



**HAL**  
open science

# Rôle clé de la COX-2 dans l'inhibition de la prolifération des cellules étoilées du foie myofibroblastiques humaines

Cyrille Gallois

## ► To cite this version:

Cyrille Gallois. Rôle clé de la COX-2 dans l'inhibition de la prolifération des cellules étoilées du foie myofibroblastiques humaines. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Pierre et Marie Curie, 2001. Français. NNT : . tel-02963985

**HAL Id: tel-02963985**

**<https://hal.science/tel-02963985>**

Submitted on 12 Oct 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

**THESE**

Présenté pour obtenir

**LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES  
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE  
Spécialité : Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire**

**Par**

**Cyrille GALLOIS**

**SUJET :Rôle clé de la COX-2 dans l'inhibition de la prolifération des cellules étoilées  
du foie myofibroblastiques humaines**

**Soutenu le 02 mars 2001 devant la commission d'examen :**

**Mr le Docteur VIGNY**

**Président**

**Mr le Docteur ROSENBAUM**

**Examineur**

**Mme le Docteur CAZAUBON**

**Rapporteur**

**Mr le Docteur SALLES**

**Rapporteur**

**Mme le Docteur LOTERSZTAJN**

**Examineur**

## **AVERTISSEMENT**

La qualité de numérisation de ce fichier dépendant de l'état général de la microfiche, l'A.N.R.T. ne peut garantir un résultat irréprochable.

Le présent ouvrage est uniquement consultable en bibliothèque.

*Ce travail a été réalisé à l'unité INSERM 99  
Dirigée par le Docteur Jacques HANOUNE,  
Sous la direction du docteur Sophie LOTERSZTAJN  
(Hôpital Henri Mondor, Créteil)*



## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>6</b>
<b>I. Le foie</b>	<b>7</b>
1. Anatomie du foie	7
2. Les cellules résidentes du foie	8
<b>II. Les cellules étoilées du foie</b>	<b>10</b>
1. Morphologie	10
2. Caractérisation des CEF quiescentes et myofibroblastiques	10
3. Fonctions des CEF dans le foie normal	13
4. Rôle des CEF au cours des maladies aiguës et chroniques du foie	14
<b>III. Les endothélines</b>	<b>25</b>
1. Les différentes endothélines et de leurs gènes	25
2. Synthèse et maturation des endothélines	27
3. Les récepteurs des endothélines	30
4. Les fonctions des endothélines	34
5. Transduction du signal des endothélines	40
<b>IV. Les cyclooxygénases</b>	<b>45</b>
1. Les différentes cyclooxygénases et leurs pharmacologies	45
2. Les fonctions des COX	49
<b>EXPOSE DES TRAVAUX</b>	<b>53</b>
<b>ARTICLE 1</b>	<b>55</b>
<b>V. Le facteur de transcription NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>56</b>
1. Caractérisation de NF- $\kappa$ B et de son inhibiteur I $\kappa$ B	56
2. Mécanisme d'activation	56
3. Les gènes cibles de NF- $\kappa$ B	58
4. NF- $\kappa$ B et foie	59
5. Implication de NF- $\kappa$ B dans la prolifération et l'apoptose	59

<b>DISCUSSION</b>	<b>68</b>
<b>ARTICLE 2</b>	<b>73</b>
<b>VI. La voie des sphingolipides</b>	<b>74</b>
1. Synthèse des sphingolipides	74
2. Sphingolipide : second messenger	75
3. La sphingosine-1-phosphate	76
<b>DISCUSSION</b>	<b>84</b>
<b>ARTICLE 3</b>	<b>91</b>
<b>VII. Introduction</b>	<b>92</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>107</b>

## Résumé

La fibrose hépatique est due à l'accumulation exagérée de matrice extracellulaire et est la principale complication des maladies chroniques du foie, notamment virales et alcooliques. Il est maintenant bien établi que les cellules étoilées du foie jouent un rôle majeur dans ce processus. En effet, en cas d'atteinte hépatique, ces cellules acquièrent un phénotype myofibroblastique, synthétisent les composés fibrogéniques et prolifèrent.

