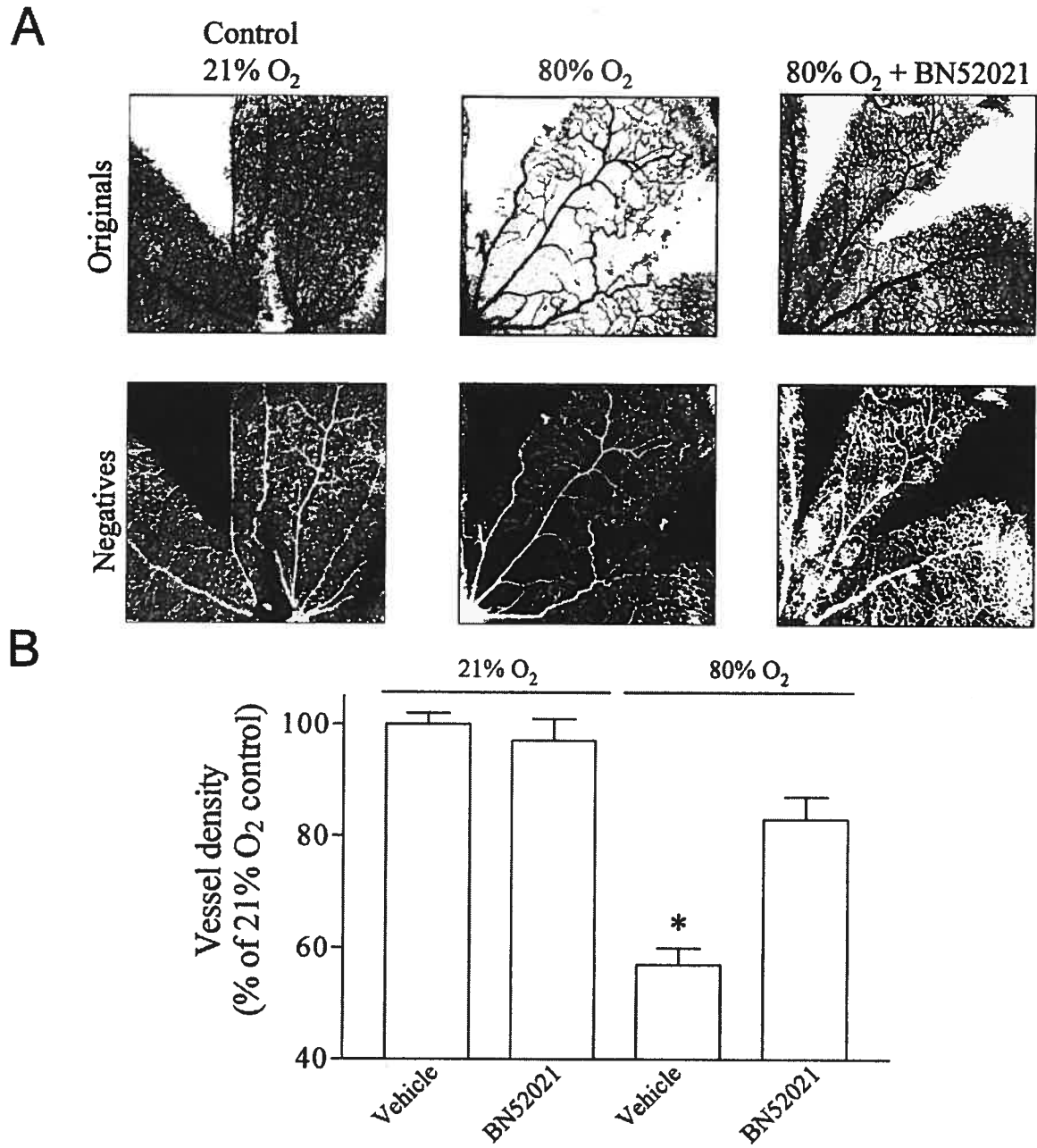


Figure 2. (A) Effects of systemically administered PAF receptor antagonist BN52021 on retinal vasoobliteration induced by exposure of rats to room air or 80% O₂ from P5 to P14. Pups were injected intraperitoneally throughout exposure to hyperoxia either with 50 μ L DMSO (vehicle) or BN52021 (2 mg/kg per day). Rats were killed on day 15 and retinal flatmounts stained for ADPase. (B) Vascular density was calculated for the total retinal surface and results presented relative to density in untreated animals maintained in room air (21% O₂). Data in are the mean \pm SEM results in of four to five retinas; **P* < 0.01 compared with all other data. Original and negative photomicrographs were magnified to display the microvasculature clearly. Scale bar, 500 μ m.

Figure 3.

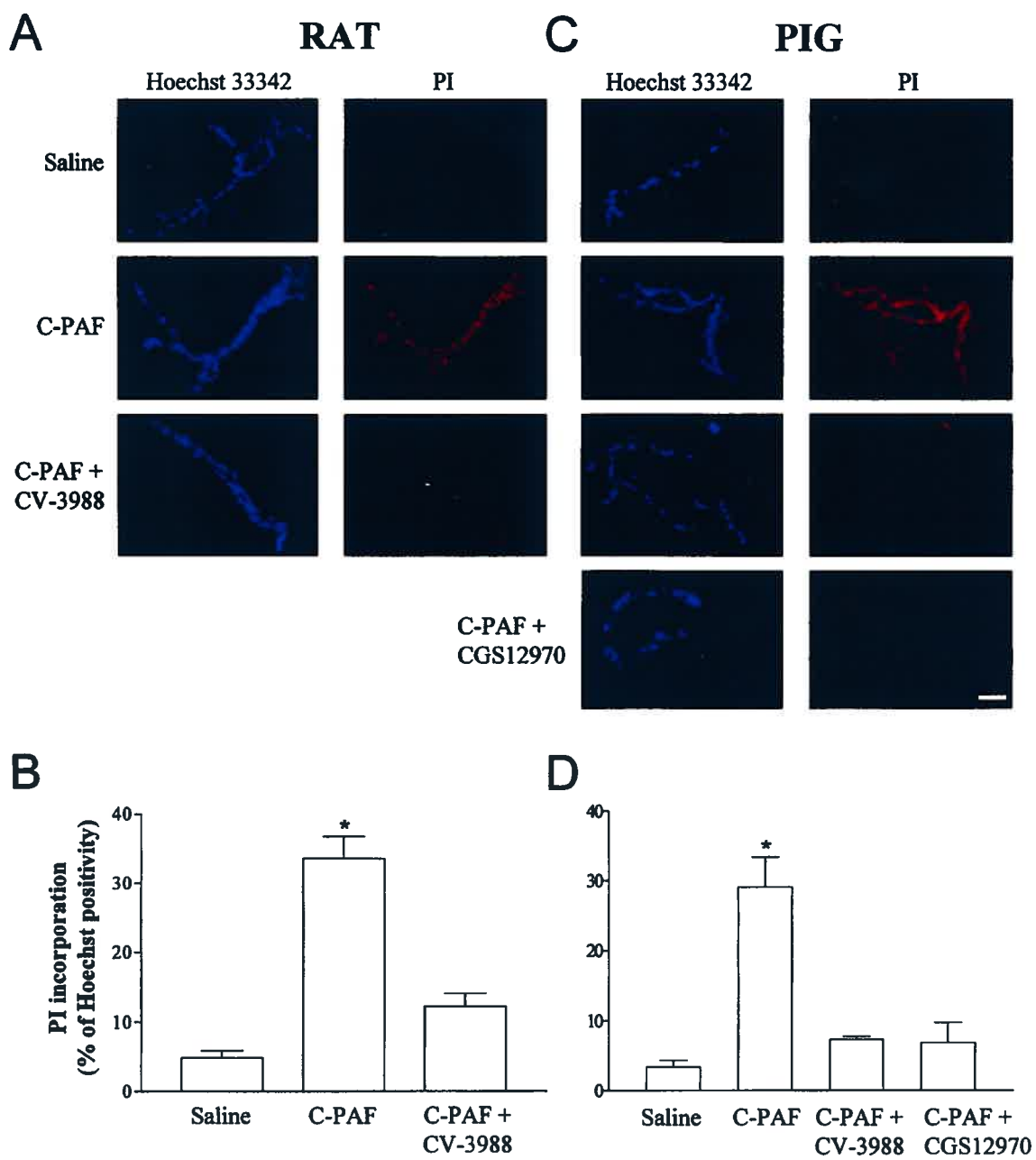


Figure 3. Cytotoxic effects of C-PAF on freshly isolated retinal microvessels from 12- to 14-day-old rats (**A, B**) and 1- to 3-day old pigs (**C, D**). Microvessels ($\leq 30 \mu\text{m}$) primarily containing endothelium (factor VIII-positive and smooth muscle actin-negative) were incubated for 24 hours with C-PAF (100 nM) and then stained with Hoechst 33342 and PI. Staining was visualized with an immersion objective placed directly onto the culture medium, using red and ultraviolet filters. PI was significantly incorporated in microvascular cells treated with C-PAF, indicating cellular membrane disruption. Incorporation of PI was prevented by preincubation with PAF receptor antagonist CV-3988 (1 μM) as well as with TXA_2 synthase inhibitor CGS12970 (1 μM). Data are the mean \pm SEM of the proportion of PI-positive cells relative to all cells stained with Hoechst 33342 in three separate experiments each performed in quadruplicate; $*P < 0.01$ compared with all other proportions (by ANOVA and comparison among means). Scale bar: 20 μm .

Figure 4.

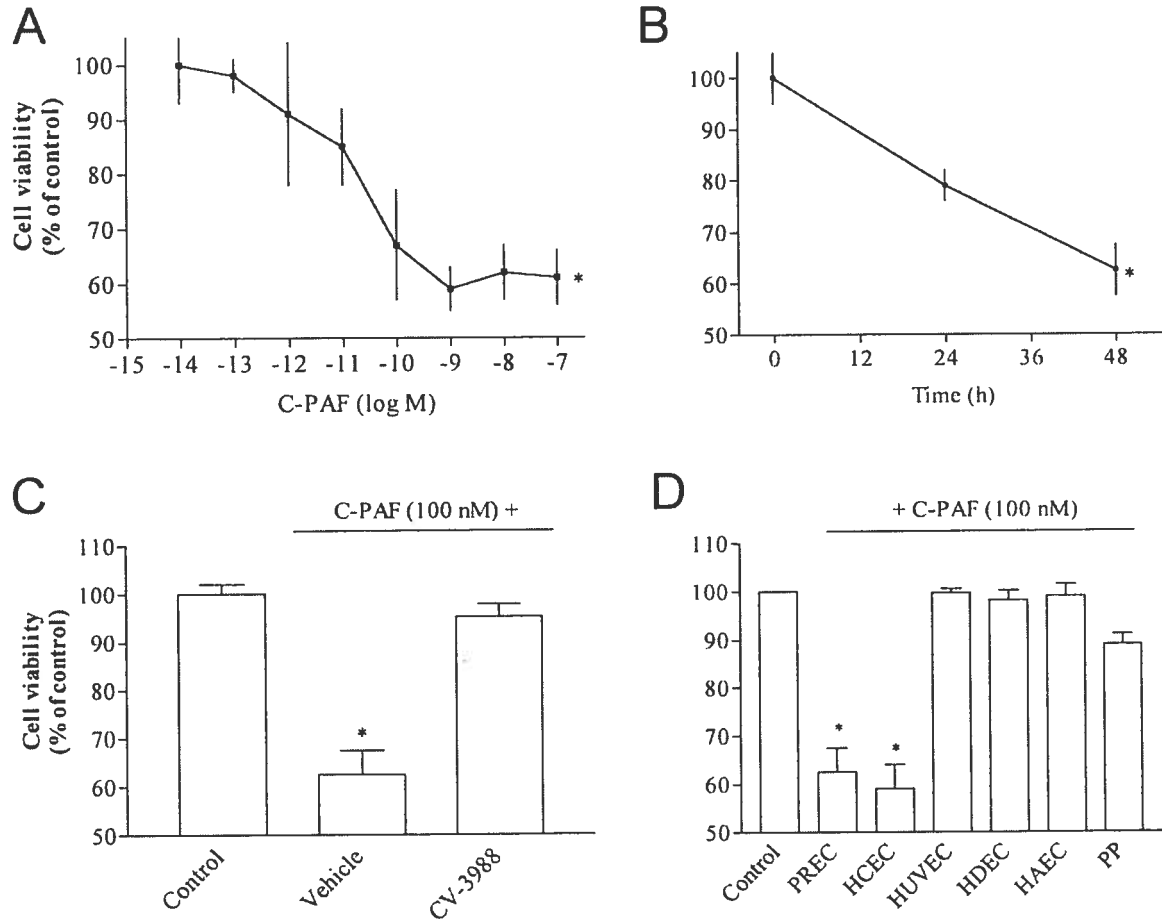


Figure 4. Concentration- (A) and time (B)-dependent effects of C-PAF on cultured porcine neuroretinal microvascular endothelial cells. (A) MTT assay was performed at 48 hours. (B) Cells were treated with 100 nM C-PAF. Data are the mean \pm SEM of results in three to six separate experiments, each performed in quadruplicate and expressed as a percentage of control (untreated); $*P < 0.05$ (one-way ANOVA factoring for time or concentration). (C) Effects of PAF receptor antagonist CV-3988 (1 μ M) on C-PAF (100 nM)-induced retinal endothelial cell viability at 48 hours. Cell viability in untreated cells was 95% or more. Data are the mean \pm SEM of results in three to four experiments; $*P < 0.01$ compared with other data. (D) Effects of C-PAF (100 nM) on endothelial cells from adult human brain (HCEC), aorta (HAEC), dermis (HDEC), and umbilical vein (HUVEC) and on porcine retinal endothelial cells (PREC) and pericytes (PP). In all cases MTT assay was performed after 48 hours' exposure to C-PAF. Cell viability in untreated cells was 95% or more. Data are the mean \pm SEM of results in three to five experiments, each performed in triplicate and expressed as percentage of the control (untreated). $*P < 0.05$ compared with control.

Figure 5.

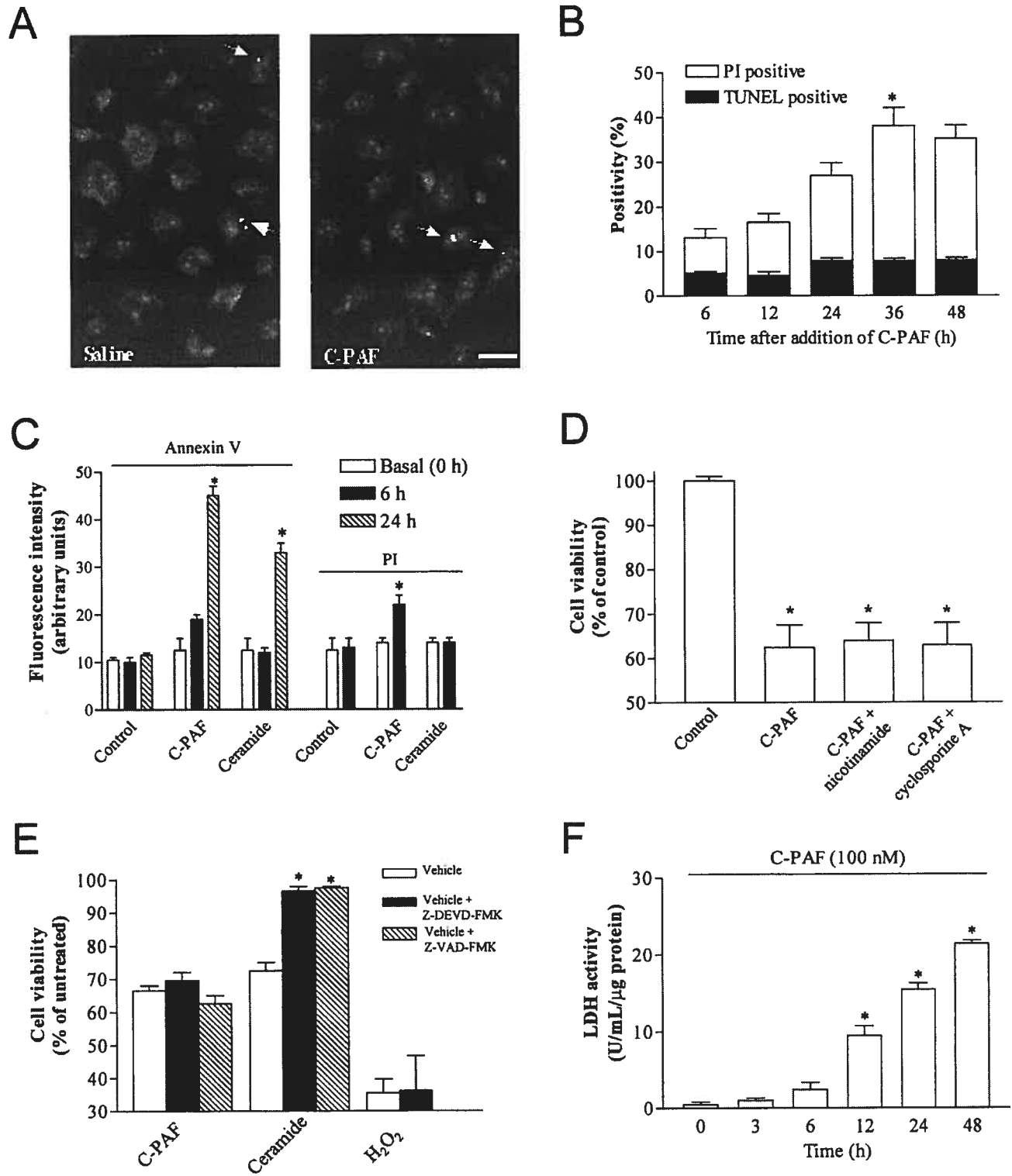


Figure 5. Nature of C-PAF–induced retinovascular endothelial cytotoxicity. **(A)** In situ labeling of 3'OH DNA fragments of untreated (*left*) and C-PAF-treated (*right*) endothelial cells. *Arrows*: TUNEL-positive cells (PI was used as counterstain); note rare positively (*arrows*) stained nuclei. Scale bar, 10 μm . **(B)** Time-course of incorporation of PI and TUNEL-positive cells exposed to C-PAF (100 nM). **(C)** Annexin V binding and incorporation of PI in endothelial cells in response to C-PAF (100 nM) and ceramide (8 μM ; detected by flow cytometry). Values are means \pm SEM of three separate experiments; $*P < 0.05$ compared with corresponding basal values. **(D)** Effects of nicotinamide (5 nM) and cyclosporin A (100 nM) on C-PAF (100 nM)–induced endothelial cell viability (detected by MTT assay). Data are the mean \pm SEM cell viability expressed as a percentage of control (untreated) cells of three separate experiments, each performed in triplicate; $*P < 0.01$ compared with control. **(E)** Effects of caspase inhibitors Z-DEVD-FMK and Z-VAD-FMK (50 μM) or vehicle on cell viability (detected by MTT assay) induced by C-PAF (100 nM), ceramide (8 μM), or H_2O_2 (0.5 μM). Data are the mean \pm SEM cell viability expressed as a percentage of untreated cells of three separate experiments, each performed in triplicate; $*P < 0.01$ compared with ceramide alone (without inhibitors). **(F)** LDH activity in media as a function of time after treatment with C-PAF (100 nM); $*P < 0.05$ compared with other values (one-way ANOVA).

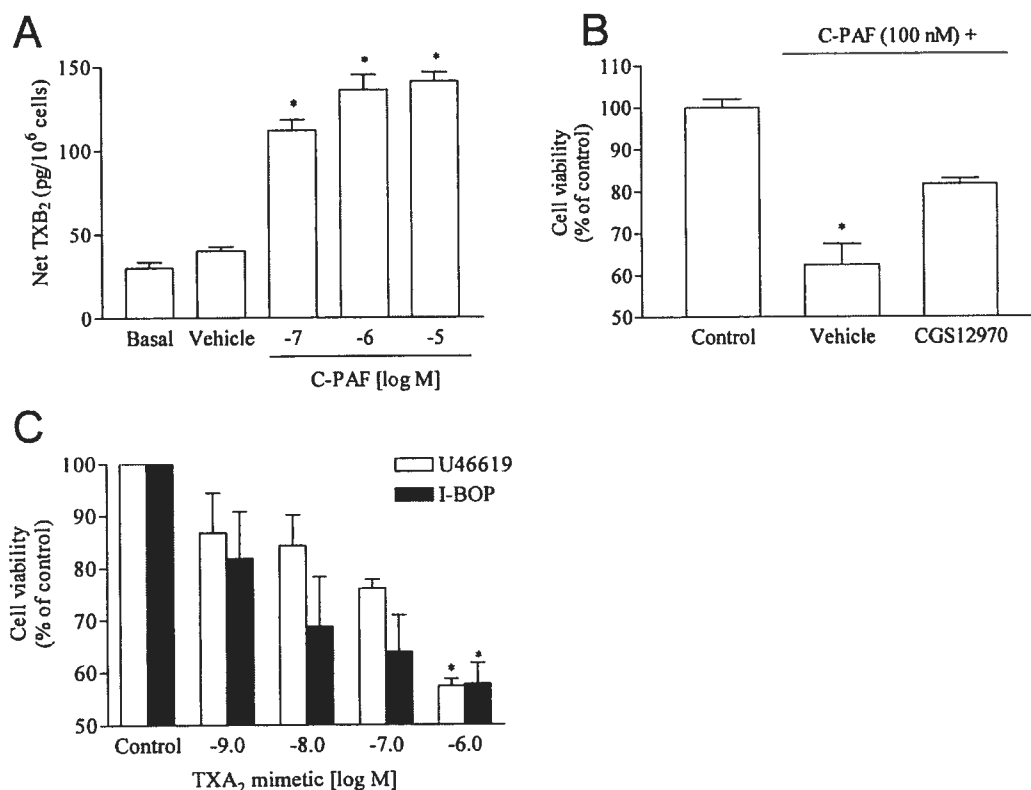


Figure 6. Effects of C-PAF on generation of TX- (A) and TXA₂-dependent retinal endothelial cell death (B). (A) Cells were exposed to C-PAF (100 nM) for 6 hours, and TXB₂ was measured in the media. Data are the mean ± SEM of three experiments each performed in duplicate; **P* < 0.05 compared with other data (one-way ANOVA). (B) Effects of TXA₂ synthase inhibitor (1 μM) on C-PAF (100 nM)-induced retinal endothelial cell death at 48 hours. Data are the mean ± SEM of results in three experiments; **P* < 0.01 compared with the other data. (C) Effects of TXA₂ mimetics U46619 and I-BOP on cell viability determined by MTT assay after 48 hours. Data are the mean ± SEM of results in three experiments; **P* < 0.05 compared with other values (one-way ANOVA).

Remerciements

The authors thank Hendrika Fernandez and Stéphane Pinsonneault for technical assistance, and Les Fermes Ménard, Inc. (L'Ange Gardien, Québec, Canada) for their generous supply of piglets. Supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, the March of Dimes Birth Defects Foundation, the Heart and Stroke Foundation of Québec, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, and Grant GM42056 from the National Institute of General Medical Sciences. MHB is a recipient of a studentship award from the Research Center of Hôpital Ste-Justine, and AMM, FG, SGB, and SC are recipients, respectively, of studentship (AMM), fellowships (FG and SGB), and Scientist awards from the Canadian Institutes of Health Research (SC). SC also holds a Canada Research Chair in perinatology.

Submitted for publication November 15, 2001; revised May 1, 2002; accepted May 30, 2002.

Références

1. Cameron, NE, Cotter, MA. (1999) Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes *Res Clin Pract* 45,137-146
2. Cameron, NE, Tuck, Z, McCabe, L, Cotter, MA. (2001) Effect of the hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, on peripheral nerve tissue perfusion, conduction velocity and nociception in experimental diabetes *Diabetologia* 44,1161-1169.
3. Ashton, N. (1968) Donders lecture, 1967. Some aspects of the comparative pathology of oxygen toxicity in the retina *Br J Ophthalmol* 52,505-531.

4. Niesman, MR, Johnson, KA, Penn, JS. (1997) Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity *Neurochem Res* 22,597-605.
5. Penn, JS, Tolman, BL, Bullard, LE. (1997) Effect of a water-soluble vitamin E analog, trolox C, on retinal vascular development in an animal model of retinopathy of prematurity *Free Radic Biol Med* 22,977-984.
6. Weleber, RG. (1994) Retinitis pigmentosa and allied disorders Ryan, SJ Ogden, TE Schachat, AP Murphy, RP Glaser, BM eds. *Retina* 2nd ed. ,335-466 Mosby St. Louis.
7. Penn, JS, Li, S, Naash, MI. (2000) Ambient hypoxia reverses retinal vascular attenuation in a transgenic mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41,4007-4013.
8. Chang-Ling, T, Stone, J. (1992) Retinopathy of prematurity: origins in the architecture of the retina *Prog Retinal Eye Res* 12,155-178
9. McLeod, DS, Brownstein, R, Luty, GA. (1996) Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37,300-311.
10. Reynaud, X, Dorey, CK. (1994) Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35,3169-3177.
11. Ashton, N. (1961) Effect of oxygen on the vessels of the ratling. VIII: studies in developing retinal vessels VIII *Br J Ophthalmol* 45,321-340
12. McLeod, DS, Crone, SN, Luty, GA. (1996) Vasoproliferation in the neonatal dog model of oxygen-induced retinopathy *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37,1322-1333.

13. Lachapelle, P, Dembinska, O, Rojas, LM, Benoit, J, Almazan, G, Chemtob, S. (1999) Persistent functional and structural retinal anomalies in newborn rats exposed to hyperoxia *Can J Physiol Pharmacol* 77,48-55.
14. Reynaud, X, Hansen, RM, Fulton, AB. (1995) Effect of prior oxygen exposure on the electroretinographic responses of infant rats *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36,2071-2079.
15. D'Amore, PA, Sweet, E. (1987) Effects of hyperoxia on microvascular cells in vitro *In Vitro Cell Dev Biol* 23,123-128.
16. Kondo, T, Kinouchi, H, Kawase, M, Yoshimoto, T. (1996) Astroglial cells inhibit the increasing permeability of brain endothelial cell monolayer following hypoxia/reoxygenation *Neurosci Lett* 208,101-104.
17. Auge, N, Pieraggi, MT, Thiers, JC, Negre-Salvayre, A, Salvayre, R. (1995) Proliferative and cytotoxic effects of mildly oxidized low-density lipoproteins on vascular smooth-muscle cells *Biochem J* 309,1015-1020.
18. Halks-Miller, M, Henderson, M, Eng, LF. (1986) α -Tocopherol decreases lipid peroxidation, neuronal necrosis, and reactive gliosis in reaggregate cultures of fetal rat brain *J Neuropathol Exp Neurol* 45,471-484.
19. Rui, T, Cepinskas, G, Feng, Q, Ho, YS, Kvietys, PR. (2001) Cardiac myocytes exposed to anoxia-reoxygenation promote neutrophil transendothelial migration *Am J Physiol* 281,H440-H447.
20. Alloatti, G, Montrucchio, G, Camussi, G. (1994) Role of platelet-activating factor (PAF) in oxygen radical-induced cardiac dysfunction *J Pharmacol Exp Ther* 269,766-771.

21. Cluzel, J, Doly, M, Bazan, NG, Bonhomme, B, Braquet, P. (1995) Inhibition of platelet-activating factor-induced retinal impairments by cholera and pertussis toxins *Ophthalmic Res* 27,153-157.
22. Akisu, M, Kultursay, N, Coker, I, Huseyinov, A. (1998) Platelet-activating factor is an important mediator in hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat. Flunarizine and ginkgo biloba extract reduce PAF concentration in the brain *Biol Neonate* 74,439-444.
23. Liu, XH, Eun, BL, Silverstein, FS, Barks, JD. (1996) The platelet-activating factor antagonist BN 52021 attenuates hypoxic- ischemic brain injury in the immature rat *Pediatr Res* 40,797-803.
24. Montrucchio, G, Alloatti, G, CamussiG, (2000) Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology *Physiol Rev* 80,1669-1699.
25. Koltai, M, Hosford, D, Braquet, P. (1992) Role of PAF and cytokines in microvascular tissue injury *J Lab Clin Med* 119,461-466.
26. Kubes, P, SuzukiM,, Granger, DN. (1990) Platelet-activating factor-induced microvascular dysfunction: role of adherent leukocytes *Am J Physiol* 258,G158-G163.
27. Ashton, N. (1966) Oxygen and the growth and development of retinal vessels: in vivo and in vitro studies. The XX Francis I. Proctor Lecture *Am J Ophthalmol* 62,412-435.
28. Chemtob, S, Hardy, P, Abran, D, et al (1995) Peroxide-cyclooxygenase interactions in postasphyxial changes in retinal and choroidal hemodynamics *J Appl Physiol* 78,2039-2046.

29. Sanchez-Crespo, M, Alonso, F, Barat, A, Egado, J. (1982) Rat serum sickness: possible role of inflammatory mediators allowing deposition of immune complexes in the glomerular basement membrane *Clin Exp Immunol* 49,631-638.
30. Kinnula, VL, Adler, KB, Ackley, NJ, Crapo, JD. (1992) Release of reactive oxygen species by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro *Am J Physiol* 262,L708-L712.
31. Chanez, P, Dent, G, Yukawa, T, Barnes, PJ, Chung, KF. (1990) Generation of oxygen free radicals from blood eosinophils from asthma patients after stimulation with PAF or phorbol ester *Eur Respir J* 3,1002-1007.
32. el Azzouzi, B, Jurgens, P, Benveniste, J, Thomas, Y. (1993) Immunoregulatory functions of paf-acether. IX: modulation of apoptosis in an immature T cell line *Biochem Biophys Res Commun* 190,320-324.
33. Ezra, D, Laurindo, FR, Czaja, JF, Snyder, F, Goldstein, RE, Feuerstein, G. (1987) Cardiac and coronary consequences of intracoronary platelet activating factor infusion in the domestic pig *Prostaglandins* 34,41-57.
34. Rizzo, A, Taylor, AE, Townsley, MI, Logsdon, P, Khimenko, PL, Fletcher, JR. (1995) Platelet-activating factor increases vascular resistance in rat hindquarters by thromboxane A₂ *Am J Physiol* 268,H1954-H1958.
35. Beauchamp, MH, Martinez-Bermudez, AK, Gobeil, F, Jr, et al (2001) Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy *J Appl Physiol* 90,2279-2288.
36. Penn, JS, Gay, CA. (1992) Computerized digital image analysis of retinal vessel density: application to normoxic and hyperoxic rearing of the newborn rat *Exp Eye Res* 54,329-336.