Etant donné l'intérêt thérapeutique de limiter l'accumulation des cellules étoilées du foie myofibroblastiques, au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux facteurs et aux mécanismes contrôlant la prolifération de ces cellules. Nous avons mis en évidence le rôle central de la cyclooxygénase-2, l'enzyme clef de la synthèse de prostaglandines, dans les effets antiprolifératifs de l'endothéline-1 (ET-1) et du facteur nécrosant de tumeur (TNF). Nous avons également caractérisé les mécanismes impliqués dans l'induction de la cyclooxygénase-2 et démontré l'importance du facteur de transcription NF-kappa-B. Par ailleurs, nous avons mis en évidence qu'un sphingolipide, la sphingosine-1-phosphate, est un second messenger antiprolifératif de l'ET-1, et que sa production conduit à l'induction de la cyclooxygénase-2. Enfin, nous avons démontré que l'effet mitogénique du « Platelet derived-growth factor -BB » (PDGF-BB) et de la thrombine est la résultante d'une voie positive et d'une voie négative de régulation de la prolifération des cellules étoilées du foie myofibroblastiques. La composante négative implique la voie de la cyclooxygénase-2.

L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle central de la cyclooxygénase-2 dans l'inhibition de la prolifération des cellules étoilées du foie myofibroblastiques. Son induction pourrait jouer un rôle déterminant dans la régulation négative de la fibrose hépatique.

## **Abstract**

Liver fibrosis is characterized by increased deposition and altered composition of extracellular matrix during chronic injury. Hepatic stellate cells play a pivotal role in the development of liver fibrosis associated with chronic liver diseases. During this process, hepatic stellate cells acquire an activated myofibroblast-like phenotype, proliferate and synthesize fibrosis components. Since accumulation of myofibroblastic hepatic stellate cells contribute to the increased deposition of extracellular matrix during chronic liver diseases, in this study, we have investigated the mechanisms that regulate proliferation of these cells.

We show that cyclooxygenase-2, the rate-limiting enzyme in the production of prostaglandins play a central role in the antiproliferative effect of endothelin-1 (ET-1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF). The mechanism of cyclooxygenase-2 induction involves activation of the transcription factor nuclear factor kappa B (NF-kappa-B). Furthermore, we demonstrate that the sphingolipid sphingosine-1-phosphate is an intracellular growth inhibitory mediator of endothelin-1, which induces cyclooxygenase-2. Finally, we show that, the mitogenic effect of platelet derived-growth factor-BB (PDGF-BB) and thrombin arises from the combined effect of positive and negative signals, the latter being mediated by activation of cyclooxygenase-2.

Taken together, these results suggest that cyclooxygenase-2 is central for growth inhibition of myofibroblastic hepatic stellate cells and may play a pivotal role in the negative regulation of liver fibrosis.

## Abbreviations

AINS	Anti inflammatoire non stéroïdien
AA	Acide arachidonique
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
CEF	Cellules étoilées du foie
CEFm	Cellules étoilées du foie myofibroblastiques
COX	Cyclooxygénase
DLT	DL-Thréo-dihydrosphingosine
DMS	D-erythro diméthylsphingosine
ECE	Endothelin converting enzyme
ET-1	Endothéline-1
ET-2	Endothéline-2
ET-3	Endothéline-3
FGF	Fibroblast growth factor
GFAP	Gliary fibrillary acidic protein
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IGF	Insulin-like-growth-factor
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MMP	Matrix metalloprotease
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
PAF	Platelet-activating-factor
PDGF	Platelet derived-growth factor
PG	Prostaglandine
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
S1P	Sphingosine-1-phosphate
TGF	Transforming growth factor
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha

## **INTRODUCTION GENERALE**

La fibrose hépatique est la complication majeure des maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine alcoolique, virale ou biliaire. En se déposant dans l'espace perisinusoïdal, elle constitue une néo-membrane basale qui modifie le phénotype des cellules environnantes, avec notamment une perte de la fenestration des cellules endothéliales sinusoïdales et une disparition des microvillosités hépatocytaires (Friedman, 1993). L'accumulation matricielle et les modifications cellulaires qui en résultent réduisent la perméabilité du sinusoïde et par voie de conséquence les échanges de substances solubles entre le compartiment sanguin et les hépatocytes, concourant au développement d'une insuffisance hépatique. Elle participe également au développement de l'hypertension portale en augmentant la résistance intrahépatique du fait des modifications anatomiques locales. La cirrhose représente son expression ultime, avec son cortège de complications sévères, et un risque élevé de carcinome hépatocellulaire.