37. Alon, T, Hemo, I, Itin, A, Pe'er, J, Stone, J, Keshet, E. (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity *Nat Med* 1,1024-1028.
38. Dembinska, O, Rojas, LM, Varma, DR, Chemtob, S, Lachapelle, P. (2001) Graded contribution of retinal maturation to the development of oxygen-induced retinopathy in rats *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42,1111-1118.
39. Summers, JB, Albert, DH. (1995) Platelet activating factor antagonists *Adv Pharmacol* 32,67-168.
40. Reed, MG, Shanks, E, Beech, DJ, Barlow, L, Howard, CV. (2001) Stereological estimation of eye volume using the Pappus method *J Microsc* 202,473-479.
41. Wales, RC. (1977) Ocular measurement by simple gravimetric methods *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16,580-582.
42. Luty, GA, McLeod, DS. (1992) A new technique for visualization of the human retinal vasculature *Arch Ophthalmol* 110,267-276.
43. Henkind, P. (1967) Radial peripapillary capillaries of the retina. I: anatomy—human and comparative *Br J Ophthalmol* 51,115-123.
44. Ward, SG, Westwick, J. (1988) Antagonism of the platelet activating factor-induced rise of the intracellular calcium ion concentration of U937 cells *Br J Pharmacol* 93,769-774.
45. Minor, T, Yamaguchi, T, Isselhard, W. (1995) Treatment of preservation/reperfusion injury by platelet-activating factor antagonism in the rat liver graft *Transplant Proc* 27,522-523.

46. Lahaie, I, Hardy, P, Hou, X, et al (1998) A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ on retinal vessels *Am J Physiol* 274,R1406-R1416.
47. McGahon, AJ, Martin, SJ, Bissonnette, RP, et al (1995) The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro *Methods Cell Biol* 46,153-185.
48. Moore, A, Donahue, CJ, Bauer, KD, Mather, JP. (1998) Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death *Methods Cell Biol* 57,265-278.
49. Pournaras, CJ, Riva, CE, Tsacopoulos, M, Strommer, K. (1989) Diffusion of O_2 in the retina of anesthetized miniature pigs in normoxia and hyperoxia *Exp Eye Res* 49,347-360.
50. Yu, DY, Cringle, SJ, Alder, V, Su, EN. (1999) Intraretinal oxygen distribution in the rat with graded systemic hyperoxia and hypercapnia *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40,2082-2087.
51. Ahmed, J, Braun, RD, Dunn, R, Jr, Linsenmeier, RA. (1993) Oxygen distribution in the macaque retina *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34,516-521.
52. Bloodworth, JM, Jr, Gutgesell, HP, Jr, Engerman, RL. (1965) Retinal vasculature of the pig: light and electron microscope studies *Exp Eye Res* 4,174-178.
53. Hou, X, Gobeil, F, Jr, Peri, K, et al (2000) Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F(2t)- isoprostane (8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$) in immature pig periventricular brain microvessels *Stroke* 31,516-524.
54. Gitlin, JD, D'Amore, PA. (1983) Culture of retinal capillary cells using selective growth media *Microvasc Res* 26,74-80.
55. Muruganandam, A, Herx, LM, Monette, R, Durkin, JP, Stanimirovic, DB. (1997) Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier *FASEB J* 11,1187-1197.

56. Terashita, Z, Tsushima, S, Yoshioka, Y, Nomura, H, Inada, Y, Nishikawa, K. (1983) CV-3988: a specific antagonist of platelet activating factor (PAF) *Life Sci* 32,1975-1982.
57. Ambler, J, Butler, KD, Ku, EC, Maguire, ED, Smith, JR, Wallis, RB. (1985) CGS 12970: a novel, long acting thromboxane synthetase inhibitor *Br J Pharmacol* 86,497-504.
58. Loo, DT, Rillema, JR. (1998) Measurement of cell death *Methods Cell Biol* 57,251-264.
59. Zaks, TZ, Chappell, DB, Rosenberg, SA, Restifo, NP. (1999) Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition *J Immunol* 162,3273-3279.
60. Hannun, YA. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress *Science* 274,1855-1859.
61. Gardner, AM, Xu, FH, Fady, C, et al (1997) Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide *Free Radic Biol Med* 22,73-83.
62. Bowes, J, Piper, J, Thiemermann, C. (1998) Inhibitors of the activity of poly (ADP-ribose) synthetase reduce the cell death caused by hydrogen peroxide in human cardiac myoblasts *Br J Pharmacol* 124,1760-1766.
63. Kroemer, G, Dallaporta, B, Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis *Annu Rev Physiol* 60,619-642.
64. Allain, CC, Henson, CP, Nadel, MK, Knoblesdorff, AJ. (1973) Rapid single-step kinetic colorimetric assay for lactate dehydrogenase in serum *Clin Chem* 19,223-227.
65. Lecoeur, H, Prevost, MC, Gougeon, ML. (2001) Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a

- reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay *Cytometry* 44,65-72.
66. Hart, HE, Greenwald, EB. (1979) Scintillation proximity assay (SPA): a new method of immunoassay—direct and inhibition mode detection with human albumin and rabbit antihuman albumin *Mol Immunol* 16,265-267.
67. Ihida, K, Predescu, D, Czekay, RP, Palade, GE. (1999) Platelet activating factor receptor (PAF-R) is found in a large endosomal compartment in human umbilical vein endothelial cells *J Cell Sci* 112,285-295.
68. Marcheselli, VL, Rossowska, MJ, Domingo, MT, Braquet, P, Bazan, NG. (1990) Distinct platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex *J Biol Chem* 265,9140-9145.
69. O'Flaherty, JT, Redman, JF, Jr, Schmitt, JD, et al (1987) 1-O-alkyl-2-N-methylcarbamyl-glycerophosphocholine: a biologically potent, non-metabolizable analog of platelet-activating factor *Biochem Biophys Res Commun* 147,18-24.
70. Davies, P, Smith, BT, Maddalo, FB, et al (1987) Characteristics of lung pericytes in culture including their growth inhibition by endothelial substrate *Microvasc Res* 33,300-314.
71. Debek, W, Chyczewski, L, Farbiszewski, R. (1999) BN52021 stabilizes the oxidant-antioxidant equilibrium in peritoneal lavage fluid in experimental hemorrhagic shock *Folia Histochem Cytobiol* 37,249-254.
72. Bussolino, F, Camussi, G. (1995) Platelet-activating factor produced by endothelial cells: a molecule with autocrine and paracrine properties *Eur J Biochem* 229,327-337.

73. Lewis, MS, Whatley, RE, Cain, P, et al (1988) Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion *J Clin Invest* 82,2045-2055.
74. Hou, X, Marrache, AM, Abran, D, et al (2001) Marked increase in platelet-activating factor (PAF)-elicited constriction of periventricular (PV) microvessels of the newborn compared with the adult: mechanisms and implications for PV leukomalacia (PVL) [abstract] *Pediatr Res* 49,437A
75. Uluoglu, C, Timlioglu, O. (1999) Endothelium-dependent vasodilation in the isolated rabbit kidney following in vivo and in vitro ischaemia and reperfusion: effects of antagonizing platelet activating factor (PAF) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360,324-330.
76. Armstead, WM, Pourcyrous, M, Mirro, R, Leffler, CW, Busija, DW. (1988) Platelet activating factor: a potent constrictor of cerebral arterioles in newborn pigs *Circ Res* 62,1-7.
77. Thorin, E, Shreeve, SM. (1998) Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states *Pharmacol Ther* 78,155-166.
78. Lemasters, JJ. (1999) Mechanisms of hepatic toxicology. Part V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis *Am J Physiol* 276,G1-G6.
79. Simm, A, Bertsch, G, Frank, H, Zimmermann, U, Hoppe, J. (1997) Cell death of AKR-2B fibroblasts after serum removal: a process between apoptosis and necrosis *J Cell Sci* 110,819-828.

80. Orrenius, S, McCabe, MJ, Jr, Nicotera, P. (1992) Ca^{2+} -dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death *Toxicol Lett* 64/65,357-364.
81. Trump, BF, Berezesky, IK. (1995) Calcium-mediated cell injury and cell death *FASEB J* 9,219-228.
82. Arita, H, Nakano, T, Hanasaki, K. (1989) Thromboxane A_2 : its generation and role in platelet activation *Prog Lipid Res* 28,273-301.
83. Chakraborti, T, Das, S, Mondal, M, Roychoudhury, S, Chakraborti, S. (1999) Oxidant, mitochondria and calcium: an overview *Cell Signal* 11,77-85.
84. de la Cruz, JP, Moreno, A, Ruiz-Ruiz, MI, Garcia Campos, J, Sanchez de la Cuesta, (1998) Effect of camonagrel, a selective thromboxane synthase inhibitor, on retinal vascularization in experimental diabetes *Eur J Pharmacol* 350,81-85.

CHAPITRE 6

Discussion générale, conclusions
et perspectives futures

Généralités

Les données présentées dans le cadre de cette thèse de doctorat démontrent et caractérisent de nouveaux effets pour deux médiateurs qui autrement sont surtout connus pour leurs effets activateurs des plaquettes et vasoconstricteurs du muscle lisse vasculaire. Ainsi, le PAF et le TXA₂ déclenchent de manière spécifique la mort cellulaire endothéliale des microvaisseaux rétiniens et contribuent à la vaso-oblitération qui caractérise la première phase de la rétinopathie du prématuré ROP. L'activation des récepteurs PAFR et TP amène une production augmentée de ROS qui, à court terme et chez un sujet prématuré dont les défenses antioxydantes sont déficientes, se combinent au NO et produisent un stress nitrosatif qui participe à la dégénérescence microvasculaire rétinienne. À plus long terme, alors que les niveaux d'antioxydants se normalisent, le NO en absence de stress nitrosatif devient nécessaire afin d'empêcher que la vaso-oblitération ne s'aggrave en régulant l'expression de VEGFR-2 à la hausse. Les conditions réunies dans la ROP favorisent la production du TXA₂, un médiateur qui autrement se retrouve en faible concentration dans la cellule endothéliale lors de situations physiologiques normales. Des immunobuvardages de type Western montrent une augmentation de l'expression de la TX synthase dans les cellules endothéliales soumises à un stress oxydant (Quiniou *et al.*, 2004). Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que parmi les facteurs qui régulent la transcription de cet enzyme, figure AP-1 (c-Fos/c-Jun) qui est très sensible au potentiel redox et qui voit son activité transcriptionnelle augmenter lors d'un stress oxydant (Nose *et al.*, 1991), particulièrement en présence de O₂⁻ (Sanchez *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1999). Abondant dans le même sens, l'activité AP-1 est inhibée par de fortes concentrations de glutathion (Pinkus *et al.*, 1996). Il a déjà été démontré que le

stress oxydant favorise la synthèse de TXA₂ au détriment de PGI₂ (Weiss *et al.*, 1979; Warso et Lands, 1983). Contribuant au phénomène, le stress nitrosatif pourrait aussi avoir une influence, puisque le NO produit durant la ROP, en plus d'activer AP-1 (Marshall *et al.*, 2000), peut nitrosyler la synthase PGI₂ et diminuer son activité enzymatique par l'intermédiaire des ONOO⁻ (Zou et Ullrich, 1996), expliquant une partie des effets bénéfiques de l'inhibition précoce des NOS. Un autre facteur contribue à expliquer la synthèse importante de TXA₂ dans les cellules endothéliales durant un stress oxydant; il s'agit de l'augmentation de la synthèse de PAF, qui produit son effet cytotoxique via une synthèse de TXA₂ (Beauchamp *et al.*, 2002). L'enzyme lyso-PAF acétyltransférase qui produit le PAF par la voie du remodelage (Fig.10 page 80), voit son activité régulée à la hausse lorsque s'accumulent les hydroperoxydes (Sakamoto *et al.*, 2002) au moyen de mécanismes qui impliquent l'acide lysophosphatidique et les MAPKs (Corl *et al.*, 2003). Tous ces mécanismes coopèrent afin d'augmenter la production de TXA₂ qui s'avère cytotoxique pour la vascularisation rétinienne.

La mort cellulaire endothéliale rétinienne a commencé à être caractérisée et présente divers attributs qui n'en font pas une mort cellulaire classique au sens des termes « nécrose » ou « apoptose ». Les résultats présentés ici pourraient ouvrir la voie à une approche thérapeutique nouvelle favorisant un traitement préventif de la ROP chez les enfants à risque de développer des séquelles de la maladie.

Mort induite par l'activation des récepteurs PAF et TXA₂

La ROP est caractérisée dans sa phase initiale par la dégénérescence de la microvascularisation rétinienne soumise à des conditions de stress oxydatif. Le retour à

un environnement normoxique met les zones avasculaires qui ont subi la vaso-oblitération en situation d'ischémie qui est le signal déclencheur de la néovascularisation. Les vaisseaux nouvellement formés traversent la membrane limitante interne et envahissent le corps vitré causant une traction sur la rétine qui peut aller jusqu'au décollement de celle-ci et provoquer la cécité. Des études (Penn *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 2001) ont montré la diminution de la sévérité de la ROP si on réussit à atténuer la phase initiale de vaso-oblitération. Les mécanismes qui causent la dégénérescence microvasculaire sont inconnus. Malgré une abondance de production de TXA_2 (FitzGerald *et al.*, 1987; Grover *et al.*, 1988; Chemtob *et al.*, 1995) et de PAF (Alloatti *et al.*, 1994; Rui *et al.*, 2001) durant le stress oxydatif, la vaso-oblitération se produit avant qu'il n'y ait agrégation plaquettaire (Ashton, 1966; Chan-Ling et Stone, 1992; McLeod *et al.*, 1996). Les données présentées ici, démontrent donc des effets indépendants d'une interaction avec les plaquettes ou d'un effet simplement vasoconstricteur. Le modèle utilisé présente un avantage important : les plaquettes du rat sont insensibles à l'effet agrégateur du PAF (Sanchez-Crespo *et al.*, 1982), laissant toute la place à ses effets sur l'endothélium. De plus, les effets constricteurs de PAF et TXA_2 sur la vascularisation rétinienne sont plus modestes que l'effet de l'endothéline ou l'angiotensine II qui ne cause pas de vaso-oblitération (observations non publiées). Enfin, d'autres prostanoides sont produits durant le stress oxydatif, tels que le PGE_2 et le $\text{PGF}_{2\alpha}$, deux vasoconstricteurs qui ne causent pas non plus de vaso-oblitération (Fig. 3D, page 193).

Autant *in vivo*, dans un environnement hyperoxique, qu'*ex vivo* en réponse au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la rétine produit du TXA_2 (Fig. 1, page 190) et du PAF (Fig. 1, page 230) qui contribuent à augmenter le stress oxydant par la production de ROS

(Chanez *et al.*, 1990; Kinnula *et al.*, 1992; Matsuo *et al.*, 1996), eux-mêmes connus pour leur participation à la vaso-oblitération rétinienne (Niesman *et al.*, 1997; Penn *et al.*, 1997). Dans le modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) chez le raton nouveau-né, les effets délétères de l'oxygène à forte dose peuvent être en partie contrés par des bloqueurs des récepteurs PAF (Fig. 1C, page 230 ; Fig. 2, page 232) ou TP (Fig. 1B, 1C, page 190), de même que par un inhibiteur de la TX synthase ou par des antioxydants (Niesman *et al.*, 1997; Penn *et al.*, 1997). Les drogues utilisées dans ces études ont toutes été choisies selon des propriétés structurales qui leur sont propres et aucune, sinon l'antagoniste du PAFR, BN-52021, ne présentent un effet antioxydant intrinsèque. D'ailleurs, la plupart des drogues utilisées sont incapables d'inhiber la peroxydation lipidique (Chemtob *et al.*, 1995). Le BN-52021, pour sa part, n'est pas des plus spécifiques pour le récepteur PAF et son efficacité légèrement supérieure peut être attribuable à des effets antioxydants ou non spécifiques (Braquet *et al.*, 1985).

La mort cellulaire observée est en partie attribuable à l'activation des récepteurs PAF et TXA₂ et cette mort ne semble pas être propre à une espèce en particulier, car autant chez le raton que chez le porcelet, le TXA₂ ou le PAF induisent une mort cellulaire endothéliale des microvaisseaux rétiniens (Fig. 2, page 192; Fig. 3, page 234). La viabilité cellulaire endothéliale semble toujours être légèrement supérieure chez le porcelet. Tout comme chez le rat, la rétine porcine suit un développement semblable à celui de l'humain, (Bloodworth *et al.*, 1965), mais la rétine du porcelet à terme est plus mature que celle d'un enfant prématuré ou celle d'un rat nouveau-né. Comme l'incidence de la ROP est proportionnelle à l'immaturité, il est plausible de penser que la rétine de

porcelet soit plus adaptée à faire face à un stress oxydant et aux effets cytotoxiques du TXA₂ et du PAF.

La mort cellulaire endothéliale observée est fonction de la dose et de la durée d'exposition (Fig. 3A, 3B, page 193; Fig. 4A, 4B, page 236) et les IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire, de même que les effets bénéfiques de bloqueurs spécifiques, nous permettent de conclure à des effets attribuables à l'activation spécifique des récepteurs PAF et TP sur la cellule endothéliale de la microvascularisation rétinienne ou cérébrale. Les autres types cellulaires et plus précisément les autres types cellulaires endothéliaux ne sont pas affectés par des doses croissantes de PAF ou de TXA₂ cytotoxiques pour les cellules endothéliales rétiniennes (Fig. 3F, page 193; Fig. 6, page 198; Fig. 4D, page 236). Ces expériences mettent en évidence une sélectivité des effets cytotoxiques du TXA₂ sur la vascularisation rétinienne en accord avec une hétérogénéité de la réponse au thromboxane en fonction du lit vasculaire. Par exemple, le TXA₂ cause la migration des cellules endothéliales microvasculaires rénales (Daniel *et al.*, 1999), mais pas celle des cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) (Ashton *et al.*, 1999), les deux types cellulaires exprimant des récepteurs TP à leur surface membranaire (Kent *et al.*, 1993).

La peroxydation semble jouer un rôle important dans la mort induite par le TXA₂ et le PAF. L'isoprostane 8-iso-PGF_{2α} est un produit de la peroxydation des membranes lipidiques et représente un excellent indice de peroxydation (Morrow, 2000). Il peut également induire la synthèse de thromboxane (Lahaie *et al.*, 1998; Hou *et al.*, 2000). Ainsi, une exposition des cellules endothéliales rétiniennes au 8-iso-PGF_{2α} induit une synthèse de thromboxane et une diminution de la viabilité cellulaire (Fig. 4, page 195).

Tout comme le 8-iso-PGF_{2α}, dans certains lits vasculaires, une partie des effets du PAF peut être attribuable à une synthèse de TXA₂ (Arribas-Gomez *et al.*, 1995). Il s'avère que dans la rétine, l'activation du PAFR provoque une synthèse de TXA₂ qui est responsable de ~65 à 80 % des effets cytotoxiques de PAF (Fig. 3D, page 234; Fig. 6B, page 240). La mort observée en présence de PAF est donc dépendante d'une synthèse de TXA₂.

Pour l'instant, le PAF et le 8-iso-PGF_{2α} ont été associés à une synthèse de TXA₂ dans la cellule endothéliale neurale, mais il est fort possible que cette synthèse ne leur soit pas exclusive. Tout récemment, les isofuranes, de nouveaux produits de la peroxydation non enzymatique de l'AA ayant une structure apparentée aux Iso-PGs, ont été découverts (Fessel *et al.*, 2002). Contrairement aux iso-PGs, les isofuranes ont une synthèse qui demeure élevée sous une forte tension d'oxygène; ils sont donc plus abondants que les iso-PGs et représenteraient un meilleur indice des dommages causés par la peroxydation dans les situations d'hyperoxie (Fessel et Roberts, 2005). Des niveaux élevés d'isofuranes ont été dosés dans le tissu cérébral de plusieurs patients ayant des maladies neurodégénératives (Fassel *et al.*, 2003). La bioactivité des isofuranes est inconnue, mais il n'est pas exclu, à cause de leur similarité de structure avec les Iso-PGs, qu'ils soient aussi capables de participer à la toxicité cellulaire endothéliale neurovasculaire en contribuant à la synthèse de TXA₂.

Cette mort cellulaire endothéliale neurovasculaire induite par PAF-TXA₂ présente des caractéristiques qui sortent des normes habituellement décrites dans la littérature se rapportant à l'apoptose et la nécrose. La nécrose se caractérise par le gonflement de la cellule et des organelles et la perte de l'intégrité membranaire et la relâche de facteurs provoquant l'inflammation dans une réaction que l'on peut qualifier d'aiguë. Quant à

l'apoptose, elle présente une diminution du volume cellulaire, une condensation et une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique formant des corps apoptotiques contenant des organites intacts entourés par une membrane intacte. Les corps apoptotiques alors formés sont phagocytés par les cellules avoisinantes sans qu'il y ait inflammation, le tout s'effectuant sur plusieurs heures (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980).

Selon les présentes données, on remarque que le TXA₂ n'a besoin que d'une mise en contact de ~4 heures avec les cellules endothéliales pour atteindre son plein potentiel cytotoxique mesuré à 48 heures (Fig. 3E, page 193). Le PAF-TXA₂ cause une mort lente dont les premiers signes ne sont perçus que ~18 h après son déclenchement, n'impliquent pas de condensation ou une fragmentation de l'ADN et n'impliquent pas non plus l'activation des caspases initiatrices ou effectrices les plus communes (Fig. 5A, 5B, 5D, 5E, page 196; Fig. 5A, 5B, 5E, page 238). Malgré des résultats négatifs concernant l'implication du pore transitoire mitochondrial (MPT) (Fig. 5D, page 238), il n'est pas exclu qu'il ait un rôle à jouer puisque l'inhibition de la cyclophiline D par la cyclosporine A ne s'avère pas très spécifique et présente une certaine cytotoxicité intrinsèque aux doses utilisées (Fig. 5D, page 238 et résultats non publiés). Par contre, outre le laps de temps anormalement long, les cellules endothéliales présentent plusieurs caractéristiques de la mort cellulaire dite « nécrotique », c'est-à-dire une perte de l'intégrité membranaire qui se traduit par une incorporation de PI et une relâche de la déshydrogénase lactique (LDH) qui augmente en fonction du temps d'exposition (Fig. 5B, 5D, 5F, page 196; Fig. 5B, 5F, page 238). En revanche, lorsque les cellules sont stimulées par le PAF, il y a augmentation du marquage des phosphatidylsérines (PS) par l'annexine-V, un

phénomène habituellement propre à l'apoptose, mais qui ne lui est pas exclusive (Lecoeur *et al.*, 2001). Comme il y a perte évidente de l'intégrité membranaire, il est aussi possible que le marqueur pénètre dans la cellule et marque les PS du côté interne de la membrane plasmique.

Il semble donc que la mort cellulaire induite par le PAF-TXA₂ soit intermédiaire entre l'apoptose et la nécrose. Certaines évidences nous portent à croire que la mort induite par le TXA₂ dans les cellules endothéliales neurovasculaires est une mort apoptotique au cours de laquelle il y a activation de protéases autres que les caspases causant une mort par nécrose secondaire à la dégradation de protéines essentielles à l'homéostasie cellulaire.

L'activation des récepteurs PAF et TP amène une mobilisation du calcium intracellulaire (Ward et Westwick, 1988; Arita *et al.*, 1989) par l'interaction de leur protéine G_{αq} avec la PLC qui relâche deux seconds messagers importants : IP₃ et DAG. La mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire par IP₃ peut activer des phospholipases spécifiques et des protéases, alors que des concentrations de Ca²⁺ intracellulaires supraphysiologiques peuvent interférer avec le MPT et mettre fin à la production d'ATP par la mitochondrie et stimuler la production de ROS (Orrenius *et al.*, 1992; Trump et Berezsky, 1995) dans une boucle de rétroaction positive qui favorise la production d'espèces cytotoxiques (Chakraborti *et al.*, 1999). Le PAF, en plus de participer à la mobilisation du Ca²⁺, pourrait participer à l'augmentation de la synthèse de TXA₂ dans divers mécanismes. La protéine G_{αq} de PAFR pourrait activer la cPLA₂ qui libère alors de l'acide arachidonique qui sera d'abord transformé en PGH₂ par la COX avant d'être majoritairement transformé en TXA₂ par la TX synthase à cause des conditions de stress

oxydant (Weiss *et al.*, 1979; Warso et Lands, 1983). Tout récemment, des récepteurs PAF fonctionnels ont été identifiés sur la membrane nucléaire de cellules endothéliales provenant de vaisseaux cérébraux porcins. Selon un mécanisme indépendant d'une protéine $G_{\alpha q}$, l'activation de ce récepteur par le PAF provoque une augmentation de l'expression de COX-2 (Marrache *et al.*, 2002) qui pourrait contribuer à une synthèse augmentée de TXA_2 . Le TXA_2 induit la mort de différents types cellulaires non endothéliaux notamment des thymocytes immatures (Ushikubi *et al.*, 1993), du trophoblaste (Yusuf *et al.*, 2001), des cellules des tubules rénaux (Jariyawat *et al.*, 1997), des myocytes ventriculaires adultes (Shizukuda et Buttrick, 2002) et des cellules HUVEC (Gao *et al.*, 2000) par des mécanismes classiques d'apoptose.

Dans les présentes expériences, la mobilisation du calcium induite par PAF- TXA_2 n'active pas les caspases (Fig. 5, page 196; Fig. 5, page 238), mais pourrait activer d'autres protéases, telles que les calpaïnes. L'activité calpaïne est détectée dans nombre de pathologies dont la dégénérescence neuronale et l'ischémie de la rétine et du cerveau (Saito *et al.*, 1993; Ray *et al.*, 2003; Sedarous *et al.*, 2003; Wingrave *et al.*, 2003). Les calpaïnes représentent une famille de cystéines protéases comportant 14 isoformes incluant la μ -calpaïne et la m-calpaïne qui sont ubiquitaires et activées par différentes concentrations de Ca^{2+} . Une série d'expériences, dans le but d'élucider les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire endothéliale induite par le TXA_2 , a été entamée au laboratoire du Dr Chemtob et montre une activation des calpaïnes en réponse au TXA_2 qui est à l'origine d'une nécrose secondaire (Quiniou *et al.*, 2004). Plus précisément, 24 heures suivant la stimulation de cultures cellulaires endothéliales avec le TXA_2 , les cellules montrent une importante incorporation de PI et le gonflement typique d'une

cellule nécrotique, le tout pouvant être prévenu par l'emploi d'un antagoniste du récepteur TP ou des inhibiteurs de calpaïnes. La même chose est vraie *ex vivo* sur des explants rétiniens de porcelet, alors que l'inhibition des calpaïnes, en particulier celle de la m-calpaïne, prévient la mort cellulaire endothéliale. Dans les heures qui précèdent la perte de l'intégrité membranaire, le ratio bax/bcl-2 augmente alors que la protéine antiapoptotique bcl-2 est complètement dégradée à 18 heures, moment où le cytochrome c est relâché et la production d'ATP cesse (Quiniou *et al.*, 2004).

La perte de l'intégrité membranaire semble donc être due à l'activation de la m-calpaïne par de fortes concentrations de Ca^{2+} . Les calpaïnes ont pour substrats différentes protéines pouvant être clivées sur des résidus cystéine. Parmi elles, on compte des protéines du cytosquelette, ce qui pourrait expliquer le changement de morphologie, alors que le clivage de bcl-2 mène la mitochondrie à sa perte. L'homéostasie cellulaire étant grandement compromise, la cellule meurt par nécrose secondaire due à la perte du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) et la fin de la production d'ATP.

La voie de l'activation des calpaïnes par le Ca^{2+} est un mécanisme plausible qui semble expliquer une partie des effets cytotoxiques dus à l'activation des récepteurs PAF et TP. L'activation des récepteurs PAF et TP contribue à entretenir une production de ROS (Chanez *et al.*, 1990; Kinnula *et al.*, 1992; Matsuo *et al.*, 1996) qui, combinée au NO, peut produire un stress nitrosatif dangereux. La synthèse et les effets du NO sont augmentés durant la période périnatale et le NO présente un effet biphasique durant un stress oxydant selon la durée du stress.

Rôle biphasique du monoxyde d'azote dans la vaso-oblitération

Chez le rat et la souris, dans un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène, on remarque deux effets qui s'opposent concernant le NO. Lors d'une hyperoxie à court terme (P7-P9), le NO semble avoir un effet cytotoxique puisque l'inhibition de sa synthèse prévient presque entièrement la vaso-oblitération (Fig. 1, page 153; (Brooks *et al.*, 2001)). Le rôle joué par eNOS dans ce phénomène est mis en évidence, car seule son expression est modulée par l'hyperoxie et la concentration de nitrites demeure élevée dans un milieu où nNOS et iNOS sont bloquées (Fig. 2A, 2C, page 155). Tout comme c'est le cas dans les cultures cellulaires stimulées avec le TXA₂, la mort cellulaire peut être prévenue par des molécules antioxydantes, plus précisément, un désactiveur d'ions superoxydes (O₂⁻) et un catalyseur de la destruction du peroxynitrite (ONOO⁻) (Fig. 1, page 153). Ceci met en évidence le rôle joué par les ROS dans le développement de la ROP, rôle supporté par des études qui démontrent que la vaso-oblitération induite par l'oxygène peut être atténuée par des antioxydants dans certains modèles animaux (Phelps et Rosenbaum, 1977; Niesman *et al.*, 1997; Penn *et al.*, 1997). Chez les enfants développant la ROP, les niveaux de glutathion réduit sont plus bas que chez les sujets contrôles (Papp *et al.*, 1999). Ceci peut être dû à une activité déficiente de la superoxyde dismutase (SOD) dans la rétine immature. Par exemple, lors d'une hyperoxie, l'activité de la Cu-Zn-SOD est grandement réduite dans la rétine du rat (Niesman *et al.*, 1997). Par contre, cette situation ne prévaut que pour un temps puisque les niveaux se normalisent à la longue, malgré une exposition constante à l'oxygène (Niesman *et al.*, 1997). La même situation est observée dans notre modèle lors d'une hyperoxie de courte durée. Chez le raton, malgré une expression et une activité NOS élevée et constante (Fig. 2C, page 155),

il y a une légère revascularisation à long terme contrastant avec les effets observés à court terme (Fig. 1B, 1F, page 153). L'étude des niveaux de glutathion réduit, malondialdéhyde et nitrotyrosine montre une diminution des défenses antioxydantes et une augmentation des produits de peroxydation à court terme, alors qu'à long terme (P7-P12) et malgré l'hyperoxie, il y a une atténuation du stress oxydatif (Fig. 3A, 3B, 3C, page 157) due en partie à la présence de NO puisque son inhibition augmente la vaso-oblitération (Fig. 1G, page 153).