La compréhension des mécanismes contrôlant la fibrogénèse hépatique a connu un essor considérable depuis la fin des années 80, avec la démonstration du rôle central des cellules étoilées du foie (CEF).

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux facteurs et aux mécanismes contrôlant la prolifération de ces cellules, dont l'accumulation excessive est un événement clef dans le développement de la fibrose hépatique.

## **I. Le foie**

### **1. Anatomie du foie**

L'acinus est l'unité de structure du foie (Figure 1A). Il est formé d'un espace triangulaire dont le sommet est l'espace porte et la base une ligne virtuelle réunissant 2 veines centrolobulaires. L'espace porte contient une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et un ou deux canaux biliaires. Les hépatocytes sont disposées en lame d'une seule cellule d'épaisseur. Ces lames délimitent des sinusoïdes à l'intérieur desquels se fait la circulation sanguine. L'ensemble des sinusoïdes converge vers les veines centrolobulaires qui elles-mêmes se réunissent pour former la veine sus-hépatique. Les sinusoïdes sont bordés par des cellules endothéliales. L'espace compris entre les hépatocytes et les cellules endothéliales est nommé espace de Disse (Figure 1B).

## **2. Les cellules résidentes du foie**

Le foie adulte normal est composé d'au moins 6 populations cellulaires résidentes distinctes : les hépatocytes, les cellules épithéliales biliaires, les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer, les pits cells et les cellules étoilées du foie (CEF).

### ***A. Les hépatocytes***

Les hépatocytes représentent environ 70 % des cellules du foie et ainsi forment la population hépatique la plus importante. Ils sont à l'origine des principaux métabolismes intrahépatiques comme la synthèse des protéines plasmatiques, la sécrétion de bile, de glucose ou le métabolisme de nombreux composés endogènes ou exogènes.

### ***B. Les cellules épithéliales biliaires***

Les cellules épithéliales biliaires bordent les canaux biliaires intrahépatiques. Certaines d'entre elles forment avec les hépatocytes, le canal de Hering qui transporte la bile depuis les canalicules biliaires vers les canaux biliaires interlobulaires situés dans l'espace porte. Elles sont donc en contact étroit avec les hépatocytes.

### ***C. Les cellules endothéliales***

Les cellules endothéliales hépatiques, qui bordent le sinusoiide, sont particulières par leur cytoplasme fenêtré et l'absence de membrane basale. Ces caractéristiques permettent un échange facile entre le sang et les hépatocytes sous jacents.