Dans le cas de la rétinopathie induite par l'oxygène, les effets du NO semblent être modulés par la présence simultanée du NO et de $O_2^{\cdot -}$ qui se combinent et forment le $ONOO^-$ pour créer un stress nitrosatif. Comme le NO est constamment présent en concentration élevée, le potentiel redox de la cellule, principalement dicté par les niveaux de glutathion réduit dans la rétine, entraînera la cellule endothéliale vers la mort ou la survie. Comme le potentiel redox est oxydé à court terme (P7-P9), il y a mort cellulaire, alors que le potentiel plus réduit à long terme (P7-P12) permet à la cellule de se défendre adéquatement contre le stress oxydatif et empêche le développement d'un stress nitrosatif. Le stress nitrosatif, par l'intermédiaire du peroxy-nitrite ($NO + O_2^{\cdot -} \rightarrow ONOO^-$), est en grande partie responsable des effets cytotoxiques du NO sur la cellule endothéliale (Beckman *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 2001) et ne semble être présent que durant les premières journées d'hyperoxie puisqu'il y a une normalisation des niveaux de nitrotyrosine et de peroxydation lipidique à plus long terme (Fig. 3C, page 157). De plus, le traitement à plus long terme avec un mimétique de la SOD ne s'avère pas plus efficace (Fig. 1I, page 153). Une interaction entre le NO et PAF-TXA₂ est donc possible durant la première phase de la maladie impliquant un stress oxydant, un potentiel redox oxydé et

un stress nitrosatif. Durant la période périnatale, qu'il soit prématuré ou non, le nouveau-né a une activité NOS plus élevée (Hardy *et al.*, 1996b). Chez l'enfant né à terme, ayant donc des systèmes antioxydants plus développés pour répondre au stress, la production accrue de NO n'a pas les effets délétères qu'on peut observer sur la rétine du sujet prématuré pour qui la production de NO est encore plus augmentée. Cette production accentuée de NO est peut-être une réponse vasodilatatrice à la synthèse augmentée des vasoconstricteurs PAF et TXA₂. Quoi qu'il en soit, le stress nitrosatif qui s'en suit favorise la toxicité des espèces oxygénées réactives qui contribuent à entretenir une boucle de rétroaction positive pour la synthèse de PAF-TXA₂ (Chanez *et al.*, 1990; Chakraborti *et al.*, 1999). Il est certain que des études supplémentaires portant sur l'influence du stress nitrosatif sur les facteurs de transcriptions impliqués dans la synthèse des récepteurs PAF, TP et de la TX synthase, nous fourniraient de précieuses indications.

Le stress nitrosatif peut affecter directement ou indirectement le fonctionnement normal de plusieurs voies de signalisation dont celle du VEGF par ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Nos données indiquent que l'expression de VEGFR-1 n'est pas régulée par l'hyperoxie ou une inhibition des NOS (Fig. 4, page 158). Par contre, l'expression de VEGFR-2 a une tendance à la baisse au cours d'une hyperoxie à court terme et est grandement régulée lorsqu'il y a inhibition des NOS. Lorsqu'il y a inhibition de NOS à court terme, l'expression de VEGFR-2 est significativement augmentée, alors qu'elle est tout aussi significativement diminuée à long terme (Fig. 4, page 158). La modulation à la hausse de VEGFR-2, ayant des effets proangiogéniques, favoriserait ainsi

la survie à court terme, mais l'inhibition de NOS à long terme et la diminution de l'expression de VEGFR-2 entraînerait un accroissement de la perte microvasculaire.

L'expression de VEGFR-2 est régulée par NF- κ B (Illi *et al.*, 2000) contrairement à VEGFR-1 et VEGF qui sont régulés par HIF (Gerber *et al.*, 1997). Le NF- κ B peut être activé par les ROS et H₂O₂ (Garban et Bonavida, 2001; Michiels *et al.*, 2002). À court terme, alors que l'activité de la SOD est faible et que la concentration de O₂⁻ est élevée, la présence de NO contribue à former un stress nitrosatif qui diminue l'activation de NF- κ B et l'expression de VEGFR-2. L'inhibition de VEGFR-2 contribue ainsi à la cytotoxicité du PAF-TXA₂. Non seulement le stress oxydant, et par le fait même la formation de PAF-TXA₂, inhibent-ils l'expression de VEGFR-2, mais le TXA₂, qui est le joueur central ici, est un puissant antagoniste de la migration et de la différenciation induites par le VEGF sur des cellules endothéliales (Ashton *et al.*, 2004). En plus de contrer l'activation du récepteur VEGF, le TXA₂ peut interagir avec d'autres facteurs de croissance notamment le FGF et son récepteur FGFR-1. Par un mécanisme impliquant la relâche de TSP-1 par le TXA₂, le récepteur FGFR-1 ne peut plus être internalisé et empêche ainsi la migration et l'angiogenèse induites par FGF (Ashton *et al.*, 2004). La TSP-1 est un puissant inhibiteur de l'angiogenèse et il n'est pas exclu qu'une proportion des effets cytotoxiques de PAF-TXA₂ soient attribuables à la synthèse de TSP-1 et l'activation de son récepteur CD36 ou la synthèse d'un autre inhibiteur de l'angiogenèse. En ce sens, le PEDF est le plus puissant inhibiteur de l'angiogenèse rétinienne connu (Tombran-Tink *et al.*, 1991) et pourrait jouer un rôle étant donné que les conditions retrouvées dans la OIR impliquent une régulation à la baisse de VEGF (Alon *et al.*, 1995;

Pierce *et al.*, 1996) et de IGF-1 (Smith *et al.*, 1997b) et une augmentation de l'expression de PEDF (Dawson *et al.*, 1999).

À plus long terme, alors que les systèmes antioxydants normalisent leur activité et participent à la détoxification de la cellule, le stress nitrosatif disparaît et n'interfère plus avec la transcription de VEGFR-2. La survie cellulaire est alors probablement favorisée à long terme par la voie de PI3-K/Akt qui peut être activée (Gerber *et al.*, 1998).

Finalement, il est important de souligner les effets bénéfiques des antioxydants. Par contre, on s'aperçoit que la supplémentation en antioxydants comporte certaines limites. Les expériences décrites au chapitre 3 nous ont permis de comprendre l'état redox de la cellule endothéliale durant le stress oxydant qui en plus, comporte une composante de stress nitrosatif. Les antioxydants ne sont efficaces que lorsqu'il y a présence de peroxydation importante, soit durant la première phase de la rétinopathie induite par l'oxygène. Par conséquent, alors que le potentiel redox de la cellule se réajuste, les antioxydants n'améliorent pas davantage la situation. L'identification de PAF/TXA₂ en tant que médiateurs des dommages à la microvascularisation rétinienne lors du développement de la ROP, nous permet d'être plus précis dans notre intervention et surtout nous permet une action plus prolongée et bénéfique.

Conclusions

- 1) Le thromboxane A₂ (TXA₂) et le facteur d'activation plaquettaire (PAF) sont abondamment produits durant un stress oxydant, tel que l'hyperoxie dans un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR).

- 2) Tel que démontré *in vivo* dans un modèle d'OIR chez le rat, *ex vivo* sur des microvaisseaux fraîchement isolés de rats et de porcs et *in vitro* sur des cellules endothéliales en culture provenant de microvaisseaux cérébraux porcins, le TXA₂ et le PAF, par une synthèse de TXA₂ ont un effet cytotoxique sur la cellule endothéliale.
- 3) Par l'activation de leur récepteur sur la cellule endothéliale, PAFR et TP, le PAF et le TXA₂ respectivement induisent une mort dépendante du dosage et du temps d'exposition qui est spécifique au type cellulaire endothélial, plus précisément aux types neuroendothéliale rétinien et cérébral.
- 4) La mort cellulaire a été caractérisée de plusieurs façons et présente : une perte de l'intégrité membranaire, une relâche de la déshydrogénase lactique, une absence de condensation et fragmentation de l'ADN, un marquage positif des phosphatidylsérines, une absence du clivage de la poly-ADP-ribose polymérase (PARP) et une absence de l'activation des principales caspases impliquées dans l'apoptose, tout ceci dans un laps de temps d'environ 24 heures. Le phénomène atteint son apogée entre 24 à 48 heures et serait intermédiaire entre la nécrose et l'apoptose.
- 5) En plus d'être bloquée par des antagonistes des récepteurs PAF et TP et des inhibiteurs de la TX synthase, la mort induite par le thromboxane est bloquée par des antioxydants, impliquant les ROS dans les mécanismes responsables de la mort cellulaire endothéliale.
- 6) Durant l'hyperoxie, dans un modèle d'OIR chez le rat nouveau-né, l'activité et l'expression de eNOS sont élevées, et ce, malgré la perte d'une partie de la

microvascularisation. Le NO produit par eNOS se combine aux ROS ($O_2^{\cdot-}$) produits par le stress oxydant et qui ne sont plus enlevés par la superoxyde dismutase (SOD). Ceci entraîne un stress nitrosatif et un potentiel redox oxydé à court terme (jour post natal (P)7 à P9) qui régule l'expression de VEGFR-2 à la baisse et contribue à la vaso-oblitération.

- 7) Dans une hyperoxie à long terme (P7 à P12), alors que l'expression et l'activité de eNOS est toujours élevée, la SOD revient à une activité normale et, aidée par le glutathion réduit (GSH), permet le retour à un potentiel redox réduit et à l'élimination des espèces nitrosylées réactives (RNS). L'absence de RNS et la présence de ROS formés par le stress oxydatif toujours présent permettent l'expression de VEGFR-2 et une protection des vaisseaux restants.

Perspectives futures

Les résultats présentés dans cette thèse permettent de croire que la porte s'ouvrira bientôt sur de nouvelles avenues dans le traitement clinique de la pathologie de la rétinopathie du prématuré. Les résultats de recherche fondamentale démontrent une cytotoxicité certaine du TXA_2 sur le tissu vasculaire rétinien. De plus, les résultats démontrés *in vivo* sur le rat nouveau-né soulignent toute la complexité du développement de cette affection, en ce qui a trait à la génération de NO et son effet biphasique dans la dégénérescence ou la cytoprotection de la microvascularisation rétinienne soumise à un stress oxydant constant. Ainsi, des traitements incluant des injections intra-vitrée d'un inhibiteur de la synthèse de TXA_2 et d'antioxydants intégrant les nouvelles connaissances devraient avoir des visées prophylactiques en synchronicité avec la production de NO et

d'espèces oxygénées réactives. L'effort le plus important devrait être concentré dans les premières 24-48 heures suivant une exposition à l'oxygène compte tenu du développement rapide de la maladie.

Il est certain que le phénomène de la mort induite par le TXA₂ demande une investigation plus poussée puisque qu'il s'agit de la toute première évidence d'une mort cellulaire endothéliale par ce médiateur de l'inflammation et de l'agrégation plaquettaire. Une compréhension plus poussée pourrait nous permettre de mieux comprendre des phénomènes très étudiés, tels que l'ischémie-reperfusion et les autres rétinopathies ischémiques. Déjà, nous avons quelques indices sur les mécanismes de mort utilisés par la cellule endothéliale en présence de TXA₂. Ils mettent en évidence de nouvelles voies de signalisation inconnues il y a de ça une décennie à peine. Les résultats préliminaires illustrent toute la complexité du rôle du TXA₂ vis-à-vis la mitochondrie qui est sans contredit la pierre angulaire de ce phénomène de mort. Ces résultats laissent même présager la présence de récepteurs fonctionnels au TXA₂ à la surface de la mitochondrie. La présence de tels récepteurs a d'ailleurs été évoquée dans un récent article qui, par contre, base son hypothèse sur des expériences effectuées sur une lignée de cellules transformées (Fang *et al.*, 2004).

Les médiateurs de la peroxydation lipidique étaient pour la plupart inconnus. Ici, nous avons démontré l'importance de l'ion superoxyde dans le cas précis de la rétinopathie induite par l'oxygène chez le rat nouveau-né. Il n'est pas utopique de penser que ces mêmes mécanismes puissent contribuer au développement de la rétinopathie du diabétique qui présente également une composante de peroxydation lipidique. Ainsi, nous avons mis en évidence l'importance de l'environnement immédiat contribuant à

l'équilibre redox permettant de prévoir la résultante finale. Comme on a pu le constater, lorsqu'on réussit à prévenir la dégénérescence vasculaire rétinienne chez le rat nouveau-né soumis à l'oxygène, les taux de succès sont aux mieux de ~90% d'amélioration, indiquant que les facteurs identifiés ici sont des acteurs importants, mais ils ne sont assurément pas les seuls. Certains de ces médiateurs qui demeurent toujours dans l'ombre pourraient être des facteurs auxquels on commence tout juste à s'intéresser. Par exemple, le PEDF ou la TSP-1 venant contrer les effets angiogéniques de substances telles que le VEGF ou le TF. Quoi qu'il en soit, même si un pas a été effectué dans la bonne direction, beaucoup reste à faire afin de pleinement comprendre les mécanismes impliqués dans le stress oxydant nous permettant de saisir toute la complexité derrière la peroxydation lipidique, telle qu'observée dans la rétinopathie du prématuré.

CHAPITRE 7

Bibliographie

- Abe T, Takeuchi K, Takahashi N, Tsutsumi E, Taniyama Y and Abe K (1995) Rat kidney thromboxane receptor: molecular cloning, signal transduction, and intrarenal expression localization. *J Clin Invest* **96**:657-664.
- Abran D, Dumont I, Hardy P, Peri K, Li DY, Molotchnikoff S, Varma DR and Chemtob S (1997a) 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.
- Abran D, Varma DR and Chemtob S (1995a) Increased thromboxane-mediated contractions of retinal vessels of newborn pigs to peroxides. *Am J Physiol* **268**:H628-632.
- Abran D, Varma DR and Chemtob S (1995b) The retinal vasomotor effects of nitric oxide are greater in the newborn than in the adult pig and are mediated in part by PGI₂. *Pediatr Res* **37**:73A.
- Abran D, Varma DR and Chemtob S (1997b) Regulation of prostanoid vasomotor effects and receptors in choroidal vessels of newborn pigs. *Am J Physiol* **272**:R995-1001.
- Abran D, Varma DR, Li DY and 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.
- Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK and Yeo KT (1994) Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* **118**:445-450.
- Agrawal DK, Ali N and Numao T (1992) PAF receptors and G-proteins in human blood eosinophils and neutrophils. *J Lipid Mediat* **5**:101-104.

- Aiello LP (1997) Vascular endothelial growth factor. 20th-century mechanisms, 21st-century therapies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:1647-1652.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE and *et al.* (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* **331**:1480-1487.
- Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H and Iwamoto MA (1995) Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* **113**:1538-1544.
- Alder VA, Ben-Nun J and Cringle SJ (1990) PO₂ profiles and oxygen consumption in cat retina with an occluded retinal circulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**:1029-1034.
- Alder VA and Cringle SJ (1985) The effect of the retinal circulation on vitreal oxygen tension. *Curr Eye Res* **4**:121-129.
- Alimonti JB, Shi L, Baijal PK and Greenberg AH (2001) Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* **276**:6974-6982.
- Allain CC, Henson CP, Nadel MK and Knoblesdorff AJ (1973) Rapid single-step kinetic colorimetric assay for lactate dehydrogenase in serum. *Clin Chem* **19**:223-227.
- Allan CJ, Higashiura K, Martin M, Morinelli TA, Kurtz DT, Geoffroy O, Meier GP, Gettys TW and Halushka PV (1996) Characterization of the cloned HEL cell thromboxane A₂ receptor: evidence that the affinity state can be altered by G α 13 and G α q. *J Pharmacol Exp Ther* **277**:1132-1139.

- Allison AC (1965) Role of Lysosomes in Oxygen Toxicity. *Nature* **205**:141-143.
- Alloatti G, Montrucchio G and Camussi G (1994) Role of platelet-activating factor (PAF) in oxygen radical-induced cardiac dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* **269**:766-771.
- Alm A and Bill A (1970) Blood flow and oxygen extraction in the cat uvea at normal and high intraocular pressures. *Acta Physiol Scand* **80**:19-28.
- Alm A and Bill A (1972a) The oxygen supply to the retina. I. Effects of changes in intraocular and arterial blood pressures, and in arterial P O₂ and P CO₂ on the oxygen tension in the vitreous body of the cat. *Acta Physiol Scand* **84**:261-274.
- Alm A and Bill A (1972b) The oxygen supply to the retina. II. Effects of high intraocular pressure and of increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. A study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Acta Physiol Scand* **84**:306-319.
- Alm A and Bill A (1992) *Adler's physiology of the eye: Clinical application*. CV Mosby, St.Louis.
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J and Keshet E (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* **1**:1024-1028.
- Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Freeman BA and Radi R (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J Biol Chem* **274**:842-848.
- Alvarez B, Rubbo H, Kirk M, Barnes S, Freeman BA and Radi R (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem Res Toxicol* **9**:390-396.

- Alvi SA, Brown NL, Bennett PR, Elder MG and Sullivan MH (1999) Corticotrophin-releasing hormone and platelet-activating factor induce transcription of the type-2 cyclo-oxygenase gene in human fetal membranes. *Mol Hum Reprod* **5**:476-480.
- Ambler J, Butler KD, Ku EC, Maguire ED, Smith JR and Wallis RB (1985) CGS 12970: a novel, long acting thromboxane synthetase inhibitor. *Br J Pharmacol* **86**:497-504.
- Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Elliott D, Puklin JE and Abrams GW (1997) Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:36-47.
- Ando A, Yang A, Mori K, Yamada H, Yamada E, Takahashi K, Saikia J, Kim M, Melia M, Fishman M, Huang P and Campochiaro PA (2002a) Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol* **191**:116-124.
- Ando A, Yang A, Nambu H and Campochiaro PA (2002b) Blockade of nitric-oxide synthase reduces choroidal neovascularization. *Mol Pharmacol* **62**:539-544.
- Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P and Orkin SH (1993a) Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* **362**:722-728.
- Andrews NC, Kotkow KJ, Ney PA, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Orkin SH (1993b) The ubiquitous subunit of erythroid transcription factor NF-E2 is a small basic-leucine zipper protein related to the v-maf oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:11488-11492.

- Ankoma-Sey V, Wang Y and Dai Z (2000) Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **31**:141-148.
- Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ and Weir EK (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7583-7587.
- Arima S, Ren Y, Juncos LA, Carretero OA and Ito S (1994) Glomerular prostaglandins modulate vascular reactivity of the downstream efferent arterioles. *Kidney Int* **45**:650-658.
- Arita H, Nakano T and Hanasaki K (1989) Thromboxane A₂: its generation and role in platelet activation. *Prog Lipid Res* **28**:273-301.
- Armstead WM, Pourcyrous M, Mirro R, Leffler CW and Busija DW (1988) Platelet activating factor: a potent constrictor of cerebral arterioles in newborn pigs. *Circ Res* **62**:1-7.
- Armstrong D, Augustin AJ, Spengler R, Al-Jada A, Nickola T, Grus F and Koch F (1998) Detection of vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor alpha in epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy and macular pucker. *Ophthalmologica* **212**:410-414.
- Arribas-Gomez I, Duque-Marin I, Perez de Lema G, Diez-Marques ML, Lucio-Cazana J, Rodriguez-Puyol M and Rodriguez-Puyol D (1995) A possible role for platelet-activating factor in the hydrogen peroxide-induced TXB₂ and PGE₂ glomerular synthesis. *J Lipid Res* **36**:260-265.

- Arudi RL, Bielski BH and Allen AO (1984) Search for singlet oxygen luminescence in the disproportionation of HO₂/O₂. *Photochem Photobiol* **39**:703-706.
- Ashkenazi A and Dixit VM (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* **11**:255-260.
- Ashton AW, Cheng Y, Helisch A and Ware JA (2004) Thromboxane A₂ receptor agonists antagonize the proangiogenic effects of fibroblast growth factor-2: role of receptor internalization, thrombospondin-1, and alpha(v)beta3. *Circ Res* **94**:735-742.
- Ashton AW and Ware JA (2004) Thromboxane A₂ Receptor Signaling Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Endothelial Cell Differentiation and Migration. *Circ Res*.
- Ashton AW, Yokota R, John G, Zhao S, Suadiciani SO, Spray DC and Ware JA (1999) Inhibition of endothelial cell migration, intercellular communication, and vascular tube formation by thromboxane A₂. *J Biol Chem* **274**:35562-35570.
- Ashton N (1963) Studies of the Retinal Capillaries in Relation to Diabetic and Other Retinopathies. *Br J Ophthalmol* **47**:521-538.
- Ashton N (1966) Oxygen and the growth and development of retinal vessels. In vivo and in vitro studies. The XX Francis I. Proctor Lecture. *Am J Ophthalmol* **62**:412-435.
- Ashton N (1968) Donders lecture, 1967. Some aspects of the comparative pathology of oxygen toxicity in the retina. *Br J Ophthalmol* **52**:505-531.
- Ashton N (1970) Retinal angiogenesis in the human embryo. *Br Med Bull* **26**:103-106.
- Ashton N and Pedler C (1962) Studies on developing retinal vessels. IX. Reaction of endothelial cells to oxygen. *Brit J Ophthalmol* **46**:257-276.

- Ashton N, Ward B and Serpell G (1953) Role of oxygen in the genesis of retrolental fibroplasia; a preliminary report. *Br J Ophthalmol* **37**:513-520.
- Asmis R and Dennis EA (1994) PAF stimulates cAMP formation in P388D1 macrophage-like cells via the formation and secretion of prostaglandin E2 in an autocrine fashion. *Biochim Biophys Acta* **1224**:295-301.
- Au BT, Williams TJ and Collins PD (1994) Zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils involves activation via the CD11b/CD18 receptor and endogenous platelet-activating factor as an autocrine modulator. *J Immunol* **152**:5411-5419.
- Auricchio A, Behling KC, Maguire AM, O'Connor EM, Bennett J, Wilson JM and Tolentino MJ (2002) Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Mol Ther* **6**:490-494.
- Baeyens DA, Hoffert JR and Fromm PO (1973) A comparative study of oxygen toxicity in the retina, brain and liver of the teleost, amphibian and mammal. *Comp Biochem Physiol A* **45**:925-932.
- Baker RR (1995) Enzymes of platelet activating factor synthesis in brain. *Neurochem Res* **20**:1345-1351.
- Baker RR (2000) Lipid acetylation reactions and the metabolism of platelet-activating factor. *Neurochem Res* **25**:677-683.
- Balabanov R and Dore-Duffy P (1998) Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* **53**:637-644.
- Banks BA, Ischiropoulos H, McClelland M, Ballard PL and Ballard RA (1998) Plasma 3-nitrotyrosine is elevated in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* **101**:870-874.

- Barbaro JF and Zvaifler NJ (1966) Antigen induced histamine release from platelets of rabbits producing homologous PCA antibody. *Proc Soc Exp Biol Med* **122**:1245-1247.
- Barber LA, Spandau DF, Rathman SC, Murphy RC, Johnson CA, Kelley SW, Hurwitz SA and Travers JB (1998) Expression of the platelet-activating factor receptor results in enhanced ultraviolet B radiation-induced apoptosis in a human epidermal cell line. *J Biol Chem* **273**:18891-18897.
- Barnes PJ and Karin M (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* **336**:1066-1071.
- Baudouin C, Imbert F, Ettaiche M and Gastaud P (1995) Evaluation of antiproliferative effects of the somatostatin analogue somatuline in a rabbit model of traction retinal detachment. *Fundam Clin Pharmacol* **9**:357-365.
- Baylis C (1987) Effects of administered thromboxanes on the intact, normal rat kidney. *Ren Physiol* **10**:110-121.
- Bazan HE, Tao Y, DeCoster MA and Bazan NG (1997) Platelet-activating factor induces cyclooxygenase-2 gene expression in corneal epithelium. Requirement of calcium in the signal transduction pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:2492-2501.
- Bazan NG (1989) Metabolism of arachidonic acid in the retina and the retinal pigment epithelium: biological effects of oxygenated metabolites of arachidonic acid, in *The ocular effect of prostaglandins and other eicosanoids* (Bito LZ and Stjernschantz J eds) pp 15-37, Alan R. Liss, New York.

- Bazan NG and Allan G (1996) Platelet-activating factor in the modulation of excitatory amino acid neurotransmitter release and of gene expression. *J Lipid Mediat Cell Signal* **14**:321-330.
- Bazan NG, Squinto SP, Braquet P, Panetta T and Marcheselli VL (1991) Platelet-activating factor and polyunsaturated fatty acids in cerebral ischemia or convulsions: intracellular PAF-binding sites and activation of a fos/jun/AP-1 transcriptional signaling system. *Lipids* **26**:1236-1242.
- Beauchamp MH, Marrache AM, Hou X, Gobeil F, Jr., Bernier SG, Lachapelle P, Abran D, Quiniou C, Brault S, Peri KG, Roberts J, 2nd, Almazan G, Varma DR and Chemtob S (2002) Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:3327-3337.
- Beauchamp MH, Martinez-Bermudez AK, Gobeil F, Jr., Marrache AM, Hou X, Speranza G, Abran D, Quiniou C, Lachapelle P, Roberts J, 2nd, Almazan G, Varma DR and Chemtob S (2001) Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. *J Appl Physiol* **90**:2279-2288.
- Beauchamp MH, Sennlaub F, Speranza G, Gobeil Fj, Checchin D, Kermorvant-Duchemin E, Abran D, Hardy P, Lachapelle P, Varma DR and Chemtob S (2004) Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy. *Free Radic Biol Med* **37**:1885-1894.
- Beckman JS (1990) Ischaemic injury mediator. *Nature* **345**:27-28.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA and Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:1620-1624.

- Beetens JR and Herman AG (1983) Ascorbic acid and prostaglandin formation. *Int J Vitam Nutr Res Suppl* **24**:131-144.
- Behndig A, Svensson B, Marklund SL and Karlsson K (1998) Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**:471-475.
- Benjamin LE, Hemo I and Keshet E (1998) A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125**:1591-1598.
- Bennett A, Wilson DM, Liu F, Nagashima R, Rosenfeld RG and Hintz RL (1983) Levels of insulin-like growth factors I and II in human cord blood. *J Clin Endocrinol Metab* **57**:609-612.
- Bennett SA, Chen J, Pappas BA, Roberts DC and Tenniswood M (1998) Platelet activating factor receptor expression is associated with neuronal apoptosis in an in vivo model of excitotoxicity. *Cell Death Differ* **5**:867-875.
- Benveniste J, Chignard M, Le Couedic JP and Vargaftig BB (1982) Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-ACETHER). II. Involvement of phospholipase A2 in the formation of PAF-ACETHER and lyso-PAF-ACETHER from rabbit platelets. *Thromb Res* **25**:375-385.
- Benveniste J, Henson PM and Cochrane CG (1972) Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med* **136**:1356-1377.
- Bernardi P and Petronilli V (1996) The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* **28**:131-138.

- Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Vinals F, Gothie E, Roux D, Pages G and Pouyssegur J (2000) Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol* **60**:1171-1178.
- Bertolino F, Valentin JP, Maffre M, Jover B, Bessac AM and John GW (1994) Prevention of thromboxane A₂ receptor-mediated pulmonary hypertension by a nonpeptide angiotensin II type 1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **268**:747-752.
- Bettazzoli L, Zirrolli JA, Reidhead CT, Shahgholi M and Murphy RC (1990) Incorporation of arachidonic acid into glycerophospholipids of a murine bone marrow derived mast cell. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **20**:71-78.
- Bhagwat SS, Gude C, Cohen DS, Dotson R, Mathis J, Lee W and Furness P (1993) Thromboxane receptor antagonism combined with thromboxane synthase inhibition. 5. Synthesis and evaluation of enantiomers of 8-[[[4-chlorophenyl)sulfonyl]amino]-4-(3-pyridinylalkyl)octanoic acid. *J Med Chem* **36**:205-210.
- Bhattacharjee P, Kulkarni PS and Eakins KE (1979) Metabolism of arachidonic acid in rabbit ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **18**:172-178.
- Bielski BHJ and Shive GG (1979) Reaction rates of superoxide radicals with the essentials amino acids, in *Oxygen free radicals and tissue damage*, Ciba Found Symp 65, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Bill A (1962) Autonomic nervous control of uveal blood flow. *Acta Physiol Scand* **56**:70-81.

- Bill A (1981) Ocular circulation, in Anonymous Alder's physiology of the eye, in p 191, RA Moses and CV Mosby, St.Louis.
- Bill A and Nilsson SF (1985) Control of ocular blood flow. *J Cardiovasc Pharmacol* **7 Suppl 3**:S96-102.
- Bill A, Sperber G and Ujiie K (1983) Physiology of the choroidal vascular bed. *Int Ophthalmol* **6**:101-107.
- Birkle DL and Bazan NG (1984) Lipoxygenase- and cyclooxygenase-reaction products and incorporation into glycerolipids or radiolabeled arachidonic acid in the bovine retina. *Prostaglandins* **27**:203-216.
- Bito LZ (1977) The physiology and pathophysiology of intraocular fluids. *Exp Eye Res* **25 Suppl**:273-289.
- Bito LZ and Salvador EV (1972) Intraocular fluid dynamics. 3. The site and mechanism of prostaglandin transfer across the blood intraocular fluid barriers. *Exp Eye Res* **14**:233-241.
- Bito LZ and Wallenstein MC (1977) Transport of prostaglandins across the blood-brain and blood-aqueous barriers and the physiological significance of these absorptive transport processes. *Exp Eye Res* **25 Suppl**:229-243.
- Blanchard-Fillion B, Souza JM, Friel T, Jiang GC, Vrana K, Sharov V, Barron L, Schoneich C, Quijano C, Alvarez B, Radi R, Przedborski S, Fernando GS, Horwitz J and Ischiropoulos H (2001) Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite. *J Biol Chem* **276**:46017-46023.
- Bloodworth JM, Jr., Gutgesell HP, Jr. and Engerman RL (1965) Retinal vasculature of the pig. Light and electron microscope studies. *Exp Eye Res* **4**:174-178.

- Boger RH and Bode-Boger SM (2000) Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases. *Semin Thromb Hemost* **26**:539-545.
- Bohme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, Doble A and Blanchard JC (1993) Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:9191-9194.
- Bonventre JV and Koroshetz WJ (1993) Phospholipase A2 (PLA2) activity in gerbil brain: characterization of cytosolic and membrane-associated forms and effects of ischemia and reperfusion on enzymatic activity. *J Lipid Mediat* **6**:457-471.
- Bosca L and Hortelano S (1999) Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal* **11**:239-244.
- Bouayad A, Fouron JC, Hou X, Beauchamp M, Quiniou C, Abran D, Peri K, Clyman RI, Varma DR and Chemtob S (2004) Developmental regulation of prostaglandin E2 synthase in porcine ductus arteriosus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**:R903-909.
- Bougle D, Vert P, Reichart E, Hartemann D and Heng EL (1982) Retinal superoxide dismutase activity in newborn kittens exposed to normobaric hyperoxia: effect of vitamin E. *Pediatr Res* **16**:400-402.
- Bouloumie A, Schini-Kerth VB and Busse R (1999) Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* **41**:773-780.

- Boyer CS, Bannenberg GL, Neve EP, Ryrfeldt A and Moldeus P (1995) Evidence for the activation of the signal-responsive phospholipase A2 by exogenous hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* **50**:753-761.
- Brannon TS, North AJ, Wells LB and 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.
- Braquet P, Spinnewyn B, Braquet M, Bourgain RH, Taylor JE, Étienne A and Drieu K (1985) BN 52021 and related compounds: A new series of highly specific PAF-acether antagonists isolated from Ginkgo Biloba. *Blood Vessels* **16**:559-572.
- Braquet P, Touqui L, Shen TY and Vargaftig BB (1987) Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol Rev* **39**:97-145.
- Brass LF, Shaller CC and Belmonte EJ (1987) Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *J Clin Invest* **79**:1269-1275.
- Braun N, Brendel P and Zimmermann H (1995) Distribution of 5'-nucleotidase in the developing mouse retina. *Brain Res Dev Brain Res* **88**:79-86.
- Braunagel SC, Xiao JG and Chiou GC (1988) The potential role of adenosine in regulating blood flow in the eye. *J Ocul Pharmacol* **4**:61-73.
- Bredt DS and Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* **63**:175-195.

- Brighton CT and Hunt RM (1986) Ultrastructure of electrically induced osteogenesis in the rabbit medullary canal. *J Orthop Res* 4:27-36.
- Brooks SE, Gu X, Samuel S, Marcus DM, Bartoli M, Huang PL and Caldwell RB (2001) Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:222-228.
- Bruinink A, Dawis S, Niemeyer G and Lichtensteiger W (1986) Catecholaminergic binding sites in cat retina, pigment epithelium and choroid. *Exp Eye Res* 43:147-151.
- Brush MD (2000) Recourse to death. A bevy of new products harnesses the power of flow cytometry for detecting apoptosis. *The Scientist* 14:25-29.
- Bucher M, Sandner P, Wolf K and Kurtz A (1996) Cobalt but not hypoxia stimulates PDGF gene expression in rats. *Am J Physiol* 271:E451-457.
- Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS, Chang TS and Snyder SH (1992) Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 257:401-403.
- Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R and Hermann RS (1996) Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17:1595-1607.
- Busse R, Fleming I and Schini VB (1995) Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and functional implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 196:7-18.
- Bussolino F, Arese M, Silvestro L, Soldi R, Benfenati E, Sanavio F, Aglietta M, Bosia A and Camussi G (1994) Involvement of a serine protease in the synthesis of

platelet-activating factor by endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha or interleukin-1 alpha. *Eur J Immunol* **24**:3131-3139.

Bussolino F, Breviario F, Tetta C, Aglietta M, Mantovani A and Dejana E (1986) Interleukin 1 stimulates platelet-activating factor production in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* **77**:2027-2033.

Bussolino F and Camussi G (1995) Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties. *Eur J Biochem* **229**:327-337.

Bussolino F, Camussi G, Aglietta M, Braquet P, Bosia A, Pescarmona G, Sanavio F, D'Urso N and Marchisio PC (1987) Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures. *J Immunol* **139**:2439-2446.

Bussolino F, Camussi G and Baglioni C (1988) Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 alpha. *J Biol Chem* **263**:11856-11861.

Cai Y, Han M, Luo L, Song W and Zhou X (1996) Increased expression of PDGF and c-myc genes in lungs and pulmonary arteries of pulmonary hypertensive rats induced by hypoxia. *Chin Med Sci J* **11**:152-156.

Camougrand N, Grelaud-Coq A, Marza E, Priault M, Bessoule JJ and Manon S (2003) The product of the UTH1 gene, required for Bax-induced cell death in yeast, is involved in the response to rapamycin. *Mol Microbiol* **47**:495-506.

- Campbell WB (1990) Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet activating factor, in *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Gileman AG, Rall TW, Nies AS and Taylor P eds) pp 600-617, Pergamon Press, New York.
- Campochiaro PA (2000) Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* **184**:301-310.
- Campochiaro PA and Sen HA (1989) Adenosine and its agonists cause retinal vasodilation and hemorrhages. Implications for ischemic retinopathies. *Arch Ophthalmol* **107**:412-416.
- Camussi G, Aglietta M, Malavasi F, Tetta C, Piacibello W, Sanavio F and Bussolino F (1983) The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. *J Immunol* **131**:2397-2403.
- Camussi G, Bussolino F, Salvidio G and Baglioni C (1987) Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J Exp Med* **166**:1390-1404.
- Cao Z, Kelly DJ, Cox A, Casley D, Forbes JM, Martinello P, Dean R, Gilbert RE and Cooper ME (2000) Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. *Kidney Int* **58**:2437-2451.
- Caplan M, Hsueh W, Kelly A and Donovan M (1990) Serum PAF acetylhydrolase increases during neonatal maturation. *Prostaglandins* **39**:705-714.

- Caplan MS, Lickerman M, Adler L, Dietsch GN and Yu A (1997a) The role of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* **42**:779-783.
- Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Lickerman M and Hsueh W (1997b) The platelet-activating factor receptor antagonist WEB 2170 prevents neonatal necrotizing enterocolitis in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **24**:296-301.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W and Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**:435-439.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D and Dejana E (1999) Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**:147-157.
- Carty E, Nickols C, Feakins RM and Rampton DS (2002) Thromboxane synthase immunohistochemistry in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* **55**:367-370.
- Catella F, Healy D, Lawson JA and FitzGerald GA (1986) 11-Dehydrothromboxane B₂: a quantitative index of thromboxane A₂ formation in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5861-5865.

- Ceccarelli F, Rosa Mazzoni M and Chakravarthy U (2001) Binding characteristics of ET receptors in retinal pericytes and effects of high glucose incubation. *Curr Eye Res* **23**:263-270.
- Chakraborti S, Gurtner GH and Michael JR (1989) Oxidant-mediated activation of phospholipase A2 in pulmonary endothelium. *Am J Physiol* **257**:L430-437.
- Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S and Chakraborti S (1999) Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* **11**:77-85.
- Chakravarthy U and Gardiner TA (1999) Endothelium-derived agents in pericyte function/dysfunction. *Prog Retin Eye Res* **18**:511-527.
- Chakravarthy U, Stitt AW, McNally J, Bailie JR, Hoey EM and Duprex P (1995) Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Curr Eye Res* **14**:285-294.
- Chan JY, Han XL and Kan YW (1993) Isolation of cDNA encoding the human NF-E2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:11366-11370.
- Chanez P, Dent G, Yukawa T, Barnes PJ and Chung KF (1990) Generation of oxygen free radicals from blood eosinophils from asthma patients after stimulation with PAF or phorbol ester. *Eur Respir J* **3**:1002-1007.
- Chan-Ling T and J. S (1992) Retinopathy of prematurity: origins in the architecture of the retina. *Prog Retin Eye Res* **12**:155-178.
- Chan-Ling T, McLeod DS, Hughes S, Baxter L, Chu Y, Hasegawa T and Luttly GA (2004) Astrocyte-endothelial cell relationships during human retinal vascular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:2020-2032.

- Chan-Ling TL, Halasz P and Stone J (1990) Development of retinal vasculature in the cat: processes and mechanisms. *Curr Eye Res* **9**:459-478.
- Chao W, Liu H, Hanahan DJ and Olson MS (1992) Platelet-activating factor-stimulated protein tyrosine phosphorylation and eicosanoid synthesis in rat Kupffer cells. Evidence for calcium-dependent and protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* **267**:6725-6735.
- Chao W and Olson MS (1993) Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J* **292** (Pt 3):617-629.
- Chaturvedi N, Sjolie AK, Stephenson JM, Abrahamian H, Keipes M, Castellarin A, Rogulja-Pepeonik Z and Fuller JH (1998) Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet* **351**:28-31.
- Checchin D, Hou X, Hardy P, Abran D, Najarian T, Beauchamp MH, Bernier SG, Gobeil F, Jr., Quiniou C, Varma DR and Chemtob S (2002) PGE(2)-mediated eNOS induction in prolonged hypercapnia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:1558-1566.
- Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR and Aranda JV (1991) Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**:1799-1807.
- Chemtob S, Hardy P, Abran D, Li DY, Peri K, Cuzzani O and Varma DR (1995) Peroxide-cyclooxygenase interactions in postasphyxial changes in retinal and choroidal hemodynamics. *J Appl Physiol* **78**:2039-2046.

- Chemtob S, Roy MS, Abran D, Fernandez H and Varma DR (1993) Prevention of postasphyxial increase in lipid peroxides and retinal function deterioration in the newborn pig by inhibition of cyclooxygenase activity and free radical generation. *Pediatr Res* **33**:336-340.
- Chen W, Hunt DM, Lu H and Hunt RC (1999) Expression of antioxidant protective proteins in the rat retina during prenatal and postnatal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:744-751.
- Chiang KT, Shinyashiki M, Switzer CH, Valentine JS, Gralla EB, Thiele DJ and Fukuto JM (2000) Effects of nitric oxide on the copper-responsive transcription factor Ace1 in *Saccharomyces cerevisiae*: cytotoxic and cytoprotective actions of nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* **377**:296-303.
- Chiang N, Kan WM and Tai HH (1996) Site-directed mutagenesis of cysteinyl and serine residues of human thromboxane A2 receptor in insect cells. *Arch Biochem Biophys* **334**:9-17.
- Chiang N and Tai HH (1998) The role of N-glycosylation of human thromboxane A2 receptor in ligand binding. *Arch Biochem Biophys* **352**:207-213.
- Chillon JM, Ghoneim S and Baumbach GL (1997) Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on cerebral arterioles in rats. *Hypertension* **30**:1097-1104.
- Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S and Esumi H (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* **15**:437-442.

- Chinery R, Beauchamp RD, Shyr Y, Kirkland SC, Coffey RJ and Morrow JD (1998) Antioxidants reduce cyclooxygenase-2 expression, prostaglandin production, and proliferation in colorectal cancer cells. *Cancer Res* **58**:2323-2327.
- Christie PE and Henderson WR, Jr. (2002) Lipid inflammatory mediators: leukotrienes, prostaglandins, platelet-activating factor. *Clin Allergy Immunol* **16**:233-254.
- Christopherson KS and Brecht DS (1997) Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest* **100**:2424-2429.
- Chu KM, Gerber JG and Nies AS (1988) Local vasodilator effect of platelet activating factor in the gastric, mesenteric and femoral arteries of the dog. *J Pharmacol Exp Ther* **246**:996-1000.
- Chua CC, Hamdy RC and Chua BH (1998) Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1401**:187-194.
- Chung KF, Aizawa H, Leikauf GD, Ueki IF, Evans TW and Nadel JA (1986) Airway hyperresponsiveness induced by platelet-activating factor: role of thromboxane generation. *J Pharmacol Exp Ther* **236**:580-584.
- Chung O, Kuhl H, Stoll M and Unger T (1998) Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney Int Suppl* **67**:S95-99.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM and Stern DM (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**:3527-3561.

- Clancy RM, Leszczynska-Piziak J and Abramson SB (1992) Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* **90**:1116-1121.
- Claud EC, Li D, Xiao Y, Caplan MS and Jilling T (2002) Platelet-activating factor regulates chloride transport in colonic epithelial cell monolayers. *Pediatr Res* **52**:155-162.
- Claxton S and Fruttiger M (2003) Role of arteries in oxygen induced vaso-obliteration. *Exp Eye Res* **77**:305-311.
- Cocks TM and Angus JA (1983) Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature* **305**:627-630.
- Coeffier E, Borrel MC, Lefort J, Chignard M, Broquet C, Heymans F, Godfroid JJ and Vargaftig BB (1986) Effects of PAF-acether and structural analogues on platelet activation and bronchoconstriction in guinea-pigs. *Eur J Pharmacol* **131**:179-188.
- Cogan DG and Kuwabara T (1963) Capillary Shunts in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* **12**:293-300.
- Cogan DG, Toussaint D and Kuwabara T (1961) Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* **66**:366-378.
- Cohen RA, Shepherd JT and Vanhoutte PM (1983) Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* **221**:273-274.
- Coleman RA, Humphrey PP, Kennedy I, Levy GP and Lumley P (1981) Comparison of the actions of U-46619, a prostaglandin H₂-analogue, with those of prostaglandin H₂ and thromboxane A₂ on some isolated smooth muscle preparations. *Br J Pharmacol* **73**:773-778.

- Columbano A (1995) Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem* **58**:181-190.
- Cook HW and Lands WE (1975) Evidence for an activating factor formed during prostaglandin biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **65**:464-471.
- Cooper ME, Bonnet F, Oldfield M and Jandeleit-Dahm K (2001) Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J Hypertens* **14**:475-486.
- Corl CM, Cao YZ, Cohen ZS and Sordillo LM (2003) Oxidant stress enhances Lyso-PAF-AcT activity by modifying phospholipase D and phosphatidic acid in aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **302**:610-614.
- Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T and Luscher TF (1998) Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* **101**:1530-1537.
- Cotran R, Kumar V and Robbins S (1994) Cellular injury and cellular death, in *Robbins Pathologic Basis for Disease* (Schoen E ed) pp 11-12, W. B. Saunders Company, Pennsylvania, U.S.A.
- Crapo JD (1986) Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu Rev Physiol* **48**:721-731.
- Craven PA, Studer RK and DeRubertis FR (1996) Thromboxane/prostaglandin endoperoxide-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells is signaled by protein kinase C-dependent increases in transforming growth factor-beta. *Hypertension* **28**:169-176.

- Crocker DJ, Murad TM and Geer JC (1970) Role of the pericyte in wound healing. An ultrastructural study. *Exp Mol Pathol* **13**:51-65.
- Crompton M (2000) Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* **529 Pt 1**:11-21.
- Crouch MF and Lapetina EG (1988) A role for Gi in control of thrombin receptor-phospholipase C coupling in human platelets. *J Biol Chem* **263**:3363-3371.
- Crow JP, Sampson JB, Zhuang Y, Thompson JA and Beckman JS (1997) Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J Neurochem* **69**:1936-1944.
- Cunha-Vaz JG (2004) The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res* **78**:715-721.
- Daemen FJ (1973) Vertebrate rod outer segment membranes. *Biochim Biophys Acta* **300**:255-288.
- Dai FX, Skopec J, Diederich A and Diederich D (1992) Prostaglandin H2 and thromboxane A2 are contractile factors in intrarenal arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **19**:795-798.
- D'Amore PA and Sweet E (1987) Effects of hyperoxia on microvascular cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* **23**:123-128.
- D'Angelo DD, Eubank JJ, Davis MG and Dorn GW, 2nd (1996a) Mutagenic analysis of platelet thromboxane receptor cysteines. Roles in ligand binding and receptor-effector coupling. *J Biol Chem* **271**:6233-6240.

- D'Angelo DD, Terasawa T, Carlisle SJ, Dorn GW, 2nd and Lynch KR (1996b) Characterization of a rat kidney thromboxane A₂ receptor: high affinity for the agonist ligand I-BOP. *Prostaglandins* **52**:303-316.
- Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC and Marnett LJ (1999) Thromboxane A₂ is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* **59**:4574-4577.
- Datta SR, Brunet A and Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* **13**:2905-2927.
- Davie EW, Fujikawa K and Kisiel W (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **30**:10363-10370.
- Davies KJ (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* **262**:9895-9901.
- Davies MH, Eubanks JP and Powers MR (2003) Increased retinal neovascularization in Fas ligand-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:3202-3210.
- Davis KL, Martin E, Turko IV and Murad F (2001) Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:203-236.
- Dawson DA (1994) Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **6**:299-324.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W and Bouck NP (1999) Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* **285**:245-248.

- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM and Snyder SH (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:7797-7801.
- de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG and Sixma JJ (1992) Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* **85**:2284-2290.
- de Haas GH, Postema NM, Nieuwenhuizen W and van Deenen LL (1968) Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim Biophys Acta* **159**:118-129.
- Dejana E, Corada M and Lampugnani MG (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* **9**:910-918.
- Del Maestro RF (1980) An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* **492**:153-168.
- Delmelle M (1979) Possible implication of photooxidation reactions in retinal photo-damage. *Photochem Photobiol* **29**:713-716.
- Dembinska O, Rojas LM, Chemtob S and Lachapelle P (2002) Evidence for a brief period of enhanced oxygen susceptibility in the rat model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:2481-2490.
- Dembinska O, Rojas LM, Varma DR, Chemtob S and Lachapelle P (2001) Graded contribution of retinal maturation to the development of oxygen-induced retinopathy in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:1111-1118.

- Demir T, Celiker UO, Kukner A, Mogulkoc R, Celebi S and Celiker H (1999) Effect of Octreotide on experimental corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* **77**:386-390.
- Dennis EA, Rhee SG, Billah MM and Hannun YA (1991) Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J* **5**:2068-2077.
- Desai KM, Sessa WC and Vane JR (1991) Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* **351**:477-479.
- Deussen A, Sonntag M and Vogel R (1993) L-arginine-derived nitric oxide: a major determinant of uveal blood flow. *Exp Eye Res* **57**:129-134.
- Dhar A, Paul AK and Shukla SD (1990) Platelet-activating factor stimulation of tyrosine kinase and its relationship to phospholipase C in rabbit platelets: studies with genistein and monoclonal antibody to phosphotyrosine. *Mol Pharmacol* **37**:519-525.
- DiBenedetto FE and Bito LZ (1980) The kinetics and energy dependence of prostaglandin transport processes. I. In vitro studies on the rate of PGF₂ alpha accumulation by the rabbit anterior uvea. *Exp Eye Res* **30**:175-182.
- DiBenedetto FE and Bito LZ (1986) Transport of prostaglandins and other eicosanoids by the choroid plexus: its characterization and physiological significance. *J Neurochem* **46**:1725-1731.
- Dillon PK, Ritter AB and Duran WN (1988) Vasoconstrictor effects of platelet-activating factor in the hamster cheek pouch microcirculation: dose-related relations and pathways of action. *Circ Res* **62**:722-731.

- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**:601-605.
- Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M and Zeiher AM (1997) Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* **185**:601-607.
- DiPalma T, Tucci M, Russo G, Maglione D, Lago CT, Romano A, Saccone S, Della Valle G, De Gregorio L, Dragani TA, Viglietto G and Persico MG (1996) The placenta growth factor gene of the mouse. *Mamm Genome* **7**:6-12.
- Dobson V, Quinn GE, Saunders RA, Spencer R, Davis BR, Risser J and Palmer EA (1995) Grating visual acuity in eyes with retinal residua of retinopathy of prematurity. The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Arch Ophthalmol* **113**:1172-1177.
- Domingo MT, Spinnewyn B, Chabrier PE and Braquet P (1988) Presence of specific binding sites for platelet-activating factor (PAF) in brain. *Biochem Biophys Res Commun* **151**:730-736.
- Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM and Venkatachalam MA (1997) Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* **151**:1205-1213.
- Dorn GW, 2nd and Davis MG (1992) Differential megakaryocytic desensitization to platelet agonists. *Am J Physiol* **263**:C864-872.

- Dorn GW, 2nd, Liel N, Trask JL, Mais DE, Assey ME and Halushka PV (1990) Increased platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **81**:212-218.
- Doukas J, Hechtman HB and Shepro D (1988) Endothelial-secreted arachidonic acid metabolites modulate polymorphonuclear leukocyte chemotaxis and diapedesis in vitro. *Blood* **71**:771-779.
- Drixler TA, Rinkes IH, Ritchie ED, Treffers FW, van Vroonhoven TJ, Gebbink MF and Voest EE (2001) Angiostatin inhibits pathological but not physiological retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:3325-3330.
- Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, Miyagi M, Youngman E, Mori K, Katai M, Yan L, Suzuma K, West K, Davarya S, Tong P, Gehlbach P, Pearlman J, Crabb JW, Aiello LP, Campochiaro PA and Zack DJ (2002) Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:821-829.
- Duhault J, Harley E, Lonchamp M, Félétou M, Chamorro S and Koenig-Bérard E (1998) Retinal diabetic complications, mechanisms and potential targets. *Actual Chim Ther* **24**:139-174.
- Dumont I, Hou X, Hardy P, Peri KG, Beauchamp M, Najarian T, Molotchnikoff S, Varma DR and Chemtob S (1999) Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vessels of newborn pig by prostaglandin E₂. *J Pharmacol Exp Ther* **291**:627-633.
- Dunn WA, Jr. (1990a) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* **110**:1923-1933.

- Dunn WA, Jr. (1990b) Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* **110**:1935-1945.
- Duvall E, Wyllie AH and Morris RG (1985) Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* **56**:351-358.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M and Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* **146**:1029-1039.
- Ehinger B (1966) Distribution of adrenergic nerves in the eye and some related structures in the cat. *Acta Physiol Scand* **66**:123-128.
- Eldred WD (2000) Nitric oxide in the retina, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Functional Neuroanatomy of the Nitric Oxide System* (H.W.M. Steinbusch JDVaSRV ed) pp 111-112, Elsevier Science B.V., New York.
- Elena PP, Kosina-Boix M, Moulin G and Lapalus P (1987) Autoradiographic localization of beta-adrenergic receptors in rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **28**:1436-1441.
- Ellis HM and Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**:817-829.
- Engerman RL and Meyer RK (1965) Development of retinal vasculature in rats. *Am J Ophthalmol* **60**:628-641.
- Eperon G, Johnson M and David NJ (1975) The effect of arterial PO₂ on relative retinal blood flow in monkeys. *Invest Ophthalmol* **14**:342-352.

- Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L and Beckman JS (1998) Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci* **18**:923-931.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL and Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**:2207-2216.
- Fang KM, Shu WH, Chang HC, Wang JJ, Mak OT (2004) Study of prostaglandin receptors in mitochondria on apoptosis of human lung carcinoma cell line A549. *Biochemical Society Transactions* **32**:1078-80.
- Farquhar MG and Palade GE (1962) Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus. *J Cell Biol* **13**:55-87.
- Fernandez-Gallardo S, Ortega MP, Priego JG, de Casa-Juana MF, Sunkel C and Sanchez Crespo M (1990) Pharmacological actions of PCA 4248, a new platelet-activating factor receptor antagonist: in vivo studies. *J Pharmacol Exp Ther* **255**:34-39.
- Ferrara N (2000) Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* **55**:15-35; discussion 35-16.
- Ferrara N and Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**:4-25.
- Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**:669-676.
- Ferrara N and Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161**:851-858.

- Ferrari-Dileo G, Davis EB and Anderson DR (1992) Effects of cholinergic and adrenergic agonists on adenylate cyclase activity of retinal microvascular pericytes in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**:42-47.
- Fessel JP and Roberts LJ 2nd (2005) Isofurans: novel products of lipid peroxidation that define the occurrence of oxidant injury in settings of elevated oxygen tension. *Antioxid Redox Signal* **7**:202-209.
- Fessel JP, Hulette C, Powell S, Roberts LJ 2nd, Zhang J (2003) Isofurans, but not F2-isoprostanes, are increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease and with dementia with Lewy body disease. *J Neurochem* **85**:645-650.
- Fessel JP, Porter NA, Moore KP, Sheller JR and Roberts LJ 2nd (2002) Discovery of lipid peroxidation products formed in vivo with a substituted tetrahydrofuran ring (isofurans) that are favored by increased oxygen tension. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:16713-16718.
- Findlay SR, Lichtenstein LM, Hanahan DJ and Pinckard RN (1981) Contraction of guinea pig ileal smooth muscle by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *Am J Physiol* **241**:C130-133.
- Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F and FitzGerald GA (1986) Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* **315**:983-989.
- FitzGerald GA, Healy C and Daugherty J (1987) Thromboxane A2 biosynthesis in human disease. *Fed Proc* **46**:154-158.
- Flaherty JT and Weisfeldt ML (1988) Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* **5**:409-419.

- Flower RW (1990) Perinatal ocular physiology and ROP in the experimental animal model. *Doc Ophthalmol* **74**:153-162.
- Flower RW, Fryczkowski AW and McLeod DS (1995) Variability in choriocapillaris blood flow distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**:1247-1258.
- Flower RW, McLeod DS, Wajer SD, Sendi GS, Egner PG and Dubin NH (1984) Prostaglandins as mediators of vasotonia in the immature retina. *Pediatrics* **73**:440-444.
- Flynn JT, Bancalari E, Bachynski BN, Buckley EB, Bawol R, Goldberg R, Cassady J, Schiffman J, Feuer W, Gillings D and *et al.* (1987) Retinopathy of prematurity. Diagnosis, severity, and natural history. *Ophthalmology* **94**:620-629.
- Flynn JT, Bancalari E, Snyder ES, Goldberg RN, Feuer W, Cassady J, Schiffman J, Feldman HI, Bachynski B, Buckley E and *et al.* (1992) A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* **326**:1050-1054.
- Ford-Hutchinson AW, Girard Y, Lord A, Jones TR, Cirino M, Evans JF, Gillard J, Hamel P, Leveille C, Masson P and *et al.* (1989) The pharmacology of L-670,596, a potent and selective thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol* **67**:989-993.
- Forrester J, Dick A, Mcmenamin P and Lee W (1996) *The Eye, Basic Sciences in Practice*. Harcourt Brace and Company Limited.
- Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M and Murad F (1991) Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is

present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells.

Proc Natl Acad Sci U S A **88**:1788-1792.

Fox NE, Hapner SJ and van Kuijk FJGM (1995) Immunohistochemical analyses of xanthine oxidase in bovine and human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**:S521.

Frank L and Sosenko IR (1987a) Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: possible implications for the prematurely born infant. *J Pediatr* **110**:9-14.

Frank L and Sosenko IR (1987b) Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species. *J Pediatr* **110**:106-110.

Frank L and Sosenko IR (1991) Failure of premature rabbits to increase antioxidant enzymes during hyperoxic exposure: increased susceptibility to pulmonary oxygen toxicity compared with term rabbits. *Pediatr Res* **29**:292-296.

Frank RN, Dutta S and Mancini MA (1987) Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **28**:1086-1091.

Frank S, Madlener M, Pfeilschifter J and Werner S (1998) Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol* **111**:1058-1064.

Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Schaffner C and Pfeilschifter J (1999) Differential regulation of vascular endothelial growth factor and its receptor fms-like-tyrosine kinase is mediated by nitric oxide in rat renal mesangial cells. *Biochem J* **338** (Pt 2):367-374.

- Freyberger H, Brocker M, Yakut H, Hammer J, Effert R, Schifferdecker E, Schatz H and Derwahl M (2000) Increased levels of platelet-derived growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **108**:106-109.
- Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**:875-880.
- Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S and Chereah DA (1996) Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9764-9769.
- Fruttiger M (2002) Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:522-527.
- Fruttiger M, Calver AR, Kruger WH, Mudhar HS, Michalovich D, Takakura N, Nishikawa S and Richardson WD (1996) PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* **17**:1117-1131.
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A and Needleman P (1990) The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* **265**:16737-16740.
- Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL and Jain RK (2001) Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2604-2609.
- Furchgott RF (1990) The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand* **139**:257-270.

- Furchgott RF and Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**:373-376.
- Gallo JE, Holmstrom G, Kugelberg U, Hedquist B and Lennerstrand G (1991) Regressed retinopathy of prematurity and its sequelae in children aged 5-10 years. *Br J Ophthalmol* **75**:527-531.
- Gamble JR, Khew-Goodall Y and Vadas MA (1993) Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol* **150**:4494-4503.
- Gao Y, Tang S, Zhou S and Ware JA (2001) The thromboxane A2 receptor activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C-dependent Gi coupling and Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:426-433.
- Gao Y, Yokota R, Tang S, Ashton AW and Ware JA (2000) Reversal of angiogenesis in vitro, induction of apoptosis, and inhibition of AKT phosphorylation in endothelial cells by thromboxane A(2). *Circ Res* **87**:739-745.
- Garban HJ and Bonavida B (2001) Nitric oxide disrupts H2O2-dependent activation of nuclear factor kappa B. Role in sensitization of human tumor cells to tumor necrosis factor-alpha -induced cytotoxicity. *J Biol Chem* **276**:8918-8923.
- Garbers DL (1992) Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* **71**:1-4.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A and Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* **392**:821-824.

- Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE and Sessa WC (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6448-6453.
- Gardner T W, Lieth E, Khin, SA, Barber, AJ, Bonsall DJ, Leshner T, Rice K and Brennan Jr WA (1997) Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vision Sci* **38**:2423-2427.
- Garg UC and Hassid A (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **83**:1774-1777.
- Garthwaite J, Charles SL and Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* **336**:385-388.
- Gasic AC, McGuire G, Krater S, Farhood AI, Goldstein MA, Smith CW, Entman ML and Taylor AA (1991) Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induces ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. *Circulation* **84**:2154-2166.
- Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**:493-501.
- Gerber HP, Condorelli F, Park J and Ferrara N (1997) Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **272**:23659-23667.

- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V and Ferrara N (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* **273**:30336-30343.
- Gerhardt H, Liebner S, Redies C and Wolburg H (1999) N-cadherin expression in endothelial cells during early angiogenesis in the eye and brain of the chicken: relation to blood-retina and blood-brain barrier development. *Eur J Neurosci* **11**:1191-1201.
- Ghafourifar P, Bringold U, Klein SD and Richter C (2001) Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. *Biol Signals Recept* **10**:57-65.
- Ghiso N, Rohan RM, Amano S, Garland R and Adamis AP (1999) Suppression of hypoxia-associated vascular endothelial growth factor gene expression by nitric oxide via cGMP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:1033-1039.
- Gibson DL, Sheps SB, Uh SH, Schechter MT and McCormick AQ (1990) Retinopathy of prematurity-induced blindness: birth weight-specific survival and the new epidemic. *Pediatrics* **86**:405-412.
- Gidday JM and Park TS (1993) Microcirculatory responses to adenosine in the newborn pig retina. *Pediatr Res* **33**:620-627.
- Gidday JM and Zhu Y (1995) Nitric oxide does not mediate autoregulation of retinal blood flow in newborn pig. *Am J Physiol* **269**:H1065-1072.
- Gilbert C, Rahi J, Eckstein M, O'Sullivan J and Foster A (1997) Retinopathy of prematurity in middle-income countries. *Lancet* **350**:12-14.

- Gillespie JS and Sheng H (1988) Influence of haemoglobin and erythrocytes on the effects of EDRF, a smooth muscle inhibitory factor, and nitric oxide on vascular and non-vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* **95**:1151-1156.
- Gil-Parrado S, Fernandez-Montalvan A, Assfalg-Machleidt I, Popp O, Bestvater F, Holloschi A, Knoch TA, Auerswald EA, Welsh K, Reed JC, Fritz H, Fuentes-Prior P, Spiess E, Salvesen GS and Machleidt W (2002) Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem* **277**:27217-27226.
- Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL and Rosenfeld RG (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* **80**:1548-1555.
- Giulivi C, Poderoso JJ and Boveris A (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* **273**:11038-11043.
- Gliki G, Wheeler-Jones C and Zachary I (2002) Vascular endothelial growth factor induces protein kinase C (PKC)-dependent Akt/PKB activation and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediates PKC delta phosphorylation: role of PKC in angiogenesis. *Cell Biol Int* **26**:751-759.
- Gnanapandithen K, Chen Z, Kau CL, Gorczynski RM and Marsden PA (1996) Cloning and characterization of murine endothelial constitutive nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta* **1308**:103-106.
- Godecke A, Heinicke T, Kamkin A, Kiseleva I, Strasser RH, Decking UK, Stumpe T, Isenberg G and Schrader J (2001) Inotropic response to beta-adrenergic receptor

- stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts. *J Physiol* **532**:195-204.
- Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV and Lassmann H (1994) Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* **71**:219-225.
- Goldman G, Welbourn R, Valeri CR, Shepro D and Hechtman HB (1991) Thromboxane A₂ induces leukotriene B₄ synthesis that in turn mediates neutrophil diapedesis via CD 18 activation. *Microvasc Res* **41**:367-375.
- Goldstein RE, Feuerstein GZ, Bradley LM, Stambouly JJ, Laurindo FR and Davenport NJ (1991) Cardiovascular effects of platelet-activating factor. *Lipids* **26**:1250-1256.
- Gomez-Cambroner J, Wang E, Johnson G, Huang CK and Sha'afi RI (1991) Platelet-activating factor induces tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J Biol Chem* **266**:6240-6245.
- Gonzalez-Crussi F and Hsueh W (1983) Experimental model of ischemic bowel necrosis. The role of platelet-activating factor and endotoxin. *Am J Pathol* **112**:127-135.
- Goureau O, Lepoivre M, Becquet F and Courtois Y (1993) Differential regulation of inducible nitric oxide synthase by fibroblast growth factors and transforming growth factor beta in bovine retinal pigmented epithelial cells: inverse correlation with cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:4276-4280.
- Granstam E, Wang L and Bill A (1992) Ocular effects of endothelin-1 in the cat. *Curr Eye Res* **11**:325-332.

- Grant MB, Tarnuzzer RW, Caballero S, Ozeck MJ, Davis MI, Spoerri PE, Feoktistov I, Biaggioni I, Shryock JC and Belardinelli L (1999) Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. *Circ Res* **85**:699-706.
- Green D and Kroemer G (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* **8**:267-271.
- Greenlund LJ, Deckwerth TL and Johnson EM, Jr. (1995) Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* **14**:303-315.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD and Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **74**:1141-1148.
- Griffioen AW and Molema G (2000) Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* **52**:237-268.
- Grosser T, Zucker TP, Weber AA, Schulte K, Sachinidis A, Vetter H and Schror K (1997) Thromboxane A₂ induces cell signaling but requires platelet-derived growth factor to act as a mitogen. *Eur J Pharmacol* **319**:327-332.
- Grover GJ, Sleph PG and Parham C (1988) The role of thromboxane A₂ in reperfusion injury. *Proc Soc Exp Biol Med* **188**:504-508.
- Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF and Malinski T (1995) Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension* **26**:854-857.

- Gu X, El-Remessy AB, Brooks SE, Al-Shabrawey M, Tsai NT and Caldwell RB (2003) Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**:C546-554.
- Gu X, Samuel S, El-Shabrawey M, Caldwell RB, Bartoli M, Marcus DM and Brooks SE (2002) Effects of sustained hyperoxia on revascularization in experimental retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:496-502.
- Guerra-Cuesta JI, Monton M, Rodriguez-Feo JA, Jimenez AM, Gonzalez-Fernandez F, Rico LA, Garcia R, Gomez J, Farre J, Casado S and Lopez-Farre A (1999) Effect of losartan on human platelet activation. *J Hypertens* **17**:447-452.
- Guertin F, Roy CC, Lepage G, Yousef I and Tuchweber B (1993) Liver membrane composition after short-term parenteral nutrition with and without taurine in guinea pigs: the effect to taurine. *Proc Soc Exp Biol Med* **203**:418-423.
- Guimaraes CA, Benchimol M, Amarante-Mendes GP and Linden R (2003) Alternative programs of cell death in developing retinal tissue. *J Biol Chem* **278**:41938-41946.
- Gurtner GH, Knoblauch A, Smith PL, Sies H and Adkinson NF (1983) Oxidant- and lipid-induced pulmonary vasoconstriction mediated by arachidonic acid metabolites. *J Appl Physiol* **55**:949-954.
- Haby C, Lisovoski F, Aunis D and Zwiller J (1994) Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and junB in PC12 cells. *J Neurochem* **62**:496-501.

- Hack M, Taylor HG, Klein N, Eiben R, Schatschneider C and Mercuri-Minich N (1994) School-age outcomes in children with birth weights under 750 g. *N Engl J Med* **331**:753-759.
- Haefliger IO, Flammer J and Luscher TF (1992) Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**:2340-2343.
- Haefliger IO, Meyer P, Flammer J and Luscher TF (1994a) The vascular endothelium as a regulator of the ocular circulation: a new concept in ophthalmology? *Surv Ophthalmol* **39**:123-132.
- Haefliger IO, Zschauer A and Anderson DR (1994b) Relaxation of retinal pericyte contractile tone through the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:991-997.
- Hagemann C and Rapp UR (1999) Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* **253**:34-46.
- Hague S, Hill DW and Crabtree A (1988) The calibre changes of retinal vessels subject to prolonged hyperoxia. *Exp Eye Res* **47**:87-96.
- Halliwell B (1984) Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Med Biol* **62**:71-77.
- Halliwell B (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* **9**:1-32.
- Halliwell B (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* **91**:14S-22S.

- Halliwell B and Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**:1-14.
- Halushka PV, Mais DE, Mayeux PR and Morinelli TA (1989) Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **29**:213-239.
- Ham EA, Egan RW, Soderman DD, Gale PH and Kuehl FA, Jr. (1979) Peroxidase-dependent deactivation of prostacyclin synthetase. *J Biol Chem* **254**:2191-2194.
- Hamberg M and Samuelsson B (1974) Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:3400-3404.
- Hamberg M, Svensson J and Samuelsson B (1975) Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:2994-2998.
- Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R and Bullock P (2004) Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro* **18**:703-710.
- Hanna N, Peri KG, Abran D, Hardy P, Doke A, Lachapelle P, Roy MS, Orquin J, Varma DR and Chemtob S (1997) Light induces peroxidation in retina by activating prostaglandin G/H synthase. *Free Radic Biol Med* **23**:885-897.
- Hardy P, Abran D, Hou X, Lahaie I, Peri KG, Asselin P, Varma DR and Chemtob S (1998a) A major role for prostacyclin in nitric oxide-induced ocular vasorelaxation in the piglet. *Circ Res* **83**:721-729.

- Hardy P, Abran D, Li DY, Fernandez H, Varma DR and Chemtob S (1994) Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet: interaction with prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:580-591.
- Hardy P, Bhattacharya M, Abran D, Peri KG, Asselin P, Varma DR, Chemtob S and Bhatthacharya M (1998b) Increases in retinovascular prostaglandin receptor functions by cyclooxygenase-1 and -2 inhibition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**:1888-1898.
- Hardy P, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR and 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 and 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 and Chemtob S (1997) Control of cerebral and ocular blood flow autoregulation in neonates. *Pediatr Clin North Am* **44**:137-152.
- Harlan JM and Callahan KS (1984) Role of hydrogen peroxide in the neutrophil-mediated release of prostacyclin from cultured endothelial cells. *J Clin Invest* **74**:442-448.
- Hasséssian H, Bodin P and Burnstock G (1993) Blockade by glibenclamide of the flow-evoked endothelial release of ATP that contributes to vasodilatation in the pulmonary vascular bed of the rat. *Br J Pharmacol* **109**:466-472.

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

- Hayashi K, Loutzenhiser R and Epstein M (1997) Direct evidence that thromboxane mimetic U44069 preferentially constricts the afferent arteriole. *J Am Soc Nephrol* **8**:25-31.
- Hebbandi SB, Bowen JR, Hipwell GC, Ma PJ, Leslie GI and Arnold JD (1997) Ocular sequelae in extremely premature infants at 5 years of age. *J Paediatr Child Health* **33**:339-342.
- Heimark RL, Twardzik DR and Schwartz SM (1986) Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. *Science* **233**:1078-1080.
- Hellstrom A, Perruzzi C, Ju M, Engstrom E, Hard AL, Liu JL, Albertsson-Wikland K, Carlsson B, Niklasson A, Sjodell L, LeRoith D, Senger DR and Smith LE (2001a) Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5804-5808.
- Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H and Betsholtz C (2001b) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* **153**:543-553.
- Hemler ME, Cook HW and Lands WE (1979) Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch Biochem Biophys* **193**:340-345.
- Henkind P and DeOliveira LF (1967) Development of retinal vessels in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **6**:520-530.
- Herbstein K and Murchland JB (1984) Retinal vascular changes after treatment with hyperbaric oxygen. *Med J Aust* **140**:728-729.

- Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH and Ley TJ (1994) Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* **76**:977-987.
- Hickam JB and Frayser R (1966) Studies of the retinal circulation in man: Observations on vessel diameter, arteriovenous oxygen difference, and mean circulation time. *Circulation* **33**:302-316.
- Hickam JB, Frayser R and Ross JC (1963) A study of retinal venous blood oxygen saturation in human subjects by photographic means. *Circulation* **27**:375-385.
- Hidaka H and Asano T (1977) Stimulation of human platelet guanylate cyclase by unsaturated fatty acid peroxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:3657-3661.
- Higgins RD, Yan Y and Schrier BK (2002) Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularization. *Exp Eye Res* **74**:553-559.
- Higuchi Y (2003) Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol* **66**:1527-1535.
- Higuchi Y and Matsukawa S (1997) Appearance of 1-2 Mbp giant DNA fragments as an early common response leading to cell death induced by various substances that cause oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **23**:90-99.
- Higuchi Y and Yoshimoto T (2002) Arachidonic acid converts the glutathione depletion-induced apoptosis to necrosis by promoting lipid peroxidation and reducing caspase-3 activity in rat glioma cells. *Arch Biochem Biophys* **400**:133-140.
- Hill DW (1989) Ocular and retinal blood flow. *Acta Ophthalmol Suppl* **191**:15-18.

- Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S and Narumiya S (1991) Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A₂ receptor. *Nature* **349**:617-620.
- Hirata T, Kakizuka A, Ushikubi F, Fuse I, Okuma M and Narumiya S (1994) Arg60 to Leu mutation of the human thromboxane A₂ receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. *J Clin Invest* **94**:1662-1667.
- Hirsch T, Marzo I and Kroemer G (1997) Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci Rep* **17**:67-76.
- Hirschi KK and D'Amore PA (1996) Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* **32**:687-698.
- Holland MR, Venable ME, Whatley RE, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM (1992) Activation of the acetyl-coenzyme A:lysoplatelet-activating factor acetyltransferase regulates platelet-activating factor synthesis in human endothelial cells. *J Biol Chem* **267**:22883-22890.
- Holmes JM, Zhang S, Leske DA and Lanier WL (1998) Carbon dioxide-induced retinopathy in the neonatal rat. *Curr Eye Res* **17**:608-616.
- Holtzman DM, Kilbridge J, Bredt DS, Black SM, Li Y, Clary DO, Reichardt LF and Mobley WC (1994) NOS induction by NGF in basal forebrain cholinergic neurones: evidence for regulation of brain NOS by a neurotrophin. *Neurobiol Dis* **1**:51-60.
- Honda Z, Nakamura M, Miki I, Minami M, Watanabe T, Seyama Y, Okado H, Toh H, Ito K, Miyamoto T and *et al.* (1991) Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* **349**:342-346.

- Honda Z, Takano T, Gotoh Y, Nishida E, Ito K and Shimizu T (1994) Transfected platelet-activating factor receptor activates mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase kinase in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **269**:2307-2315.
- Hood JD, Meininger CJ, Ziche M and Granger HJ (1998) VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* **274**:H1054-1058.
- Hoste AM, Boels PJ, Andries LJ, Brutsaert DL and De Laey JJ (1990) Effects of beta-antagonists on contraction of bovine retinal microarteries in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**:1231-1237.
- Hoste AM, Boels PJ, Brutsaert DL and De Laey JJ (1989) Effect of alpha-1 and beta agonists on contraction of bovine retinal resistance arteries in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **30**:44-50.
- Hostettler ME, Knapp PE and Carlson SL (2002) Platelet-activating factor induces cell death in cultured astrocytes and oligodendrocytes: involvement of caspase-3. *Glia* **38**:228-239.
- Hou X, Gobeil F, Jr., Marrache AM, Quiniou C, Brault S, Checchin D, Bernier SG, Sennlaub F, Joyal JS, Abran D, Peri K, Varma DR and Chemtob S (2003) Increased platelet-activating factor-induced periventricular brain microvascular constriction associated with immaturity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**:R928-935.
- Hou X, Gobeil F, Jr., Peri K, Speranza G, Marrache AM, Lachapelle P, Roberts J, 2nd, Varma DR, Chemtob S and Ellis EF (2000) Augmented vasoconstriction and

- thromboxane formation by 15-F(2t)-isoprostane (8-iso-prostaglandin F(2alpha)) in immature pig periventricular brain microvessels. *Stroke* **31**:516-524; discussion 525.
- Huang LE, Gu J, Schau M and Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7987-7992.
- Huang PL (1999) Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Braz J Med Biol Res* **32**:1353-1359.
- 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.
- Hubel CA, Davidge ST and McLaughlin MK (1993) Lipid hydroperoxides potentiate mesenteric artery vasoconstrictor responses. *Free Radic Biol Med* **14**:397-407.
- Igarashi K, Kataoka K, Itoh K, Hayashi N, Nishizawa M and Yamamoto M (1994) Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature* **367**:568-572.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM and Wood KS (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* **61**:866-879.
- Ikeda Y, Sugawara A, Taniyama Y, Uruno A, Igarashi K, Arima S, Ito S and Takeuchi K (2000) Suppression of rat thromboxane synthase gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in macrophages via an interaction with NRF2. *J Biol Chem* **275**:33142-33150.

- Illi B, Puri P, Morgante L, Capogrossi MC and Gaetano C (2000) Nuclear factor-kappaB and cAMP response element binding protein mediate opposite transcriptional effects on the Flk-1/KDR gene promoter. *Circ Res* **86**:E110-117.
- Inder TE, Graham P, Sanderson K and Taylor BJ (1994) Lipid peroxidation as a measure of oxygen free radical damage in the very low birthweight infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **70**:F107-111.
- Ischiropoulos H (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* **356**:1-11.
- Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD and Beckman JS (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* **298**:431-437.
- Ishii I, Izumi T, Tsukamoto H, Umeyama H, Ui M and Shimizu T (1997a) Alanine exchanges of polar amino acids in the transmembrane domains of a platelet-activating factor receptor generate both constitutively active and inactive mutants. *J Biol Chem* **272**:7846-7854.
- Ishii I, Saito E, Izumi T, Ui M and Shimizu T (1998a) Agonist-induced sequestration, recycling, and resensitization of platelet-activating factor receptor. Role of cytoplasmic tail phosphorylation in each process. *J Biol Chem* **273**:9878-9885.
- Ishii S, Kuwaki T, Nagase T, Maki K, Tashiro F, Sunaga S, Cao WH, Kume K, Fukuchi Y, Ikuta K, Miyazaki J, Kumada M and Shimizu T (1998b) Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med* **187**:1779-1788.

- Ishii S, Nagase T, Tashiro F, Ikuta K, Sato S, Waga I, Kume K, Miyazaki J and Shimizu T (1997b) Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. *Embo J* **16**:133-142.
- Ishii S and Shimizu T (2000) Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* **39**:41-82.
- Ishizuka T, Kawakami M, Hidaka T, Matsuki Y, Takamizawa M, Suzuki K, Kurita A and Nakamura H (1998) Stimulation with thromboxane A2 (TXA2) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* **112**:464-470.
- Ishizuka T, Suzuki K, Kawakami M, Kawaguchi Y, Hidaka T, Matsuki Y and Nakamura H (1994) DP-1904, a specific inhibitor of thromboxane A2 synthesizing enzyme, suppresses ICAM-1 expression by stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* **262**:113-123.
- Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH and Dzau VJ (1993) Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* **91**:2268-2274.
- Izumi T and Shimizu T (1995) Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* **1259**:317-333.
- Jacobson MD (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* **21**:83-86.
- Jamieson D, Chance B, Cadenas E and Boveris A (1986) The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* **48**:703-719.

- Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB and Bloch KD (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **267**:14519-14522.
- Janzer RC and Ra MC (1987) Astrocytes induce bloodbrain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325**:253-257.
- Jariyawat S, Takeda M, Kobayashi M and Endou H (1997) Thromboxane A₂ mediates cisplatin-induced apoptosis of renal tubule cells. *Biochem Mol Biol Int* **42**:113-121.
- John H, Cammann K and Schlegel W (1998) Development and review of radioimmunoassay of 12-S-hydroxyheptadecatrienoic acid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **56**:53-76.
- Jones DA, Benjamin CW and Linseman DA (1995) Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Pharmacol* **48**:890-896.
- Jones DA and Fitzpatrick FA (1991) Thromboxane A₂ synthase. Modification during "suicide" inactivation. *J Biol Chem* **266**:23510-23514.
- Jones MK, Szabo IL, Kawanaka H, Husain SS and Tarnawski AS (2002) von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1 α : new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis. *FASEB J* **16**:264-266.
- Joyce NC, Haire MF and Palade GE (1985a) Contractile proteins in pericytes. I. Immunoperoxidase localization of tropomyosin. *J Cell Biol* **100**:1379-1386.

- Joyce NC, Haire MF and Palade GE (1985b) Contractile proteins in pericytes. II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations. *J Cell Biol* **100**:1387-1395.
- Jozkowicz A, Cooke JP, Guevara I, Huk I, Funovics P, Pachinger O, Weidinger F and Dulak J (2001) Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc Res* **51**:773-783.
- Ju H, Zou R, Venema VJ and Venema RC (1997) Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* **272**:18522-18525.
- Kald B, Smedh K, Olaison G, Sjudahl R and Tagesson C (1996) Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in intestinal mucosa and plasma of patients with Crohn's disease. *Digestion* **57**:472-477.
- Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y and Poellinger L (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **274**:6519-6525.
- 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.
- Kane DJ, Ord T, Anton R and Bredesen DE (1995) Expression of bcl-2 inhibits necrotic neural cell death. *J Neurosci Res* **40**:269-275.
- Karsan A (1998) Tumor necrosis factor and endothelial cell death. *Trends Cardiovasc Med* **8**:19-24.
- Kass MA and Holmberg NJ (1979) Prostaglandin and thromboxane synthesis by microsomes of rabbit ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **18**:166-171.

- Kato M, Tokuyama K, Morikawa A, Kuroume T and Barnes PJ (1993) Platelet-activating factor-induced enhancement of superoxide anion generation in guinea-pigs. *Eur J Pharmacol* **232**:7-12.
- Katusic ZS (1996) Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic Biol Med* **20**:443-448.
- Katusic ZS, Shepherd JT and Vanhoutte PM (1984) Vasopressin causes endothelium-dependent relaxations of the canine basilar artery. *Circ Res* **55**:575-579.
- Kawahara A, Ohsawa Y, Matsumura H, Uchiyama Y and Nagata S (1998) Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol* **143**:1353-1360.
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J and Connolly DT (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**:1309-1312.
- Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB and Shepro D (1987) Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall. *J Cell Biol* **104**:483-490.
- Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB and Shepro D (1988) Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro. *J Muscle Res Cell Motil* **9**:184-194.
- Kelly JP, Johnson MC and Parker CW (1979) Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on mitogenesis in human lymphocytes: possible role of thromboxanes and products of the lipoxygenase pathway. *J Immunol* **122**:1563-1571.

- Kendall RL and Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10705-10709.
- Kennedy I, Coleman RA, Humphrey PP, Levy GP and Lumley P (1982) Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification. *Prostaglandins* **24**:667-689.
- Kent KC, Collins LJ, Schwerin FT, Raychowdhury MK and Ware JA (1993) Identification of functional PGH₂/TxA₂ receptors on human endothelial cells. *Circ Res* **72**:958-965.
- Kerr JF, Winterford CM and Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**:2013-2026.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**:239-257.
- Kester M, Ledvora RF and Barany M (1984) The potentiation of arterial contraction with platelet activating factor. *Pflugers Arch* **400**:200-202.
- Khaliq A, Dunk C, Jiang J, Shams M, Li XF, Acevedo C, Weich H, Whittle M and Ahmed A (1999) Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. *Lab Invest* **79**:151-170.
- Kiel JW (1994) Choroidal myogenic autoregulation and intraocular pressure. *Exp Eye Res* **58**:529-543.

- Kiel JW and Lovell MO (1996) Adrenergic modulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:673-679.
- Kiel JW and Shepherd AP (1992) Autoregulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**:2399-2410.
- Kiel JW and van Heuven WA (1995) Ocular perfusion pressure and choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**:579-585.
- Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amano S, Agular S, Miller JW and Adamis AP (1999) Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:2115-2121.
- Kim SY, Mocanu C, Mcleod DS, Bhutto IA, Merges C, Eid M, Tong P and Luty GA (2003) Expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in sickle cell retina and choroid. *Experimental Eye Research* **77**:433-445.
- Kim YM, Bergonia H and Lancaster JR, Jr. (1995) Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* **374**:228-232.
- Kingham J (1986) Classification of retinopathy of prematurity, in *Retinopathy of prematurity. Current concepts and controvercies* pp 32-33, BC Decker, Inc, Toronto.
- Kinnula VL, Adler KB, Ackley NJ and Crapo JD (1992) Release of reactive oxygen species by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* **262**:L708-712.

- Kinsella BT, O'Mahony DJ and FitzGerald GA (1994) Phosphorylation and regulated expression of the human thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* **269**:29914-29919.
- Kinsey VE (1956) Retrolental fibroplasia; cooperative study of retrolental fibroplasia and the use of oxygen. *Ama Arch Ophthalmol* **56**:481-543.
- Kiryu J, Asrani S, Shahidi M, Mori M and Zeimer R (1995) Local response of the primate retinal microcirculation to increased metabolic demand induced by flicker. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**:1240-1246.
- Kiss B, Polska E, Dorner G, Polak K, Findl O, Mayrl GF, Eichler HG, Wolzt M and Schmetterer L (2002) Retinal blood flow during hyperoxia in humans revisited: concerted results using different measurement techniques. *Microvasc Res* **64**:75-85.
- Kitchen EA, Boot JR and Dawson W (1978) Chemotactic activity of thromboxane B2, prostaglandins and their metabolites for polymorphonuclear leucocytes. *Prostaglandins* **16**:239-244.
- Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H and Forstermann U (1998) Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension* **31**:582-588.
- Klionsky DJ and Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**:1717-1721.
- Knowles RG and Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298** (Pt 2):249-258.

- Knowles RG, Palacios M, Palmer RM and Moncada S (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5159-5162.
- Kobayashi M, Kuroiwa T, Shimokawa R, Okeda R and Tokoro T (2000) Nitric oxide synthase expression in ischemic rat retinas. *Jpn J Ophthalmol* **44**:235-244.
- Koide T, Neichi T, Takato M, Matsushita H, Sugioka K, Nakano M and Hata S (1982) Possible mechanisms of 15-hydroperoxyarachidonic acid-induced contraction of the canine basilar artery in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **221**:481-488.
- Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Burchfield J, Shesely EG and Harrison DG (1999) Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res* **42**:206-213.
- Koss MC (1994) Adrenoceptor mechanisms in epinephrine-induced anterior choroidal vasoconstriction in cats. *Exp Eye Res* **59**:715-722.
- Koss MC and Gherezghiher T (1993) Adrenoceptor subtypes involved in neurally evoked sympathetic vasoconstriction in the anterior choroid of cats. *Exp Eye Res* **57**:441-447.
- Kourembanas S, Hannan RL and Faller DV (1990) Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest* **86**:670-674.

- Kramer BK, Bucher M, Sandner P, Ittner KP, Riegger GA, Ritthaler T and Kurtz A (1997) Effects of hypoxia on growth factor expression in the rat kidney in vivo. *Kidney Int* **51**:444-447.
- Kravchenko VV, Pan Z, Han J, Herbert JM, Ulevitch RJ and Ye RD (1995) Platelet-activating factor induces NF-kappa B activation through a G protein-coupled pathway. *J Biol Chem* **270**:14928-14934.
- Kretzer FL, Mehta RS, Goad D and Hittner HM (1986) Animals models in research on retinopathy of prematurity, in *Retinopathy of prematurity. Current concepts and controversics* pp 79-88, BC Decker, Inc., Toronto.
- Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK and Chi DS (1999) Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* **19**:91-104.
- Kroemer G, Dallaporta B and Resche-Rigon M (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* **60**:619-642.
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL and Mignotte B (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* **9**:1277-1287.
- Kroemer G, Zamzami N and Susin SA (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* **18**:44-51.
- Krum JM, Mani N and Rosenstein JM (2002) Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience* **110**:589-604.

- Krum JM and Rosenstein JM (1998) VEGF mRNA and its receptor flt-1 are expressed in reactive astrocytes following neural grafting and tumor cell implantation in the adult CNS. *Exp Neurol* **154**:57-65.
- Kuijpers TW, Hakkert BC, Hart MH and Roos D (1992) Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8. *J Cell Biol* **117**:565-572.
- Kuijpers TW, Hakkert BC, Hoogerwerf M, Leeuwenberg JF and Roos D (1991) Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J Immunol* **147**:1369-1376.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW and Herschman HR (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.
- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML and Ellis EF (1986) PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* **59**:612-619.
- Kulmacz RJ and Lands WE (1984) Prostaglandin H synthase. Stoichiometry of heme cofactor. *J Biol Chem* **259**:6358-6363.
- Kureny DE, Moroz LL, Turner RW, Sharkey KA and Barnes S (1994) Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide. *Neuron* **13**:315-324.
- Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, Lyn P, Leavy J, Witte L, Joseph-Silverstein J and *et al.* (1995) Hypoxia-mediated induction of

- acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:4606-4610.
- Kuwabara T and Cogan DG (1963) Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of the retinal capillaries. *Arch Ophthalmol* **69**:492-502.
- Lachapelle P, Dembinska O, Rojas LM, Benoit J, Almazan G and Chemtob S (1999) Persistent functional and structural retinal anomalies in newborn rats exposed to hyperoxia. *Can J Physiol Pharmacol* **77**:48-55.
- Lahaie I, Hardy P, Hou X, Hassessian H, Asselin P, Lachapelle P, Almazan G, Varma DR, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd and Chemtob S (1998) A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F2 alpha on retinal vessels. *Am J Physiol* **274**:R1406-1416.
- Larrivee B and Karsan A (2000) Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (review). *Int J Mol Med* **5**:447-456.
- Laties AM (1967) Central retinal artery innervation. Absence of adrenergic innervation to the intraocular branches. *Arch Ophthalmol* **77**:405-409.
- Le Gouill C, Parent JL, Rola-Pleszczynski M and Stankova J (1997a) Role of the Cys90, Cys95 and Cys173 residues in the structure and function of the human platelet-activating factor receptor. *FEBS Lett* **402**:203-208.
- Le Gouill C, Parent JL, Rola-Pleszczynski M and Stankova J (1997b) Structural and functional requirements for agonist-induced internalization of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem* **272**:21289-21295.

- Le Noble FA, Schreurs NH, van Straaten HW, Slaaf DW, Smits JF, Rogg H and Struijker-Boudier HA (1993) Evidence for a novel angiotensin II receptor involved in angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Am J Physiol* **264**:R460-465.
- Lecoecur H, Prevost MC and Gougeon ML (2001) Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. *Cytometry* **44**:65-72.
- Lecomte M, Paget C, Ruggiero D, Wiernsperger N and Lagarde M (1996) Docosahexaenoic acid is a major n-3 polyunsaturated fatty acid in bovine retinal microvessels. *J Neurochem* **66**:2160-2167.
- Lee KD, Baek SJ and Shen RF (1996) Multiple factors regulating the expression of human thromboxane synthase gene. *Biochem J* **319 (Pt 3)**:783-791.
- Lee WH, Javedan S and Bondy CA (1992) Coordinate expression of insulin-like growth factor system components by neurons and neuroglia during retinal and cerebellar development. *J Neurosci* **12**:4737-4744.
- Leffler CW, Busija DW, Armstead WM and Mirro R (1990) H₂O₂ effects on cerebral prostanoids and pial arteriolar diameter in piglets. *Am J Physiol* **258**:H1382-1387.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA and Herman B (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1366**:177-196.

- Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P and Samuel JL (1996) Chronic blockade of AT₂-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest* **98**:418-425.
- Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM and Zimmerman GA (1988) Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J Clin Invest* **82**:2045-2055.
- Li H, Zhu H, Xu CJ and Yuan J (1998a) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**:491-501.
- Li J, Billiar TR, Talanian RV and Kim YM (1997a) Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* **240**:419-424.
- Li P, Ferrario CM and Brosnihan KB (1997b) Nonpeptide angiotensin II antagonist losartan inhibits thromboxane A₂-induced contractions in canine coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **281**:1065-1070.
- Li P, Ferrario CM and Brosnihan KB (1998b) Losartan inhibits thromboxane A₂-induced platelet aggregation and vascular constriction in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **32**:198-205.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X (1997c) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**:479-489.

- Liel N, Nathan I, Yermiyahu T, Zolotov Z, Lieberman JR, Dvilansky A and Halushka PV (1993) Increased platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in patients with pregnancy induced hypertension. *Thromb Res* **70**:205-210.
- Limb GA, Chignell AH, Green W, LeRoy F and Dumonde DC (1996) Distribution of TNF and its reactive vascular adhesion molecules in .brovascular membranes of PDR. *Br J Ophthalmol* **80**:168-173.
- Lin AY and Rui YC (1994) Platelet-activating factor induced calcium mobilization and phosphoinositide metabolism in cultured bovine cerebral microvascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1224**:323-328.
- Lin L, Balazy M, Pagano PJ and Nasjletti A (1994) Expression of prostaglandin H₂-mediated mechanism of vascular contraction in hypertensive rats. Relation to lipoxygenase and prostacyclin synthase activities. *Circ Res* **74**:197-205.
- Lindahl P, Johansson BR, Leveen P and Betsholtz C (1997) Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**:242-245.
- Lindeman JH, van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Speek AJ, Poorthuis BJ and Berger HM (1989) The total free radical trapping ability of cord blood plasma in preterm and term babies. *Pediatr Res* **26**:20-24.
- Lindsberg PJ, Yue TL, Frerichs KU, Hallenbeck JM and Feuerstein G (1990) Evidence for platelet-activating factor as a novel mediator in experimental stroke in rabbits. *Stroke* **21**:1452-1457.
- Lineham JD, Smith RM, Dahlenburg GW, King RA, Haslam RR, Stuart MC and Faull L (1986) Circulating insulin-like growth factor I levels in newborn premature and full-term infants followed longitudinally. *Early Hum Dev* **13**:37-46.

- Ling TL and Stone J (1988) The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve. *Brain Res Dev Brain Res* **44**:73-85.
- Linsenmeier RA and Yancey CM (1989) Effects of hyperoxia on the oxygen distribution in the intact cat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **30**:612-618.
- List BM, Klosch B, Volker C, Gorren AC, Sessa WC, Werner ER, Kukovetz WR, Schmidt K and Mayer B (1997) Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J* **323** (Pt 1):159-165.
- Liu B, Nakashima S, Kanoh H, Takano T, Shimizu T and Nozawa Y (1994) Activation of phospholipase D in Chinese hamster ovary cells expressing platelet-activating factor receptor. *J Biochem (Tokyo)* **116**:882-891.
- Liu EC, Hedberg A, Goldenberg HJ, Harris DN and Webb ML (1992) DuP 753, the selective angiotensin II receptor blocker, is a competitive antagonist to human platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ (TP) receptors. *Prostaglandins* **44**:89-99.
- Liu XH, Eun BL, Silverstein FS and Barks JD (1996) The platelet-activating factor antagonist BN 52021 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in the immature rat. *Pediatr Res* **40**:797-803.
- Liu Y, Christou H, Morita T, Laughner E, Semenza GL and Kourembanas S (1998) Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J Biol Chem* **273**:15257-15262.

- Lockshin RA and Zakeri Z (1991) Programmed cell death and apoptosis, in *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death* (Cope DLTaFO ed) pp 47-60, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Loo RW, Conde-Frieboes K, Reynolds LJ and Dennis EA (1997) Activation, inhibition, and regiospecificity of the lysophospholipase activity of the 85-kDa group IV cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **272**:19214-19219.
- Lonchamp M, Pennel L and Duhault J (2001) Hyperoxia/normoxia-driven retinal angiogenesis in mice: a role for angiotensin II. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:429-432.
- Lonigro AJ, McMurdo L, Stephenson AH, Sprague RS and Weintraub NL (1996) Hypotheses regarding the role of pericytes in regulating movement of fluid, nutrients, and hormones across the microcirculatory endothelial barrier. *Diabetes* **45 Suppl 1**:S38-43.
- Loutzenhiser R, Epstein M, Horton C and Sonke P (1986) Reversal of renal and smooth muscle actions of the thromboxane mimetic U-44069 by diltiazem. *Am J Physiol* **250**:F619-626.
- Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS and Snyder SH (1992) Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6711-6715.
- Lu J, Caplan MS, Saraf AP, Li D, Adler L, Liu X and Jilling T (2004) Platelet-activating factor-induced apoptosis is blocked by Bcl-2 in rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**:G340-350.

- Luna J, Tobe T, Mousa SA, Reilly TM and Campochiaro PA (1996) Antagonists of integrin alpha v beta 3 inhibit retinal neovascularization in a murine model. *Lab Invest* **75**:563-573.
- Luscher TF (1991) Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J* **12 Suppl E**:2-11.
- Luscher TF, Boulanger CM, Dohi Y and Yang ZH (1992) Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* **19**:117-130.
- Luscher TF and Vanhoutte PM (1990) The endothelium: Modulator of cardiovascular function, in pp 1-228, CRC Press, Boca Raton.
- Lutty GA, Mathews MK, Merges C and McLeod DS (1998) Adenosine stimulates canine retinal microvascular endothelial cell migration and tube formation. *Curr Eye Res* **17**:594-607.
- Lutty GA, Merges C and McLeod DS (2000) 5' nucleotidase and adenosine during retinal vasculogenesis and oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:218-229.
- Lynch JM and Henson PM (1986) The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor. *J Immunol* **137**:2653-2661.
- Lyons CR, Orloff GJ and Cunningham JM (1992) Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* **267**:6370-6374.
- Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ and Lefer AM (1993) Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res* **72**:403-412.

- MacCumber MW and D'Anna SA (1994) Endothelin receptor-binding subtypes in the human retina and choroid. *Arch Ophthalmol* **112**:1231-1235.
- MacCumber MW, Ross CA, Glaser BM and Snyder SH (1989) Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:7285-7289.
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS and Thompson JA (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11853-11858.
- Majka S, McGuire PG and Das A (2002) Regulation of matrix metalloproteinase expression by tumor necrosis factor in a murine model of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:260-266.
- Majno G and Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**:3-15.
- Mandarino LJ, Sundarraj N, Finlayson J and Hassell HR (1993) Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res* **57**:609-621.
- Manganello JM, Djellas Y, Borg C, Antonakis K and Le Breton GC (1999) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of thromboxane A(2) receptor-associated Galpha(13). *J Biol Chem* **274**:28003-28010.
- Mannick JB, Schonhoff C, Papeta N, Ghafourifar P, Szibor M, Fang K and Gaston B (2001) S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol* **154**:1111-1116.
- Mantovani A, Bussolino F and Dejana E (1992) Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* **6**:2591-2599.

- Marcheselli VL, Rossowska MJ, Domingo MT, Braquet P and Bazan NG (1990) Distinct platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. *J Biol Chem* **265**:9140-9145.
- Margolis G and Brown IW, Jr. (1966) Hyperbaric oxygenation: the eye as a limiting factor. *Science* **151**:466-468.
- Marieb EN and Laurendeau G (1993) *Anatomie et physiologie humaines*. Éditions du nouveau pédagogique inc., Saint-Laurent.
- Marletta MA (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**:927-930.
- Marrache AM, Gobeil F, Jr., Bernier SG, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, Choufani S, Bkaily G, Bourdeau A, Sirois MG, Vazquez-Tello A, Fan L, Joyal JS, Filep JG, Varma DR, Ribeiro-Da-Silva A and Chemtob S (2002) Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol* **169**:6474-6481.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC and Schappert KT (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* **268**:17478-17488.
- Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S and Michel T (1992) Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* **307**:287-293.
- Marshall HE, Merchant K and Stamler JS (2000) Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J* **14**:1889-1900.

- Marzo I, Brenner C and Kroemer G (1998) The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed Pharmacother* **52**:248-251.
- Masaki T (1995) Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**:235-255.
- Masaki T and Yanagisawa M (1992) Endothelins. *Essays Biochem* **27**:79-89.
- Masferrer JL, Reddy ST, Zweifel BS, Seibert K, Needleman P, Gilbert RS and Herschman HR (1994) In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* **270**:1340-1344.
- Mason RB, Pluta RM, Walbridge S, Wink DA, Oldfield EH and Boock RJ (2000) Production of reactive oxygen species after reperfusion in vitro and in vivo: protective effect of nitric oxide. *J Neurosurg* **93**:99-107.
- Mathieu J, Richard S, Ballester B, Chancerelle Y and Multon E (1999) [Apoptosis and gamma rays]. *Ann Pharm Fr* **57**:314-323.
- Matsuda H and Iyanagi T (1999) Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. *Biochim Biophys Acta* **1473**:345-355.
- Matsuo Y, Kihara T, Ikeda M, Ninomiya M, Onodera H and Kogure K (1996) Role of platelet-activating factor and thromboxane A₂ in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain. *Brain Res* **709**:296-302.
- McCarthy NJ and Evan GI (1998) Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol* **36**:259-278.

- McElroy MC, Postle AD and Kelly FJ (1992) Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of lung and liver during human development. *Biochim Biophys Acta* **1117**:153-158.
- McIntyre TM, Zimmerman GA and Prescott SM (1999) Biologically active oxidized phospholipids. *J Biol Chem* **274**:25189-25192.
- McLeod DS, Crone SN and Luty GA (1996) Vasoproliferation in the neonatal dog model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:1322-1333.
- McLeod DS, Taomoto M, Cao J, Zhu Z, Witte L and Luty GA (2002) Localization of VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1) and effects of blocking it in oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:474-482.
- Meagher EA and FitzGerald GA (1993) Disordered eicosanoid formation in pregnancy-induced hypertension. *Circulation* **88**:1324-1333.
- Merendino N, Dwinell MB, Varki N, Eckmann L and Kagnoff MF (1999) Human intestinal epithelial cells express receptors for platelet-activating factor. *Am J Physiol* **277**:G810-818.
- Meyer P, Champion C, Schlotzer-Schrehardt U, Flammer J and Haefliger IO (1999) Localization of nitric oxide synthase isoforms in porcine ocular tissues. *Curr Eye Res* **18**:375-380.
- Meyer P, Flammer J and Luscher TF (1993) Endothelium-dependent regulation of the ophthalmic microcirculation in the perfused porcine eye: role of nitric oxide and endothelins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**:3614-3621.
- Meyrick B and Reid L (1979) Ultrastructural features of the distended pulmonary arteries of the normal rat. *Anat Rec* **193**:71-97.

- Michaelson IC, Herz N, Lewkowitz E and Kertesz D (1954) Effect of increased oxygen on the development of the retinal vessels; an experimental study. *Br J Ophthalmol* **38**:577-587.
- Michel JB, Feron O, Sacks D and Michel T (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca^{2+} -calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* **272**:15583-15586.
- Michel T (1999) Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res* **32**:1361-1366.
- Michiels C (2003) Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* **196**:430-443.
- Michiels C, Minet E, Mottet D and Raes M (2002) Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med* **33**:1231-1242.
- Miggin SM and Kinsella BT (2001) Thromboxane A(2) receptor mediated activation of the mitogen activated protein kinase cascades in human uterine smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **1539**:147-162.
- Miggin SM and Kinsella BT (2002) Regulation of extracellular signal-regulated kinase cascades by alpha- and beta-isoforms of the human thromboxane A(2) receptor. *Mol Pharmacol* **61**:817-831.
- Mitchell MD, Lucas A, Etches PC, Brunt JD and Turnbull AC (1978) Plasma prostaglandin levels during early neonatal life following term and pre-term delivery. *Prostaglandins* **16**:319-326.

- Mittal CK and Murad F (1977) Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:4360-4364.
- Miyata A, Yokoyama C, Ihara H, Bandoh S, Takeda O, Takahashi E and Tanabe T (1994) Characterization of the human gene (TBXAS1) encoding thromboxane synthase. *Eur J Biochem* **224**:273-279.
- Mizoguchi Y, Ichikawa Y, Kioka K, Kawada N, Kobayashi K and Yamamoto S (1991) Effects of arachidonic acid metabolites and interleukin-1 on platelet activating factor production by hepatic sinusoidal endothelial cells from mice. *J Gastroenterol Hepatol* **6**:283-288.
- Mizutani M, Kern TS and Lorenzi M (1996) Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest* **97**:2883-2890.
- Moncada S and Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**:2002-2012.
- Moncada S and Palmer RM (1991) Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol* **15**:16-19.
- Moncada S, Palmer RM and Higgs EA (1989) Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* **38**:1709-1715.
- Montrucchio G, Alloatti G and Camussi G (2000) Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* **80**:1669-1699.

- Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F and Ziche M (1996) Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* **270**:H411-415.
- Mori K, Gehlbach P, Ando A, Dyer G, Lipinsky E, Chaudhry AG, Hackett SF and Campochiaro PA (2002a) Retina-specific expression of PDGF-B versus PDGF-A: vascular versus nonvascular proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:2001-2006.
- Mori K, Gehlbach P, Ando A, McVey D, Wei L and Campochiaro PA (2002b) Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:2428-2434.
- Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, Duh E, Zack DJ, Li Q, Berns KI, Raisler BJ, Hauswirth WW and Campochiaro PA (2002c) AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:1994-2000.
- Morinelli TA, Zhang LM, Newman WH and Meier KE (1994) Thromboxane A₂/prostaglandin H₂-stimulated mitogenesis of coronary artery smooth muscle cells involves activation of mitogen-activated protein kinase and S6 kinase. *J Biol Chem* **269**:5693-5698.
- Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC and Huang PL (1998) Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest* **101**:1225-1232.
- Morrow JD (2000) The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev* **32**:377-385.

- Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA and Roberts LJ, 2nd (1992a) Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10721-10725.
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF and Roberts LJ, 2nd (1990) A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:9383-9387.
- Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, Badr KF, Blair IA and Roberts LJ, 2nd (1994) Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J Biol Chem* **269**:4317-4326.
- Morrow JD, Minton TA and Roberts LJ, 2nd (1992b) The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* **44**:155-163.
- Morrow JD and Roberts LJ, 2nd (1996) The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* **51**:1-9.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55-63.
- Mudhar HS, Pollock RA, Wang C, Stiles CD and Richardson WD (1993) PDGF and its receptors in the developing rodent retina and optic nerve. *Development* **118**:539-552.

- Munzenmaier DH and Greene AS (1996) Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* **27**:760-765.
- Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL and Isner JM (1998) Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* **101**:2567-2578.
- Murphy EJ, Joseph L, Stephens R and Horrocks LA (1992) Phospholipid composition of cultured human endothelial cells. *Lipids* **27**:150-153.
- Murray R, Shipp E and FitzGerald GA (1990) Prostaglandin endoperoxide/thromboxane A2 receptor desensitization. Cross-talk with adenylate cyclase in human platelets. *J Biol Chem* **265**:21670-21675.
- Mutoh H, Bito H, Minami M, Nakamura M, Honda Z, Izumi T, Nakata R, Kurachi Y, Terano A and Shimizu T (1993) Two different promoters direct expression of two distinct forms of mRNAs of human platelet-activating factor receptor. *FEBS Lett* **322**:129-134.
- Mutoh H, Ishii S, Izumi T, Kato S and Shimizu T (1994) Platelet-activating factor (PAF) positively auto-regulates the expression of human PAF receptor transcript 1 (leukocyte-type) through NF-kappa B. *Biochem Biophys Res Commun* **205**:1137-1142.
- Nadal JA, Scicli GM, Carbini LA and Scicli AG (2002) Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF-beta and PDGF-BB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**:H739-748.
- Nagata S and Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* **267**:1449-1456.

- Najarian T, Marrache AM, Dumont I, Hardy P, Beauchamp MH, Hou X, Peri K, Gobeil F, Jr., Varma DR and Chemtob S (2000) Prolonged hypercapnia-evoked cerebral hyperemia via K(+) channel- and prostaglandin E(2)-dependent endothelial nitric oxide synthase induction. *Circ Res* **87**:1149-1156.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA and Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**:98-103.
- Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE and Dzau VJ (1995) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:10663-10667.
- Nakamura M, Honda Z, Izumi T, Sakanaka C, Mutoh H, Minami M, Bito H, Seyama Y, Matsumoto T, Noma M and *et al.* (1991) Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J Biol Chem* **266**:20400-20405.
- Nakamura T and Sakamoto K (2001) Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **284**:203-210.
- Nakanome Y, Karita K, Izumi H and Tamai M (1995) Two types of vasodilatation in cat choroid elicited by electrical stimulation of the short ciliary nerve. *Exp Eye Res* **60**:37-42.

- Nalefski EA, McDonagh T, Somers W, Seehra J, Falke JJ and Clark JD (1998) Independent folding and ligand specificity of the C2 calcium-dependent lipid binding domain of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **273**:1365-1372.
- Nandgaonkar BN, Rotschild T, Yu K and Higgins RD (1999) Indomethacin improves oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Pediatr Res* **46**:184-188.
- Narumiya S, Hirata N, Namba T, Hayashi Y, Ushikubi F, Sugimoto Y, Negishi M and Ichikawa A (1993) Structure and function of prostanoid receptors. *J Lipid Mediat* **6**:155-161.
- Narumiya S, Sugimoto Y and Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* **79**:1193-1226.
- Nasjletti A (1998) Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension* **31**:194-200.
- Natarajan V (1995) Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J Lab Clin Med* **125**:26-37.
- Nathan C (1997) Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* **100**:2417-2423.
- Nathan C and Xie QW (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* **269**:13725-13728.
- Nathan CF and Hibbs JB, Jr. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* **3**:65-70.
- Needleman P, Kulkarni PS and Raz A (1977) Coronary tone modulation: formation and actions of prostaglandins, endoperoxides, and thromboxanes. *Science* **195**:409-412.

- Negishi M, Sugimoto Y and Ichikawa A (1995) Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta* **1259**:109-119.
- Nehls V, Denzer K and Drenckhahn D (1992) Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res* **270**:469-474.
- Newman E and Reichenbach A (1996) The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* **19**:307-312.
- Nicosia RF and Villaschi S (1995) Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vitro. *Lab Invest* **73**:658-666.
- Nielsen JC, Naash MI and Anderson RE (1988) The regional distribution of vitamins E and C in mature and premature human retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **29**:22-26.
- Nielsen PJ and Nyborg NC (1990) Contractile and relaxing effects of arachidonic acid derivatives on isolated bovine retinal resistance arteries. *Exp Eye Res* **50**:305-311.
- Nieminen AL, Gores GJ, Bond JM, Imberti R, Herman B and Lemasters JJ (1992) A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. *Toxicol Appl Pharmacol* **115**:147-155.
- Niesman MR, Johnson KA and Penn JS (1997) Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. *Neurochem Res* **22**:597-605.
- Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW and Murphy TJ (1992) Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* **90**:2092-2096.

- Nixon AB, O'Flaherty JT, Salyer JK and Wykle RL (1999) Acetyl-CoA:1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase is directly activated by p38 kinase. *J Biol Chem* **274**:5469-5473.
- Nogami K, Hirashima Y, Endo S and Takaku A (1997) Involvement of platelet-activating factor (PAF) in glutamate neurotoxicity in rat neuronal cultures. *Brain Res* **754**:72-78.
- Noma H, Funatsu H, Yamashita H, Kitano S, Mishima HK and Hori S (2002) Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *Arch Ophthalmol* **120**:1075-1080.
- Nose K, Shibamura M, Kikuchi K, Kageyama H, Sakiyama S and Kuroki T (1991) Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. *Eur J Biochem* **201**:99-106.
- Nusing R and Ullrich V (1990) Immunoquantitation of thromboxane synthase in human tissues. *Eicosanoids* **3**:175-180.
- Nusing RM, Hirata M, Kakizuka A, Eki T, Ozawa K and Narumiya S (1993) Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A₂ receptor gene. *J Biol Chem* **268**:25253-25259.
- Nussler AK and Billiar TR (1993) Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* **54**:171-178.
- Nyborg NC, Prieto D, Benedito S and Nielsen PJ (1991) Endothelin-1-induced contraction of bovine retinal small arteries is reversible and abolished by nitrendipine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**:27-31.

- O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V and Young DA (1991) A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* **266**:23261-23267.
- Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K and Schultz G (1994) G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:504-508.
- O'Flaherty JT, Redman JF, Jr., Schmitt JD, Ellis JM, Surles JR, Marx MH, Piantadosi C and Wykle RL (1987) 1-O-alkyl-2-N-methylcarbamyl-glycerophosphocholine: a biologically potent, non-metabolizable analog of platelet-activating factor. *Biochem Biophys Res Commun* **147**:18-24.
- Ogletree ML (1987) Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A2. *Fed Proc* **46**:133-138.
- Ohashi K, Ruan KH, Kulmacz RJ, Wu KK and Wang LH (1992) Primary structure of human thromboxane synthase determined from the cDNA sequence. *J Biol Chem* **267**:789-793.
- Ohmori T, Hirashima Y, Kurimoto M, Endo S and Takaku A (1996) In vitro hypoxia of cortical and hippocampal CA1 neurons: glutamate, nitric oxide, and platelet activating factor participate in the mechanism of selective neural death in CA1 neurons. *Brain Res* **743**:109-115.
- Oliver PD and Newsome DA (1992) Mitochondrial superoxide dismutase in mature and developing human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**:1909-1918.

- Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**:609-619.
- Orlidge A and D'Amore PA (1987) Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* **105**:1455-1462.
- Orrenius S, McCabe MJ, Jr. and Nicotera P (1992) Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett* **64-65 Spec No**:357-364.
- Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP and Nash MS (1999) Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* **43 Suppl 1**:S102-128.
- Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S and Honda Y (2001) Angiotensin II induces expression of the Tie2 receptor ligand, angiopoietin-2, in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes* **50**:867-875.
- Otani A, Takagi H, Suzuma K and Honda Y (1998) Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res* **82**:619-628.
- Ozaki H, Seo MS, Ozaki K, Yamada H, Yamada E, Okamoto N, Hofmann F, Wood JM and Campochiaro PA (2000) Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol* **156**:697-707.
- Palmer EA, Flynn JT, Hardy RJ, Phelps DL, Phillips CL, Schaffer DB and Tung B (1991) Incidence and early course of retinopathy of prematurity. The Cryotherapy

- for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Ophthalmology* **98**:1628-1640.
- Panetta T, Marcheselli VL, Braquet P, Spinnewyn B and Bazan NG (1987) Effects of a platelet activating factor antagonist (BN 52021) on free fatty acids, diacylglycerols, polyphosphoinositides and blood flow in the gerbil brain: inhibition of ischemia-reperfusion induced cerebral injury. *Biochem Biophys Res Commun* **149**:580-587.
- Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA and Sessa WC (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* **100**:3131-3139.
- Papp A, Németh I, Karg E and Papp E (1999) Glutathione status in retinopathy of prematurity. *Free Radic Biol Med* **27**:738-743.
- Parent JL, Labrecque P, Orsini MJ and Benovic JL (1999) Internalization of the TXA₂ receptor alpha and beta isoforms. Role of the differentially spliced cooh terminus in agonist-promoted receptor internalization. *J Biol Chem* **274**:8941-8948.
- Parker MA, Bazan HE, Marcheselli V, Rodriguez de Turco EB and Bazan NG (2002) Platelet-activating factor induces permeability transition and cytochrome c release in isolated brain mitochondria. *J Neurosci Res* **69**:39-50.
- Patz A (1957) The role of oxygen in retrolental fibroplasia. *Pediatrics* **19**:504-524.
- Patz A (1984) Current concepts of the effect of oxygen on the developing retina. *Curr Eye Res* **3**:159-163.

- Pearson JD, Carleton JS and Gordon JL (1980) Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem J* **190**:421-429.
- Peiro C, Rodriguez-Lopez AM, Angulo J, Regadera J, Marin J, Sanchez-Ferrer CF and Lopez-Novoa JM (1998) Endogenous angiotensin II and cell hypertrophy in vascular smooth muscle cultures from hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Cell Physiol Biochem* **8**:106-116.
- Peluffo H, Shacka JJ, Ricart K, Bisig CG, Martinez-Palma L, Pritsch O, Kamaid A, Eiserich JP, Crow JP, Barbeito L and Estevez AG (2004) Induction of motor neuron apoptosis by free 3-nitro-L-tyrosine. *J Neurochem* **89**:602-612.
- Penn JS (1990) Oxygen-induced retinopathy in the rat: possible contribution of peroxidation reactions. *Doc Ophthalmol* **74**:179-186.
- Penn JS, Thum LA and Naash MI (1992) Oxygen-induced retinopathy in the rat. Vitamins C and E as potential therapies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**:1836-1845.
- Penn JS, Thum LA, Rhem MN and Dell SJ (1988) Effects of oxygen rearing on the electroretinogram and GFA-protein in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **29**:1623-1630.
- Penn JS, Tolman BL and Bullard LE (1997) Effect of a water-soluble vitamin E analog, trolox C, on retinal vascular development in an animal model of retinopathy of prematurity. *Free Radic Biol Med* **22**:977-984.
- Penn JS, Tolman BL and Henry MM (1994) Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:3429-3435.

- Pepper MS, Spray DC, Chanson M, Montesano R, Orci L and Meda P (1989) Junctional communication is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol* **109**:3027-3038.
- Pereira CM and Oliveira CR (1997) Glutamate toxicity on a PC12 cell line involves glutathione (GSH) depletion and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **23**:637-647.
- 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.
- Petersen RA, Hunter DG and Mukai S (1994) Retinopathy of prematurity, in *Principles and Practice of Ophthalmology. Clinical Practice* (Albert DA and Jakobiec FA eds) p 2799–2812, W.B. Saunders, Philadelphia.
- Phelps DL and Rosenbaum AL (1977) The role of tocopherol in oxygen-induced retinopathy: kitten model. *Pediatrics* **59 Suppl**:998-1005.
- Pierce EA, Foley ED and Smith LE (1996) Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* **114**:1219-1228.
- Pinkus R, Weiner LM and Daniel V (1996) Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem* **271**:13422-13429.

- Pober JS, Ma W, Biedermann B and Libby P (1997) Vascular cells have limited capacities to activate and differentiate T cells: implications for transplant vascular sclerosis. *Transpl Immunol* **5**:251-254.
- Podesta F, Romeo G, Liu WH, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C and Lorenzi M (2000) Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol* **156**:1025-1032.
- Pohl U, Holtz J, Busse R and Bassenge E (1986) Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* **8**:37-44.
- Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH and Rosen GM (1992) Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **267**:24173-24176.
- Pournaras C, Tsacopoulos M and Chapuis P (1978) Studies on the role of prostaglandins in the regulation of retinal blood flow. *Exp Eye Res* **26**:687-697.
- Prabhakar P, Thatte HS, Goetz RM, Cho MR, Golan DE and Michel T (1998) Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **273**:27383-27388.
- Pratico D, Barry OP, Lawson JA, Adiyaman M, Hwang SW, Khanapure SP, Iuliano L, Rokach J and FitzGerald GA (1998) IPF2alpha-I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3449-3454.
- Pratico D, Rokach J, Lawson J and FitzGerald GA (2004) F2-isoprostanes as indices of lipid peroxidation in inflammatory diseases. *Chem Phys Lipids* **128**:165-171.
- Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM and McIntyre TM (2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* **69**:419-445.

- Preud'homme Y, Demolle D and Boeynaems JM (1985) Metabolism of arachidonic acid in rabbit iris and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **26**:1336-1342.
- Proescholdt MA, Heiss JD, Walbridge S, Muhlhauser J, Capogrossi MC, Oldfield EH and Merrill MJ (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**:613-627.
- Provis J (2001) Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res* **20**:799-821.
- Pueyo ME, N'Diaye N and Michel JB (1996) Angiotensin II-elicited signal transduction via AT1 receptors in endothelial cells. *Br J Pharmacol* **118**:79-84.
- Qaum T, Xu Q, Jousen AM, Clemens MW, Qin W, Miyamoto K, Hassessian H, Wiegand SJ, Rudge J, Yancopoulos GD and Adamis AP (2001) VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:2408-2413.
- Quiniou C, Sennlaub F, Beauchamp MH, Checchin D, Brault S, Gobeil F, Jr., Phetzhesky A and Chemtob S (2004) Molecular mechanism of thromboxane-induced brain microvascular endothelial cell death (manuscript).
- Radi R, Beckman JS, Bush KM and Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* **266**:4244-4250.
- Ramesha CS and Pickett WC (1987) Fatty acid composition of diacyl, alkylacyl, and alkenylacyl phospholipids of control and arachidonate-depleted rat polymorphonuclear leukocytes. *J Lipid Res* **28**:326-331.

- Rampton DS and Collins CE (1993) Review article: thromboxanes in inflammatory bowel disease--pathogenic and therapeutic implications. *Aliment Pharmacol Ther* **7**:357-367.
- Rand MJ and Li CG (1995) Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu Rev Physiol* **57**:659-682.
- Rao GN, Katki KA, Madamanchi NR, Wu Y and Birrer MJ (1999) JunB forms the majority of the AP-1 complex and is a target for redox regulation by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor agonists in smooth muscle cells. *J Biol Chem* **274**:6003-6010.
- Rauhala P, Andoh T, Yeh K and Chiueh CC (2002) Contradictory effects of sodium nitroprusside and S-nitroso-N-acetylpenicillamine on oxidative stress in brain dopamine neurons in vivo. *Ann N Y Acad Sci* **962**:60-72.
- Ray SK, Matzelle DD, Sribnick EA, Guyton MK, Wingrave JM and Banik NL (2003) Calpain inhibitor prevented apoptosis and maintained transcription of proteolipid protein and myelin basic protein genes in rat spinal cord injury. *J Chem Neuroanat* **26**:119-124.
- Raychowdhury MK, Yukawa M, Collins LJ, McGrail SH, Kent KC and Ware JA (1994) Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* **269**:19256-19261.
- Reid IA (2001) Vasoactive peptides, in *Basic and Clinical Pharmacology* (Katzung BG ed) pp 292-310, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.

- Reme CE, Wolfrum U, Imsand C, Hafezi F and Williams TP (1999) Photoreceptor autophagy: effects of light history on number and opsin content of degradative vacuoles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:2398-2404.
- Reneker LW and Overbeek PA (1996) Lens-specific expression of PDGF-A in transgenic mice results in retinal astrocytic hamartomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:2455-2466.
- Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EF, van der Vliet A and Janssen-Heininger YM (2004) Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:8945-8950.
- Reynaud X and Dorey CK (1994) Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:3169-3177.
- Rhodin JA (1968) Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. *J Ultrastruct Res* **25**:452-500.
- Rhodin JA and Fujita H (1989) Capillary growth in the mesentery of normal young rats. Intravital video and electron microscope analyses. *J Submicrosc Cytol Pathol* **21**:1-34.
- Ricci B (1987) Effects of hyperbaric, normobaric and hypobaric oxygen supplementation on retinal vessels in newborn rats: a preliminary study. *Exp Eye Res* **44**:459-464.
- Ricci B (1990) Oxygen-induced retinopathy in the rat model. *Doc Ophthalmol* **74**:171-177.
- Ricci B and Calogero G (1988) Oxygen-induced retinopathy in newborn rats: effects of prolonged normobaric and hyperbaric oxygen supplementation. *Pediatrics* **82**:193-198.

- Ricci B, Lepore D, Iossa M, Santo A, D'Urso M and Maggiano N (1990) Effect of light on oxygen-induced retinopathy in the rat model. Light and OIR in the rat. *Doc Ophthalmol* **74**:287-301.
- Richardson RL, Hausman GJ and Campion DR (1982) Response of pericytes to thermal lesion in the inguinal fat pad of 10-day-old rats. *Acta Anat (Basel)* **114**:41-57.
- Riva CE, Cranstoun SD, Grunwald JE and Petrig BL (1994) Choroidal blood flow in the foveal region of the human ocular fundus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:4273-4281.
- Riva CE, Grunwald JE and Sinclair SH (1983) Laser Doppler Velocimetry study of the effect of pure oxygen breathing on retinal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **24**:47-51.
- Rizzo A, Taylor AE, Townsley MI, Logsdon P, Khimenko PL and Fletcher JR (1995) Platelet-activating factor increases vascular resistance in rat hindquarters by thromboxane A₂. *Am J Physiol* **268**:H1954-1958.
- Robbins SG, Brem RB, Wilson DJ, O'Rourke LM, Robertson JE, Westra I, Planck SR and Rosenbaum JT (1994a) Immunolocalization of integrins in proliferative retinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:3475-3485.
- Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ, Hart CE, Robertson JE, Westra I, Planck SR and Rosenbaum JT (1994b) Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:3649-3663.
- Roberts LJ, 2nd and Morrow JD (1997) The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta* **1345**:121-135.

- Robertson PL, Ar D and Goldstein GW (1990) Phosphoinositide metabolism and prostacyclin formation in retinal microvascular endothelium: stimulation by adenine nucleotides. *Exp Eye Res* **50**:37-44.
- Robinson F, Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL and Sinclair SH (1986) Retinal blood flow autoregulation in response to an acute increase in blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**:722-726.
- Robinson GS, Pierce EA, Rook SL, Foley E, Webb R and Smith LE (1996) Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4851-4856.
- Rodell TC, Cheronis JC, Ohnemus CL, Piermattei DJ and Repine JE (1987) Xanthine oxidase mediates elastase-induced injury to isolated lungs and endothelium. *J Appl Physiol* **63**:2159-2163.
- Rodieck RW (1973) The vertebrate retina. Principles of structure and function, in p 159, W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Rosam AC, Wallace JL and Whittle BJ (1986) Potent ulcerogenic actions of platelet-activating factor on the stomach. *Nature* **319**:54-56.
- Rosenblum WI (1983) Effects of free radical generation on mouse pial arterioles: probable role of hydroxyl radicals. *Am J Physiol* **245**:H139-142.
- Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF and Krum JM (1998) Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7086-7091.

- Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B and Borner C (1998) Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**:496-499.
- Roth S, Rosenbaum PS, Osinski J, Park SS, Toledano AY, Li B and Moshfeghi AA (1997) Ischemia induces significant changes in purine nucleoside concentration in the retina-choroid in rats. *Exp Eye Res* **65**:771-779.
- Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Johns A and Harder DR (1990) Mechanoreception by the endothelium: mediators and mechanisms of pressure- and flow-induced vascular responses. *Blood Vessels* **27**:246-257.
- Rubanyi GM and Polokoff MA (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* **46**:325-415.
- Rubanyi GM, Romero JC and Vanhoutte PM (1986) Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* **250**:H1145-1149.
- Rubanyi GM and Vanhoutte PM (1986) Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* **250**:H822-827.
- Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS and Sessa WC (1998) Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* **101**:731-736.
- Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE and Fredholm BB (1992a) Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **4**:346-369.
- Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE and Fredholm BB (1992b) Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci* **13**:439-445.

- Rui T, Cepinskas G, Feng Q, Ho YS and Kvietys PR (2001) Cardiac myocytes exposed to anoxia-reoxygenation promote neutrophil transendothelial migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**:H440-447.
- Sachinidis A, Flesch M, Ko Y, Schror K, Bohm M, Dusing R and Vetter H (1995) Thromboxane A₂ and vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* **26**:771-780.
- Sadler JE (1997) Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost* **78**:392-395.
- Saez JC, Berthoud VM, Moreno AP and Spray DC (1993) Gap junctions. Multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **27**:163-198.
- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM and Venkatachalam MA (1999) Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* **107**:489-506.
- Saito K, Elce JS, Hamos JE and Nixon RA (1993) Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2628-2632.
- Sakagami K, Wu DM and Puro DG (1999) Physiology of rat retinal pericytes: modulation of ion channel activity by serum-derived molecules. *J Physiol* **521 Pt 3**:637-650.
- Sakamoto H, Tosaki T and Nakagawa Y (2002) Overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase modulates acetyl-CoA, 1-O-alkyl-2-lyso-

sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase activity. *J Biol Chem* **277**:50431-50438.

Salceda S and Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* **272**:22642-22647.

Samdani AF, Newcamp C, Resink A, Facchinetti F, Hoffman BE, Dawson VL and Dawson TM (1997) Differential susceptibility to neurotoxicity mediated by neurotrophins and neuronal nitric oxide synthase. *J Neurosci* **17**:4633-4641.

Sanchez A, Alvarez AM, Benito M and Fabregat I (1996) Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* **271**:7416-7422.

Sanchez-Crespo M, Alonso F, Barat A and Egido J (1982) Rat serum sickness: possible role of inflammatory mediators allowing deposition of immune complexes in the glomerular basement membrane. *Clin Exp Immunol* **49**:631-638.

Sasaki J, Fukami E, Mimura S, Hayakawa M, Kitoh J and Watanabe K (2000) Abnormal cerebral neuronal migration in a rat model of intrauterine growth retardation induced by synthetic thromboxane A(2). *Early Hum Dev* **58**:91-99.

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W and Qin Y (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**:70-74.

- Sato Y and Rifkin DB (1989) Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* **109**:309-315.
- Savill J, Dransfield I, Hogg N and Haslett C (1990) Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* **343**:170-173.
- Schaffer DB, Palmer EA, Plotsky DF, Metz HS, Flynn JT, Tung B and Hardy RJ (1993) Prognostic factors in the natural course of retinopathy of prematurity. The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Ophthalmology* **100**:230-237.
- Scherf H, Nies AS, Schwertschlag U, Hughes M and Gerber JG (1986) Hemodynamic effects of platelet activating factor in the dog kidney in vivo. *Hypertension* **8**:737-741.
- Schimke I, Griesmacher A, Weigel G, Holzhutter HG and Muller MM (1992) Effects of reactive oxygen species on eicosanoid metabolism in human endothelial cells. *Prostaglandins* **43**:281-292.
- Schlondorff D (1987) The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J* **1**:272-281.
- Schmetterer L, Findl O, Strenn K, Jilma B, Graselli U, Eichler HG and Wolzt M (1997) Effects of endothelin-1 (ET-1) on ocular hemodynamics. *Curr Eye Res* **16**:687-692.
- Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F and Bohme E (1988) Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol* **154**:213-216.

- Schmitz-Spanke S and Schipke JD (2000) Potential role of endothelin-1 and endothelin antagonists in cardiovascular diseases. *Basic Res Cardiol* **95**:290-298.
- Schnittler HJ (1998) Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol* **93 Suppl 3**:30-39.
- Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, Cadenas E and Rice-Evans C (2002) MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* **23**:861-880.
- Schuman EM and Madison DV (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* **254**:1503-1506.
- Schuster VL (1998) Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* **60**:221-242.
- Schuster VL (2002) Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:633-647.
- Schwartz LM, Smith SW, Jones ME and Osborne BA (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:980-984.
- Schwartz SM and Liaw L (1993) Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* **21 Suppl 1**:S31-49.
- Sciotti VM, Roche FM, Grabb MC and Van Wylen DG (1992) Adenosine receptor blockade augments interstitial fluid levels of excitatory amino acids during cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **12**:646-655.
- Sciotti VM and Van Wylen DG (1993) Attenuation of ischemia-induced extracellular adenosine accumulation by homocysteine. *J Cereb Blood Flow Metab* **13**:208-213.

- Scornik FS and Toro L (1992) U46619, a thromboxane A₂ agonist, inhibits K_{Ca} channel activity from pig coronary artery. *Am J Physiol* **262**:C708-713.
- Seaber JH, Machemer R, Elliott D, Buckley EG, deJuan E and Martin DF (1995) Long-term visual results of children after initially successful vitrectomy for stage V retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* **102**:199-204.
- Sedarous M, Keramaris E, O'Hare M, Melloni E, Slack RS, Elce JS, Greer PA and Park DS (2003) Calpains mediate p53 activation and neuronal death evoked by DNA damage. *J Biol Chem* **278**:26031-26038.
- Seglen PO and Bohley P (1992) Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* **48**:158-172.
- Seligsohn EE and Bill A (1993) Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on the cardiovascular system of the anaesthetized rabbit and on the cardiovascular response to thyrotropin-releasing hormone. *Br J Pharmacol* **109**:1219-1225.
- Semenza GL (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* **88**:1474-1480.
- Sennlaub F, Courtois Y and Goureau O (2001) Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. *J Clin Invest* **107**:717-725.
- Sennlaub F, Courtois Y and Goureau O (2002) Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy. *J Neurosci* **22**:3987-3993.
- Seo MS, Kwak N, Ozaki H, Yamada H, Okamoto N, Yamada E, Fabbro D, Hofmann F, Wood JM and Campochiaro PA (1999) Dramatic inhibition of retinal and

- choroidal neovascularization by oral administration of a kinase inhibitor. *Am J Pathol* **154**:1743-1753.
- Serhan C, Anderson P, Goodman E, Dunham P and Weissmann G (1981) Phosphatidate and oxidized fatty acids are calcium ionophores. Studies employing arsenazo III in liposomes. *J Biol Chem* **256**:2736-2741.
- Shafiee A, Penn JS, Krutzsch HC, Inman JK, Roberts DD and Blake DA (2000) Inhibition of retinal angiogenesis by peptides derived from thrombospondin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:2378-2388.
- Shall S and de Murcia G (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* **460**:1-15.
- Sharma J, Barr SM, Geng Y, Yun Y and Higgins RD (2003) Ibuprofen improves oxygen-induced retinopathy in a mouse model. *Curr Eye Res* **27**:309-314.
- Sharpe MA and Cooper CE (1998) Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem J* **332** (Pt 1):9-19.
- Shasby DM, Lind SE, Shasby SS, Goldsmith JC and Hunninghake GW (1985) Reversible oxidant-induced increases in albumin transfer across cultured endothelium: alterations in cell shape and calcium homeostasis. *Blood* **65**:605-614.
- Shasby DM, Yorek M and Shasby SS (1988) Exogenous oxidants initiate hydrolysis of endothelial cell inositol phospholipids. *Blood* **72**:491-499.
- Shattil SJ, Kashiwagi H and Pampori N (1998) Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* **91**:2645-2657.

- Shaul PW (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* **64**:749-774.
- Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG and Michel T (1996) Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* **271**:6518-6522.
- Shen BQ, Lee DY and Zioncheck TF (1999) Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem* **274**:33057-33063.
- Shen RF, Zhang L, Baek SJ, Tai HH and Lee KD (1994) The porcine thromboxane synthase-encoding cDNA: sequence, mRNA expression and enzyme production in Sf9 insect cells. *Gene* **140**:261-265.
- Shenker A, Goldsmith P, Unson CG and Spiegel AM (1991) The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family. *J Biol Chem* **266**:9309-9313.
- Shepro D and Morel NM (1993) Pericyte physiology. *FASEB J* **7**:1031-1038.
- Shi LC, Wang HY, Horwitz J and Friedman E (1996) Guanine nucleotide regulatory proteins, Gq and Gi1/2, mediate platelet-activating factor-stimulated phosphoinositide metabolism in immortalized hippocampal cells. *J Neurochem* **67**:1478-1484.
- Shi LC, Wang HY and Friedman E (1998) Involvement of platelet-activating factor in cell death induced under ischemia/postischemia-like conditions in an immortalized hippocampal cell line. *J Neurochem* **70**:1035-1044.

- Shih SC, Ju M, Liu N and Smith LE (2003) Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity. *J Clin Invest* **112**:50-57.
- Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, Folkman J and D'Amore PA (1995) Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med* **1**:182-193.
- Shindou H, Ishii S, Uozumi N and Shimizu T (2000) Roles of cytosolic phospholipase A(2) and platelet-activating factor receptor in the Ca-induced biosynthesis of PAF. *Biochem Biophys Res Commun* **271**:812-817.
- Shiokawa D, Maruta H and Tanuma S (1997) Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase suppress nuclear fragmentation and apoptotic-body formation during apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Lett* **413**:99-103.
- Shirinsky VP, Sobolevsky AV, Grigorian G, Danilov SM, Tararak EM and Tkachuk VA (1988) Agonist-induced polyphosphoinositide breakdown in cultured human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Health Psychol* **7 Suppl**:61-74.
- Shizukuda Y and Buttrick PM (2002) Protein kinase C-zeta modulates thromboxane A(2)-mediated apoptosis in adult ventricular myocytes via Akt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**:H320-327.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**:843-845.

- Siegfried MR, Erhardt J, Rider T, Ma XL and Lefer AM (1992) Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* **260**:668-675.
- Siess W (1989) Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* **69**:58-178.
- Simionescu N, Simionescu M and Palade GE (1975) Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol* **64**:586-607.
- Simpson DA, Murphy GM, Bhaduri T, Gardiner TA, Archer DB and Stitt AW (1999) Expression of the VEGF gene family during retinal vaso-obliteration and hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **262**:333-340.
- Slater AF, Nobel CS and Orrenius S (1995) The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1271**:59-62.
- Smith LE (2004) Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth Horm IGF Res* **14 Suppl A**:S140-144.
- Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, Foley E, Smith RG and Schaeffer JM (1997a) Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science* **276**:1706-1709.
- Smith LE, Sweet E, Freedman S and D'Amore PA (1992) Alterations in endothelial superoxide dismutase levels as a function of growth state in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**:36-41.
- Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R and D'Amore PA (1994) Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:101-111.

- Smith WJ, Underwood LE, Keyes L and Clemmons DR (1997b) Use of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein measurements to monitor feeding of premature infants. *J Clin Endocrinol Metab* **82**:3982-3988.
- Smith WL (1986) Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu Rev Physiol* **48**:251-262.
- Smith WL (1989) The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* **259**:315-324.
- Smith WL and Marnett LJ (1991) Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* **1083**:1-17.
- Smith WL and Song I (2002) The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:115-128.
- Snyder F (1995) Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem J* **305 (Pt 3)**:689-705.
- Snyder F, Lee TC and Malone B (1992) 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate acetyltransferase. *Methods Enzymol* **209**:407-412.
- Snyder SH (1992) Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* **257**:494-496.
- Southern PA and Powis G (1988) Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* **63**:381-389.
- Souza JM, Daikhin E, Yudkoff M, Raman CS and Ischiropoulos H (1999) Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* **371**:169-178.

- Speiser P, Gittelsohn AM and Patz A (1968) Studies on diabetic retinopathy. 3. Influence of diabetes on intramural pericytes. *Arch Ophthalmol* **80**:332-337.
- Spranger J, Hammes HP, Preissner KT, Schatz H and Pfeiffer AF (2000) Release of the angiogenesis inhibitor angiostatin in patients with proliferative diabetic retinopathy: association with retinal photocoagulation. *Diabetologia* **43**:1404-1407.
- Spurney RF (1998) Role of C-terminal serines in desensitization and phosphorylation of the mouse thromboxane receptor. *J Biol Chem* **273**:28496-28503.
- Spurney RF (2001) Regulation of thromboxane receptor (TP) phosphorylation by protein phosphatase 1 (PP1) and PP2A. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:592-599.
- Spurney RF, Middleton JP, Raymond JR and Coffman TM (1994) Modulation of thromboxane receptor activation in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* **267**:F467-478.
- Stahl GL and Lefler AM (1987) Heterogeneity of vascular smooth muscle responsiveness to lipid vasoactive mediators. *Blood Vessels* **24**:24-30.
- Stamler JS and Meissner G (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* **81**:209-237.
- Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A and Keshet E (1995) Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* **15**:5363-5368.
- Stellmach V, Crawford SE, Zhou W and Bouck N (2001) Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2593-2597.

- Stiris T, Hansen TW, Odden JP, Morkrid L and Bratlid D (1989a) Effect of light and hyperoxia on ocular blood flow in the newborn piglet. *Biol Neonate* **55**:191-196.
- Stiris T, Odden JP, Hansen TW, Hall C and Bratlid D (1989b) The effect of arterial PCO₂-variations on ocular and cerebral blood flow in the newborn piglet. *Pediatr Res* **25**:205-208.
- Stjernschantz J (1984) Autacoids and peptides in pharmacology of the eye, in *Handbook of experimental pharmacology* (Sears ML ed) pp 311-365, Springer-Verlag, Berlin.
- Stone J, Chan-Ling T, Pe'er J, Itin A, Gnessin H and Keshet E (1996) Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:290-299.
- Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T and Keshet E (1995) Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* **15**:4738-4747.
- Stone J and Maslim J (1997a) Mechanisms of retinal angiogenesis. *Prog Retin Eye Res* **17**:157-181.
- Stone J and Maslim J (1997b) Mechanisms of retinal angiogenesis. *Prog Retin Eye Res* **16**:157-181.
- Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ and van Faassen EE (1998) Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* **438**:161-164.

- Stuart MJ, Phelps DL and Setty BN (1988) Changes in oxygen tension and effects on cyclooxygenase metabolites: III. Decrease of retinal prostacyclin in kittens exposed to hyperoxia. *Pediatrics* **82**:367-372.
- Studer RK, Negrete H, Craven PA and DeRubertis FR (1995) Protein kinase C signals thromboxane induced increases in fibronectin synthesis and TGF-beta bioactivity in mesangial cells. *Kidney Int* **48**:422-430.
- Stuehr DJ (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* **1411**:217-230.
- Stuehr DJ and Marletta MA (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:7738-7742.
- Su EN, Yu DY, Alder VA, Yu PK and Cringle SJ (1995) Altered vasoactivity in the early diabetic eye: measured in the isolated perfused rat eye. *Exp Eye Res* **61**:699-711.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P and Nagata S (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**:1169-1178.
- Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Ikeda Y, Sato K, Taniyama Y, Ito S and Takeuchi K (2002) Transcription suppression of thromboxane receptor gene by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via an interaction with Sp1 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **277**:9676-9683.
- Sullivan JL and Newton RB (1988) Serum antioxidant activity in neonates. *Arch Dis Child* **63**:748-750.

- Sun DX, Rui YC, Zeng GQ, Zhu J and Shen YA (1992) Specific binding sites of platelet activating factor on the intact bovine cerebral microvascular endothelial cells and antagonism of drugs. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **13**:326-329.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN and Yancopoulos GD (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**:1171-1180.
- Sutter CH, Laughner E and Semenza GL (2000) Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4748-4753.
- Suzuma K, Takagi H, Otani A, Oh H and Honda Y (1999) Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization. *Am J Pathol* **154**:343-354.
- Szabo C, Wu CC, Mitchell JA, Gross SS, Thiemermann C and Vane JR (1993) Platelet-activating factor contributes to the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Circ Res* **73**:991-999.
- Tada M and Kuzuya T (1985) Altered metabolism of thromboxane A2 and prostacyclin in the pathogenesis of coronary vasospasm and thrombosis. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **15**:481-484.
- Tadesse M, Yan Y, Yossuck P and Higgins RD (2001) Captopril improves retinal neovascularization via endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:1867-1872.
- Tausch HW and Ballard RA (1998) in *Avery's Diseases of the Newborn* (Saunders ed) p 385-391, Philadelphia.

- Takagi C, Bursell SE, Lin YW, Takagi H, Duh E, Jiang Z, Clermont AC and King GL (1996a) Regulation of retinal hemodynamics in diabetic rats by increased expression and action of endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:2504-2518.
- Takagi C, King GL, Takagi H, Lin YW, Clermont AC and Bursell SE (1996b) Endothelin-1 action via endothelin receptors is a primary mechanism modulating retinal circulatory response to hyperoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:2099-2109.
- Takagi H, King GL, Ferrara N and Aiello LP (1996c) Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk gene expression through adenosine A2 receptors in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:1311-1321.
- Takagi H, King GL, Robinson GS, Ferrara N and Aiello LP (1996d) Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:2165-2176.
- Takagi H, Suzuma K, Otani A, Oh H, Koyama S, Ohashi H, Watanabe D, Ojima T, Suganami E and Honda Y (2002) Role of vitronectin receptor-type integrins and osteopontin in ischemia-induced retinal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* **46**:270-278.
- Takahashi K, Brooks RA, Kanse SM, Ghatei MA, Kohner EM and Bloom SR (1989) Production of endothelin 1 by cultured bovine retinal endothelial cells and presence of endothelin receptors on associated pericytes. *Diabetes* **38**:1200-1202.
- Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd, Hoover RL and Badr KF (1992) Glomerular actions of a free radical-generated novel

- prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest* **90**:136-141.
- Takahashi M, Ikeda U, Masuyama J, Funayama H, Kano S and Shimada K (1996) Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine* **8**:817-821.
- Takano T, Honda Z, Sakanaka C, Izumi T, Kameyama K, Haga K, Haga T, Kurokawa K and Shimizu T (1994) Role of cytoplasmic tail phosphorylation sites of platelet-activating factor receptor in agonist-induced desensitization. *J Biol Chem* **269**:22453-22458.
- Takatani M and Tsushima S (1991) Structure activity relationship in CV-3988 and CV-6209 PAF antagonist series, in *CRC Handbook of PAF and PAF antagonists* (Braquet P ed), CRC Press, Boca Raton.
- Tamarat R, Silvestre JS, Durie M and Levy BI (2002) Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Lab Invest* **82**:747-756.
- Tate RM, Morris HG, Schroeder WR and Repine JE (1984) Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline-perfused rabbit lungs. *J Clin Invest* **74**:608-613.
- Taylor L, Menconi MJ and Polgar P (1983) The participation of hydroperoxides and oxygen radicals in the control of prostaglandin synthesis. *J Biol Chem* **258**:6855-6857.

- Tazawa R, Green ED, Ohashi K, Wu KK and Wang LH (1996) Characterization of the complete genomic structure of human thromboxane synthase gene and functional analysis of its promoter. *Arch Biochem Biophys* **334**:349-356.
- Tebbs C, Pratten MK and Broughton Pipkin F (1999) Angiotensin II is a growth factor in the peri-implantation rat embryo. *J Anat* **195 (Pt 1)**:75-86.
- Teitel D (1992) Physiologic development of the cardiovascular system in the fetus, in *Fetal and Neonatal Physiology* (R. Polin and W. Fox W ed) p 609–619, Saunders, Philadelphia.
- Tenneti L, D'Emilia DM and Lipton SA (1997) Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases. *Neurosci Lett* **236**:139-142.
- Teoule R (1987) Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **51**:573-589.
- Thaete LG, Neerhof MG, Jilling T and Caplan MS (2003) Infusion of exogenous platelet-activating factor produces intrauterine growth restriction in the rat. *J Soc Gynecol Investig* **10**:145-150.
- Thomas DW, Mannon RB, Mannon PJ, Latour A, Oliver JA, Hoffman M, Smithies O, Koller BH and Coffman TM (1998) Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂. *J Clin Invest* **102**:1994-2001
- Tilton RG, Miller EJ, Kilo C and Williamson JR (1985) Pericyte form and distribution in rat retinal and uveal capillaries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **26**:68-73.

- Tin W, Milligan DWA, Pennefather P and Hey E (2001) Pulse oximetry, severe retinopathy, and outcome at one year in babies of less than 28 weeks gestation. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal* **84**:F106–F110.
- Toda N, Zhang JX, Ayajiki K and Okamura T (1995) Mechanisms underlying endothelium-independent relaxation by acetylcholine in canine retinal and cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **274**:1507-1512.
- Tombran-Tink J, Chader GG and Johnson LV (1991) PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* **53**:411-414.
- Tone Y, Miyata A, Hara S, Yukawa S and Tanabe T (1994) Abundant expression of thromboxane synthase in rat macrophages. *FEBS Lett* **340**:241-244.
- Tong N, Perry SW, Zhang Q, James HJ, Guo H, Brooks A, Bal H, Kinnear SA, Fine S, Epstein LG, Dairaghi D, Schall TJ, Gendelman HE, Dewhurst S, Sharer LR and Gelbard HA (2000) Neuronal fractalkine expression in HIV-1 encephalitis: roles for macrophage recruitment and neuroprotection in the central nervous system. *J Immunol* **164**:1333-1339.
- Tornquist P and Alm A (1979) Retinal and choroidal contribution to retinal metabolism in vivo. A study in pigs. *Acta Physiol Scand* **106**:351-357.
- Tosun M, Paul RJ and Rapoport RM (1998) Role of extracellular Ca⁺⁺ influx via L-type and non-L-type Ca⁺⁺ channels in thromboxane A₂ receptor-mediated contraction in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **284**:921-928.

- Tripathi BJ and Tripathi RC (1984) Cellular and subcellular events in retinopathy of oxygen toxicity with a preliminary report on the preventive role of vitamin E and gamma-aminobutyric acid: a study in vitro. *Curr Eye Res* **3**:193-208.
- Trump BF and Berezesky IK (1995) Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* **9**:219-228.
- Tsacopoulos M, Girardier L and Vuagnat P (1974) [Effect augmenting O₂ partial pressure and of b'-pyridyl-carbinol (Ronicol) on relative retinal blood flow in man]. *Ophthalmologica* **168**:140-153.
- Turek JW, Halmos T, Sullivan NL, Antonakis K and Le Breton GC (2002) Mapping of a ligand-binding site for the human thromboxane A₂ receptor protein. *J Biol Chem* **277**:16791-16797.
- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA and Amento EP (1992) Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* **153**:557-562.
- Upalakalin JN, Hemo I, Dehio C, Keshet E and Benjamin LE (2002) Survival mechanisms of VEGF and PlGF during microvascular remodeling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **67**:181-187.
- Ushikubi F, Aiba Y, Nakamura K, Namba T, Hirata M, Mazda O, Katsura Y and Narumiya S (1993) Thromboxane A₂ receptor is highly expressed in mouse immature thymocytes and mediates DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* **178**:1825-1830.

- Ushikubi F, Nakajima M, Hirata M, Okuma M, Fujiwara M and Narumiya S (1989) Purification of the thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor from human blood platelets. *J Biol Chem* **264**:16496-16501.
- Ushikubi F, Nakamura K and Narumiya S (1994) Functional reconstitution of platelet thromboxane A₂ receptors with G_q and Gi₂ in phospholipid vesicles. *Mol Pharmacol* **46**:808-816.
- Vallance P, Collier J and Moncada S (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* **2**:997-1000.
- Van Cruchten S and Van Den Broeck W (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* **31**:214-223.
- van den Bosch H, Sturk A, ten Cate JW and Aarsman AJ (1991) Studies on the selectivity of enzymes involved in platelet-activating factor formation in stimulated cells. *Lipids* **26**:967-973.
- van der Vuurst H, van Willigen G, van Spronsen A, Hendriks M, Donath J and Akkerman JW (1997) Signal transduction through trimeric G proteins in megakaryoblastic cell lines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**:1830-1836.
- van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C and Isner JM (1997) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* **95**:1030-1037.
- Vane JR, Anggard EE and Botting RM (1990) Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* **323**:27-36.

- Vanhoutte PM (1989) Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension* **13**:658-667.
- Vargas HM, Ignarro LJ and Chaudhuri G (1990) Physiological release of nitric oxide is dependent on the level of vascular tone. *Eur J Pharmacol* **190**:393-397.
- Verbeek MM, Otte-Holler I, Wesseling P, Ruiter DJ and de Waal RM (1994) Induction of alpha-smooth muscle actin expression in cultured human brain pericytes by transforming growth factor-beta 1. *Am J Pathol* **144**:372-382.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**:39-51.
- Veza R, Habib A and FitzGerald GA (1999) Differential signaling by the thromboxane receptor isoforms via the novel GTP-binding protein, Gh. *J Biol Chem* **274**:12774-12779.
- Vinorez SA, Seo MS, Derevjani NL and Campochiaro PA (2003) Photoreceptor-specific overexpression of platelet-derived growth factor induces proliferation of endothelial cells, pericytes, and glial cells and aberrant vascular development: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* **140**:169-183.
- Virchow R (1858) Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre: Zwanzig Vorlesungen, gehalten während der Monate Februar, März und April 1858, in *Pathologischen Institute zu Berlin* pp 1-440, August Hirschwald, Berlin.

- Voet D, Voet JG and Pratt CW (1998) in *Fundamentals of Biochemistry* (John Wiley & Sons I ed) pp 224-226, 683-685, New York.
- Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M and Bouck NP (2002) Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* **8**:349-357.
- von Kobbe C, Harrigan JA, May A, Opresko PL, Dawut L, Cheng WH and Bohr VA (2003) Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosyl)ation pathway after DNA damage. *Mol Cell Biol* **23**:8601-8613.
- von Recklinghausen F (1910) *Untersuchungen über Rachitis und Osteomalacie*. Jena: Verlag Gustav Fischer.
- Wada M, Ogata N, Otsuji T and Uyama M (1999) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR/flk-1) mRNA in experimental choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* **18**:203-213.
- Walczak H and Krammer PH (2000) The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* **256**:58-66.
- Walsh SW, Wang Y and Jesse R (1993) Peroxide induces vasoconstriction in the human placenta by stimulating thromboxane. *Am J Obstet Gynecol* **169**:1007-1012.
- Wang LH, Ohashi K and Wu KK (1991) Isolation of partial complementary DNA encoding human thromboxane synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **177**:286-291.

- Wang LH, Tazawa R, Lang AQ and Wu KK (1994) Alternate splicing of human thromboxane synthase mRNA. *Arch Biochem Biophys* **315**:273-278.
- Wang Y and Rose B (1997) An inhibition of gap-junctional communication by cadherins. *J Cell Sci* **110 (Pt 3)**:301-309.
- Ward SG and Westwick J (1988) Antagonism of the platelet activating factor-induced rise of the intracellular calcium ion concentration of U937 cells. *Br J Pharmacol* **93**:769-774.
- Warso MA and Lands WE (1983) Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *Br Med Bull* **39**:277-280.
- Wei EP, Kontos HA and Beckman JS (1996) Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol* **271**:H1262-1266.
- Weibel ER (1974) On pericytes, particularly their existence on lung capillaries. *Microvasc Res* **8**:218-235.
- Weinberger B, Laskin DL, Heck DE and Laskin JD (2002) Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicol Appl Pharmacol* **181**:60-67.
- Weiss HJ and Lages BA (1977) Possible congenital defect in platelet thromboxane synthetase. *Lancet* **1**:760-761.
- Weiss SJ, Turk J and Needleman P (1979) A mechanism for the hydroperoxide-mediated inactivation of prostacyclin synthetase. *Blood* **53**:1191-1196.
- Whatley RE, Zimmerman GA, McIntyre TM and Prescott SM (1988) Endothelium from diverse vascular sources synthesizes platelet-activating factor. *Arteriosclerosis* **8**:321-331.

- Whittle BJ, Kauffman GL and Moncada S (1981) Vasoconstriction with thromboxane A₂ induces ulceration of the gastric mucosa. *Nature* **292**:472-474.
- Whorton AR, Montgomery ME and Kent RS (1985) Effect of hydrogen peroxide on prostaglandin production and cellular integrity in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* **76**:295-302.
- Wilcox CS and Welch WJ (1990) Thromboxane mediation of the pressor response to infused angiotensin II. *Am J Hypertens* **3**:242-249.
- Wilcox CS, Welch WJ and Snellen H (1991) Thromboxane mediates renal hemodynamic response to infused angiotensin II. *Kidney Int* **40**:1090-1097.
- Wiles ME, Welbourn R, Goldman G, Hechtman HB and Shepro D (1991) Thromboxane-induced neutrophil adhesion to pulmonary microvascular and aortic endothelium is regulated by CD18. *Inflammation* **15**:181-199.
- Wilkinson-Berka JL, Alousis NS, Kelly DJ and Gilbert RE (2003) COX-2 inhibition and retinal angiogenesis in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:974-979.
- Wilkinson-Berka JL, Babic S, De Gooyer T, Stitt AW, Jaworski K, Ong LG, Kelly DJ and Gilbert RE (2004) Inhibition of platelet-derived growth factor promotes pericyte loss and angiogenesis in ischemic retinopathy. *Am J Pathol* **164**:1263-1273.
- Williams CS and DuBois RN (1996) Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* **270**:G393-400.

- Wilson PS, Thompson WJ, Moore TM, Khimenko PL and Taylor AE (1997) Vasoconstriction increases pulmonary nitric oxide synthesis and circulating cyclic GMP. *J Surg Res* **70**:75-83.
- Wingrave JM, Schaecher KE, Sribnick EA, Wilford GG, Ray SK, Hazen-Martin DJ, Hogan EL and Banik NL (2003) Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* **73**:95-104.
- Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, Vitek M, Feelisch M and Grisham MB (2001) Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* **3**:203-213.
- Wink DA and Mitchell JB (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* **25**:434-456.
- Winterbourn CC (1983) Lactoferrin-catalysed hydroxyl radical production. Additional requirement for a chelating agent. *Biochem J* **210**:15-19.
- Wissner A, Schaub RE, Sum PE, Kohler CA and Goldstein BM (1985) Analogues of platelet activating factor (PAF). 2. Some modifications of the glycerine backbone. *J Med Chem* **28**:1181-1187.
- Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ and Schlingemann RO (2003) Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* **22**:1-29.
- Wolin MS (1996) Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation* **3**:1-17.

- Wolin MS, Messina EJ and Kaley G (1989) Involvement of prostaglandins in arteriolar vasodilation to peroxides. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **19**:281-284.
- Wolin MS, Rodenburg JM, Messina EJ and Kaley G (1987) Oxygen metabolites and vasodilator mechanisms in rat cremasteric arterioles. *Am J Physiol* **252**:H1159-1163.
- Wollensak G, Schaefer HE and Ihling C (1998) An immunohistochemical study of endothelin-1 in the human eye. *Curr Eye Res* **17**:541-545.
- Wong VG and Macri FJ (1964) Vasculature of the Cat Eye. *Arch Ophthalmol* **72**:351-358.
- Wood J and Garthwaite J (1994) Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* **33**:1235-1244.
- Wyllie AH, Kerr JF and Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**:251-306.
- Xie QW, Cho H, Kashiwabara Y, Baum M, Weidner JR, Elliston K, Mumford R and Nathan C (1994) Carboxyl terminus of inducible nitric oxide synthase. Contribution to NADPH binding and enzymatic activity. *J Biol Chem* **269**:28500-28505.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL and Simmons DL (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2692-2696.

- Xiong M, Elson G, Legarda D and Leibovich SJ (1998) Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Pathol* **153**:587-598.
- Xu GZ, Li WW and Tso MO (1996) Apoptosis in human retinal degenerations. *Trans Am Ophthalmol Soc* **94**:411-430; discussion 430-411.
- Yaekashiwa M and Wang LH (2002) Transcriptional control of the human thromboxane synthase gene in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **277**:22497-22508.
- Yamada H, Yamada E, Ando A, Seo MS, Esumi N, Okamoto N, Vinore M, LaRochelle W, Zack DJ and Campochiaro PA (2000) Platelet-derived growth factor-A-induced retinal gliosis protects against ischemic retinopathy. *Am J Pathol* **156**:477-487.
- Yamada H, Yamada E, Hackett SF, Ozaki H, Okamoto N and Campochiaro PA (1999) Hyperoxia causes decreased expression of vascular endothelial growth factor and endothelial cell apoptosis in adult retina. *J Cell Physiol* **179**:149-156.
- Yamamoto R, Brecht DS, Dawson TM, Snyder SH and Stone RA (1993) Enhanced expression of nitric oxide synthase by rat retina following pterygopalatine parasympathetic denervation. *Brain Res* **631**:83-88.
- Yamamoto T, Maruyama W, Kato Y, Yi H, Shamoto-Nagai M, Tanaka M, Sato Y and Naoi M (2002) Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm* **109**:1-13.
- Yang X, Chang HY and Baltimore D (1998) Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell* **1**:319-325.

- Yao K, Tschudi M, Flammer J and Luscher TF (1991) Endothelium-dependent regulation of vascular tone of the porcine ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**:1791-1798.
- Yokoyama C, Miyata A, Ihara H, Ullrich V and Tanabe T (1991) Molecular cloning of human platelet thromboxane A synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **178**:1479-1484.
- Yu DY, Alder VA, Su EN, Mele EM, Cringle SJ and Morgan WH (1992) Agonist response of human isolated posterior ciliary artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**:48-54.
- Yu DY and Cringle SJ (2001) Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog Retin Eye Res* **20**:175-208.
- Yu DY, Cringle SJ, Alder V and Su EN (1999) Intraretinal oxygen distribution in the rat with graded systemic hyperoxia and hypercapnia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:2082-2087.
- Yu DY, Cringle SJ, Alder VA, Su EN and Yu PK (1996) Intraretinal oxygen distribution and choroidal regulation in the avascular retina of guinea pigs. *Am J Physiol* **270**:H965-973.
- Yu DY, Su EN, Cringle SJ and Yu PK (2003) Isolated preparations of ocular vasculature and their applications in ophthalmic research. *Prog Retin Eye Res* **22**:135-169.
- Yusa T, Beckman JS, Crapo JD and Freeman BA (1987) Hyperoxia increases H₂O₂ production by brain in vivo. *J Appl Physiol* **63**:353-358.

- Yusuf K, Smith SD, Levy R, Schaiff WT, Wyatt SM, Sadovsky Y and Nelson DM (2001) Thromboxane A₂ limits differentiation and enhances apoptosis of cultured human trophoblasts. *Pediatr Res* **50**:203-209.
- Zeng XX, Ng YK and Ling EA (2000) Labelling of retinal microglial cells following an intravenous injection of a fluorescent dye into rats of different ages. *J Anat* **196**:173-179.
- Zhang J, Patel JM and Block ER (1997a) Molecular cloning, characterization and expression of a nitric oxide synthase from porcine pulmonary artery endothelial cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **116**:485-491.
- Zhang L, Chase MB and Shen RF (1993) Molecular cloning and expression of murine thromboxane synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **194**:741-748.
- Zhang L, Xiao H, Schultz RA and Shen RF (1997b) Genomic organization, chromosomal localization, and expression of the murine thromboxane synthase gene. *Genomics* **45**:519-528.
- Zhang R, Min W and Sessa WC (1995) 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.
- Zhang Y, Porat RM, Alon T, Keshet E and Stone J (1999) Tissue oxygen levels control astrocyte movement and differentiation in developing retina. *Brain Res Dev Brain Res* **118**:135-145.
- Zhang Y and Stone J (1997) Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:1653-1666.

- Zhu P, DeCoster MA and Bazan NG (2004) Interplay among platelet-activating factor, oxidative stress, and group I metabotropic glutamate receptors modulates neuronal survival. *J Neurosci Res* **77**:525-531.
- Zhu Y, Park TS and Gidday JM (1998) Mechanisms of hyperoxia-induced reductions in retinal blood flow in newborn pig. *Exp Eye Res* **67**:357-369.
- Zhu Z, Bohlen P and Witte L (2002) Clinical development of angiogenesis inhibitors to vascular endothelial growth factor and its receptors as cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* **2**:135-156.
- Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ and Bicknell R (1997) Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* **99**:2625-2634.
- Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM and Stafforini DM (2002) The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* **30**:S294-301.
- Zoratti M and Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**:139-176.
- Zou MH and Ullrich V (1996) Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett* **382**:101-104.

ANNEXE 1

Accord des coauteurs

ANNEXE 2

Autorisation des éditeurs

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant : Martin Beauchamp

Sigle et titre du programme : Ph.D. en Pharmacologie

2. Description de l'article: Description du rôle du monoxyde d'azote dans un modèle animal de rétinopathie du prématuré. Soumis à *Free Radical Biology Medicine* en mai 2004 sous le titre **Cytotoxic versus cytoprotective effects of NO on retinal endothelium are redox dependant.**

Auteurs : M Beauchamp, F Sennlaub, G Speranza, F Gobeil jr, D Checchin, E Kermorvant-Duchemin, P Lachapelle, DR Varma, S Chemtob.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant:

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Martin Beauchamp** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre **Interactions entre le thromboxane A₂ (TXA₂), les facteurs d'activation plaquettaire (PAF) et le monoxyde d'azote (NO) lors de la vaso-oblitération rétinienne. Implications dans la rétinopathie du prématuré.**

Florian Sennlaub

[Signature]

18/5/04

Coauteur

Signature

Date

Giovanna Speranza

[Signature]

21-05-04

Coauteur

Signature

Date

Fernand Gobeil jr

[Signature]

18 Mai 2004

Coauteur

Date

Daniella Checchin

[Redacted Signature]

10/6/04

Coauteur

Date

Elsa Kermorvant-Duchemin

[Redacted Signature]

10/06/04

Coauteur

Signature

Date

Daniel Abran

[Redacted Signature]

10/10/04

Coauteur

Date

Pierre Hardy

[Redacted Signature]

2004.06.10

Coauteur

Date

Pierre Lachapelle

[Redacted Signature]

10/10/04

Coauteur

Signature

Date

Daya R. Varma

[Redacted Signature]

May 20, 04

Coauteur

Date

Sylvain Chemtob

[Redacted Signature]

9/06/04

Coauteur

Date

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant : Martin Beauchamp

Sigle et titre du programme : Ph.D. en Pharmacologie

2. Description de l'article: Description du rôle du thromboxane A₂ dans un modèle animal de rétinopathie du prématuré. Paru dans *J Appl Physiol.* 2001 90(6):2279-2288. sous le titre **Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy.**

Auteurs : Martin Beauchamp, AK Martinez-Bermudez, F Gobeil jr, AM Marrache, X Hou, G Speranza, D Abran, C Quiniou, P Lachapelle, J Roberts 2nd, G Almazan, DR Varma, S Chemtob.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant:

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Martin Beauchamp** inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre **Interactions entre le thromboxane A₂ (TXA₂), les facteurs d'activation plaquettaire (PAF) et le monoxyde d'azote (NO) lors de la vaso-oblitération rétinienne. Implications dans la rétinopathie du prématuré.**

Ana Katherine Martinez-B

Coauteur

May 20, 04

Date

Fernand Gobeil Jr

Coauteur

8 MAY 2004

Date

Anne Marilise Marrache

Coauteur

18/05/04

Date

Xin Hou

18/05/2004

Coauteur

Date

Giovanna Speranza

21-05-04

Coauteur

Date

Daniel Abran

20/5-19

Coauteur

Date

Christiane Quiniou

18 mai 2004

Coauteur

Date

Pierre Lachapelle

18 mai 2004

Coauteur

Date

Jackson Roberts II

5/20/04

Coauteur

Date

Guillermina Almazan

21 May 2004

Coauteur

Date

Daya R. Varma

May 20, 04

Coauteur

Date

Sylvain Chemtob

18-05-04

Coauteur

Date

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant : Martin Beauchamp

Sigle et titre du programme : Ph.D. en Pharmacologie

2. Description de l'article: Description du rôle du facteur d'activation plaquettaire dans un modèle animal de rétinopathie du prématuré. Paru dans *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Oct;43(10):3327-3337 sous le titre **Platelet-activating factor in retinal vasoobliteration: implications in retinopathy of prematurity.**

Auteurs : M Beauchamp, AM Marrache, X Hou, F Gobeil jr, SG Bernier, P Lachapelle, D Abran, C Quiniou, S Brault, KG Peri, J Roberts 2nd , G Almazan, D Varma, S Chemtob.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant:

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Martin Beauchamp** inclue cet article dans sa **thèse de doctorat** qui a pour titre **Interactions entre le thromboxane A₂ (TXA₂), les facteurs d'activation plaquettaire (PAF) et le monoxyde d'azote (NO) lors de la vaso-oblitération rétinienne. Implications dans la rétinopathie du prématuré.**

Anne Marilise Marrache

Coauteur

18/05/04

Xin Hou

Coauteur

12/04

Fernand Gobeil jr

Coauteur

10/2004

Sylvie G. Bernier		May 19, 2004
Coauteur		Date
Pierre Lachapelle		8 mai 2004
Coauteur		Date
Daniel Abran		2004.5.19
Coauteur		Date
Christiane Quiniou		18 mai 2004
Coauteur		Date
Sonia Brault		8 Mai /04
Coauteur		Date
Krishna G. Peri		9/may/2004,
Coauteur		Date
Jackson Roberts II		120/04
Coauteur		Date
Guillermina Almazan		21 May 2004
Coauteur		Date
Dava R. Varma		May 20, 04
Coauteur		Date
Sylvain Chemtob		18-05-04
Coauteur		Date

**Order Confirmation
Academic Permissions Service
Copyright Clearance Center**

Account Name: MARTIN BEAUCHAMP
Order Number: 1178850
Start of Term: 09/01/2004

Account Number: 2000177788
Order Date: 6/9/2004

Document Reference: MHB AUTORIZATION
University: UNIVERSITE DE MONTREAL
Course Name: PH.D. THESIS
Instructor: DR RENE CARDINAL

Course Number:
Number of Copies: 4

Order Detail Number: 12592783

Requested Title: INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE

Chapter/Article: PLATELET-ACTIVATING FACTOR IN VASOOBLITERATION OF OXYGEN-INDUCED
RETINOPATHY.

From: 3327

To: 3337

Total Pages: 11

Response Status: Yes

Total Fee: \$7.40

From: *TR* [Redacted]
 To: *F. 7/20/04* [Redacted]
 Date: 6/2/04 3:41PM
 Subject: Authorization

To: Penny Ripka
 Publications Office
 American Physiological Society
 9650 Rockville Pike
 Bethesda, MD 20814-3991
 [Redacted]

*Permission
 Granted!*

From: Martin Beauchamp
 Research Center of Hôpital Ste-Justine
 3175 ch Côte-Ste-Catherine
 Montréal (Québec)
 Canada H3T1C5
 Tel: +1 514-345-4931 ext. 3598
 [Redacted]

Dear Mrs Ripka,

I am a Ph.D. student at Université de Montréal in pharmacology. I am writing a thesis entitled: « Interactions entre les activateurs des facteurs plaquettaires (PAF), le thromboxane (TXA2) et le monoxyde d'azote (NO) lors de la vaso-oblitération rétinienne. Implications dans la rétinopathie du prématuré. » a free translation would be : « Interaction between platelet activating factors, thromboxane A2 and nitric oxide during vasoobliteration. Implications in retinopathy of prematurity».

I would like, if it is possible, to include previously published papers in my thesis. One of them was published by your journal in 2001: Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy Beauchamp MH, Martinez-Bermudez AK, Gobeil F Jr, Marrache AM, Hou X, Speranza G, Abran D, Quiniou C, Lachapelle P, Roberts J 2nd, Almazan G, Varma DR, Chemtob S J Appl Physiol. 2001 Jun;90(6):2279-2288.

With your authorization, one copy of the thesis will be microfilmed and archived at Université de Montréal's library while another copy will be archived at Library and Archives Canada in Ottawa. This demand is purely for academic reasons and has no commercial intention what so ever.

Best regards,

THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY
 9650 Rockville Pike - Bethesda, MD 20814-3991

Permission is granted for use of the material specified above provided the publication is credited as the source.

Martin Beauchamp

6-3-04
 Date Publi [Redacted]

**Order Confirmation
Academic Permissions Service
Copyright Clearance Center**

Account Name: MARTIN BEAUCHAMP

Order Number: 1178850

Start of Term: 09/01/2004

Account Number: 2000177788

Order Date: 6/9/2004

Document Reference: MHB AUTORIZATION

University: UNIVERSITE DE MONTREAL

Course Name: PH.D. THESIS

Instructor: DR RENE CARDINAL

Course Number:

Number of Copies: 4

Order Detail Number: 12592783

Requested Title: INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE

Chapter/Article: PLATELET-ACTIVATING FACTOR IN VASCOBLITERATION OF OXYGEN-INDUCED
RETINOPATHY.

From: 3327

To: 3337

Total Pages: 11

Response Status: Yes

Total Fee: \$7.40

CURRICULUM VITAE

ARTICLES REVUS PAR UN COMITÉ DE LECTURE

- 1) Dumont I., Hardy P, Peri KG, Hou X, **Beauchamp M**, Najarian T, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vessels of newborn pig by prostaglandin E₂. *J Pharm Exp Ther* 291:627-633, 1999.
- 2) Najarian T., Marrache AM, Dumont I, Hardy P, **Beauchamp MH**, Hou X, Peri K, Gobeil F Jr, Varma DR, Chemtob S. Prolonged hypercapnia-evoked cerebral hyperemia via K⁺ channel and PGE₂-dependent endothelial nitric oxide synthase induction. *Circulation Res* 87:1149-1156, 2000.
- 3) **Beauchamp MH.**, Martinez-Bermudez A-K, Gobeil F, Marrache AM, Hou X, Speranza G, Abran D, Quiniou C, Lachapelle P, Roberts JII, Almazan G, Varma DR, Chemtob S. Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. *J Appl Physiol* 90:2279-2288, 2001.
- 4) Hou X., Roberts LJ II, Taber DF, Morrow JD, Kanai K, Gobeil F jr, **Beauchamp MH**, Bernier SG, Lepage G, Varma DR, Chemtob S. 2,3-Dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-isoprostane: a bioactive prostanoid metabolite. *Am J Physiol* 281:R391-R400, 2001.
- 5) Wright H., Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vasquez A, **Beauchamp MH**, Peri K, Varma DR, Chemtob S: Prostanoid receptors: Ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol* 281 :R1343-R1360, 2001.
- 6) Gobeil F jr, Dumont I, Marrache AM, Vazquez A, Abran D, Hou X, **Beauchamp MH**, Quiniou C, Bernier S, Molotchnikoff S, Ribeiro-da-Silva A, Varma DR, Bkaily G, Chemtob S. Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP3 receptors. *Circulation Res* 90 :682-689, 2002.
- 7) Checchin D., Hou X, Abran D, Najarian T, **Beauchamp MH**, Bernier SG, Gobeil F jr, Varma DR, Chemtob S. Retinal hemodynamics during prolonged hypercapnia depend upon PGE₂-mediated eNOS induction. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 43 :1558-1566, 2002.
- 8) **Beauchamp MH.**, Marrache AM, Hou X, Gobeil F Jr, Bernier SG, Lachapelle P, Abran D, Quiniou C, Brault S, Peri KG, Roberts J 2nd, Almazan G, Varma DR, Chemtob S. Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 43 :3327-3337, 2002.
- 9) Lamireau D., Nuyt AM, Hou X, Bernier S, **Beauchamp M**, Gobeil F Jr, Lahaie I, Varma DR, Chemtob S. Altered vascular function in fetal programming of hypertension. *Stroke* 33:2992-2998, 2002.

- 10) Brault S., Martinez-Bermudez AK, Marrache AM, Gobeil F Jr, Hou X, **Beauchamp M**, Quiniou C, Almazan G, Lachance C, Roberts J II, Varma DR, Chemtob S. Selective neuromicrovascular endothelial cell death by 8-iso-PGF2a: possible role in ischemic brain injury. *Stroke* 34:776-782, 2003.
- 11) Gobeil F jr., Bernier SG, Vazquez-Tello A, Brault S, **Beauchamp MH**, Quiniou C, Marrache AM, Checchin D, Sennlaub F, Nader M, Bkaily G, Ribeiro-da-Silva A, Goetzl EJ, Chemtob S. Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1. *J Biol Chem* 278:38875-38883, 2003.
- 12) Sennlaub F., Valamanesh F, Vazquez-Tello A, Abu El-Asrar A M, Checchin D, Brault S, Gobeil F, **Beauchamp MH**, Mwaikambo B, Lefevre G, Courtois Y, Geboes K, Varma DR, Lachapelle P, Ong H, Behar-Cohen F and Chemtob S. Cyclooxygenase-2 in human and experimental ischemic proliferative retinopathy. *Circulation* 108:198-204, 2003.
- 13) Bouayad A., Fouron JC, Hou X, **Beauchamp M**, Quiniou C, Abran D, Peri K, Clyman RI, Varma DR, Chemtob S. Developmental regulation of prostaglandin E₂ synthase in porcine ductus arteriosus. *Am J Physiol* 286(5):R903-909, 2004.
- 14) **Beauchamp M.H.**, Sennlaub F, Speranza G, Gobeil F jr, Checchin D, Kermorvant-Duchemin E, Abran D, Hardy P, Lachapelle P, Varma DR, Chemtob S. Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy. *Free Radic Biol Med* 37(11):1885-1894, 2004.

ARTICLES SOLLICITÉS

- 1) Chemtob S., **Beauchamp MH**, Hardy P, Hou X, Checchin D, Abran D, Varma DR, Lachapelle P. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Progress in Neonatology* 21:161-198, 2001.
- 2) Hardy P., **Beauchamp M**, Sennlaub F, Gobeil F jr, Tremblay L, Mwaikambo B, Lachapelle P, Chemtob S. New insights into the retinal circulation: Inflammatory lipid mediators in ischemic retinopathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72(5):301-325, 2005.

ABRÉGÉS

- 1) **Beauchamp MH.**, Speranza G, Hou X, Lachapelle P, Roberts J 2nd, Varma DR and Chemtob S. Thromboxane induces endothelial death and is involved in vascular degeneration. *FASEB J* 14(4) A410, 2000.
- 2) **Beauchamp MH.**, Speranza G, Hou X, Najarian T, Varma DR, Chemtob S. Thromboxane induces endothelial death and is involved in neurovascular degeneration. *Pediatr Res* 47:389A, 2000.

- 3) Najarian T., Dumont I, **Beauchamp MH**, Hou X, Hardy P, Varma DR, Chemtob S. Hypercapnia-induced, potassium channel-dependent modulation of eNOS expression in brain: Impact on cerebral circulation. *Pediatr Res* 47:60A, 2000.
- 4) **Beauchamp MH.**, Marrache AM, Hou X, Gobeil F Jr, Quiniou C, Abran D, Varma DR, Chemtob S. Role of platelet activating factor in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. *Pediatr Res* 49:389A, 2001.
- 5) Checchin D, Bernier SG, Dumont I, **Beauchamp MH**, Hou X, Abran D, Najarian T, Hardy P, Peri K, Varma DR, Chemtob S. Prolonged hypercapnia-evoked retinal hyperemia and oxygenation via PGE2-dependent eNOS induction: implications for retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 49:389A, 2001.
- 6) **Beauchamp MH.**, Marrache AM, Hou X et Chemtob S. Rôle du facteur d'activation plaquettaire (PAF) dans la dégénérescence microvasculaire lors de la rétinopathie induite par l'oxygène (OIR). *Médecine-Science* 17 (suppl. 2) : 14, 2001.
- 7) Brault S., Martinez-Bermudez AK, **Beauchamp M**, Almazan G, Lachance C, Chemtob S. Effects of 8-iso-PGF_{2α} on neuromicrovascular endothelial cell death: implications in periventricular leukomalacia. *Pediatr. Res.* 51:457A, 2002.
- 8) Speranza G., Doke A, **Beauchamp M**, Lachapelle, Chemtob S. Inner retinal function preservation by nitric oxide (NO) in O₂-induced retinopathy, conferred via endothelial cytoprotection: implications in retinopathy of prematurity. *Pediatr. Res.* 51:366A, 2002.
- 9) Bourdeau A., **Beauchamp MH**, Chemtob S, Sirois M. Inhibition of VEGF effects on retinal microvessels by antisense Flt-1 and Flk-1 oligonucleotides gene therapy in a mouse retinopathy model. *FASEB J.* 16:A516, 2002.
- 10) Checchin D., Hou X, Abran D, Najarian T, **Beauchamp MH**, Bernier S, Gobeil F Jr, Chemtob S. Retinal hemodynamics during prolonged hypercapnia depend upon PGE2-mediated eNOS induction. *FASEB J.* 16:A125, 2002.
- 11) Gobeil F Jr., Dumon I, Marrache AM, Vazquez-Tello A, Bernier SG, **Beauchamp MH**, Chemtob S. Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP-3 receptors. *FASEB J.* 16:A952, 2002.
- 12) Sennlaub F., Checchin D, Vazquez-Tello A, **Beauchamp M**, Chemtob S. COX-2 promotes intravitreal neovascularization via PGE2/EP3 receptors: Implications in retinopathy of prematurity (ROP). *Pediatr Res* 53:355A, 2003.
- 13) Checchin D., Sennlaub F, **Beauchamp MH**, Ribeiro-da-Silva A, Chemtob S. Hypercapnia inhibits intra-retinal angiogenesis via a NO-dependent pathway: Implications in retinopathy of prematurity (ROP). *Pediatr Res* 53:553A, 2003.

- 14) **Beauchamp MH.**, Sennlaub F, Speranza G, Gobeil F jr, Checchin D, Lachapelle P, Varma DR, and Chemtob S. Dual Role for NO on the Developing Retinal Vasculature Exposed to Hyperoxia: Implications in Retinopathy of Prematurity *Pediatr Res*, Abstracts-on-Line http://www.abstracts2view.com/pas/view.php?nu=PAS4L1_372.

PRÉSENTATIONS

- 1) **Beauchamp M.**, Speranza G, Hou X, Najarian T, Varma DR, Chemtob S. Thromboxane induces endothelial death and is involved in neurovascular degeneration. Society for Pediatric, FASEB, San Diego, April 2000.
- 2) Najarian T., Dumont I, **Beauchamp M**, Hou X, Hardy P, Varma DR, Chemtob S. Hypercapnia-induced, potassium channel-dependent modulation of eNOS expression in brain: Impact on cerebral circulation. Society for Pediatric Research, Boston, May 2000.
- 3) **Beauchamp MH.**, Marrache AM, Hou X, Gobeil F Jr, Quiniou C, Abran D, Varma DR, Chemtob S. Role of platelet activating factor in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. Society for Pediatric Research, Baltimore, May 2001.
- 4) Checchin D., Bernier SG, Dumont I, **Beauchamp MH**, Hou X, Abran D, Najarian T, Hardy P, Peri K, Varma DR, Chemtob S. Prolonged hypercapnia-evoked retinal hyperemia and oxygenation via PGE₂-dependent eNOS induction: implications for retinopathy of prematurity. Society for Pediatric Research, Baltimore, May 2001.
- 5) Brault S., Martinez-Bermudez AK, **Beauchamp M**, Almazan G, Lachance C, Chemtob S. Effects of 8-iso-PGF_{2α} on neuromicrovascular endothelial cell death: implications in periventricular leukomalacia. Society for Pediatric Research, Baltimore, May 2002.
- 6) Speranza G., Doke A, **Beauchamp M**, Lachapelle, Chemtob S. Inner retinal function preservation by nitric oxide (NO) in O₂-induced retinopathy, conferred via endothelial cytoprotection: implications in retinopathy of prematurity. Society for Pediatric Research, Baltimore, May 2002.
- 7) Bourdeau A., **Beauchamp MH**, Chemtob S, Sirois M. Inhibition of VEGF effects on retinal microvessels by antisense Flt-1 and Flk-1 oligonucleotides gene therapy in a mouse retinopathy model. FASEB, New Orleans, April, 2002.
- 8) Checchin D., Hou X, Abran D, Najarian T, **Beauchamp MH**, Bernier S, Gobeil F Jr, Chemtob S. Retinal hemodynamics during prolonged hypercapnia depend upon PGE₂-mediated eNOS induction. FASEB, New Orleans, April, 2002.

- 9) Gobeil F Jr., Dumon I, Marrache AM, Vazquez-Tello A, Bernier SG, **Beauchamp MH**, Chemtob S. Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP-3 receptors. FASEB, New Orleans, April, 2002.
- 10) Sennlaub F., Checchin D, Vazquez-Tello A, **Beauchamp M**, Chemtob S. COX-2 promotes intravitreal neovascularization via PGE₂/EP₃ receptors: Implications in retinopathy of prematurity (ROP). Society for Pediatric Research, Seattle, May 2003.
- 11) Checchin D., Sennlaub F, **Beauchamp MH**, Ribeiro-da-Silva A, Chemtob S. Hypercapnia inhibits intra-retinal angiogenesis via a NO-dependent pathway: Implications in retinopathy of prematurity (ROP). Society for Pediatric Research, Seattle, May 2003.
- 12) **Beauchamp MH.**, Sennlaub F, Speranza G, Gobeil F jr, Checchin D, Lachapelle P, Varma DR, and Chemtob S. Dual Role for NO on the Developing Retinal Vasculature Exposed to Hyperoxia: Implications in Retinopathy of Prematurity Society for Pediatric Research, San Francisco, May 2004.

BOURSES ET DISTINCTIONS

- 1) Prix Réseau Vision – Chercheur en formation, Réseau de recherche en santé de la vision (2005).
- 2) Bourse d'études des Instituts de recherche en santé du Canada (2002-2005).
- 3) Bourse d'études de la Fondation canadienne des maladies du cœur (2002, déclinée).
- 4) Bourse d'études de la Fondation de l'Hôpital Ste-Justine (1999-2001).
- 5) Bourse de formation, Réseau de recherche en santé de la vision (2001).
- 6) Bourse d'études La Fondation de la recherche sur le monoxyde d'azote (2000).
- 7) Prix d'excellence, Journée de la recherche du Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine (2000).
- 8) Trainee Travel Award, American Federation For Medical Research (2000).
- 9) Mention d'excellence de l'Université de Montréal (1998).