### ***D. Les cellules de Kupffer***

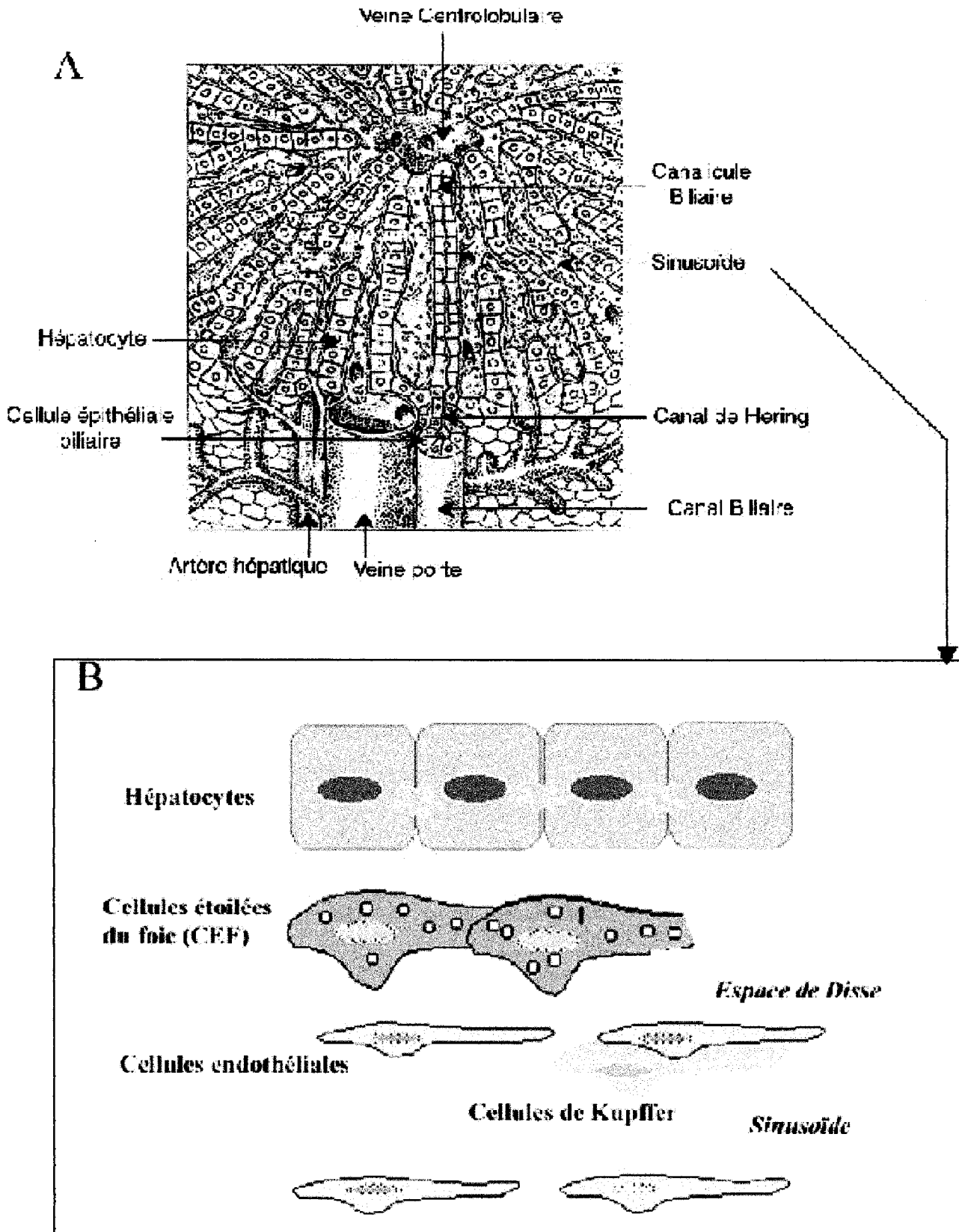
Ce sont les macrophages résidant dans le foie. Ils sont habituellement localisés dans la lumière du sinusoiide au contact des cellules endothéliales, mais peuvent posséder des prolongements qui atteignent les hépatocytes.

### ***E. Les Pits cells***

Ce sont les lymphocytes résidents du foie. Ils possèdent des activités de type "Natural Killer". Ils sont visibles dans la lumière du sinusoiide mais peuvent avoir des prolongements pénétrant dans la barrière endothéliale.

Les cellules étoilées du foie, auxquelles nous nous sommes intéressés au cours de ce travail et que nous allons décrire plus en détail dans le paragraphe suivant.





**Figure 1 : Anatomie du foie**

(A : Représentation d'un acinus B : Représentation des différents types cellulaires dans le sinusoid)

## **II. Les cellules étoilées du foie**

### **1. Morphologie**

Les cellules étoilées du foie (CEF) sont également connues sous le nom de cellules de Ito, lipocytes hépatiques ou encore cellules périsinusoïdales (Pour revue : Blanc, Bioulac-Sage & Rosenbaum, 1997; Hautekeete & Geerts, 1997). Il y a environ 5 CEF pour 100 hépatocytes dans le foie humain. Les CEF ont une répartition relativement homogène dans le lobule et sont localisées dans l'espace de Disse (Figure 1). Ces cellules possèdent un cytoplasme de grande taille qui est en contact avec les cellules endothéliales d'une part, et de nombreux hépatocytes d'autre part. Elles peuvent également interagir avec d'autres cellules étoilées ou des terminaisons nerveuses. Leur corps cellulaire contient de nombreuses gouttelettes de vitamine A compressant le noyau, un réticulum endoplasmique rugueux en quantité modérée, une faible quantité de mitochondries et enfin une arborisation caractéristique.

Au cours des maladies aiguës ou chroniques du foie, les CEF subissent un processus d'activation et acquièrent un phénotype myofibroblastique ("activé" par opposition au phénotype normal dit « quiescent »). Elles perdent alors leur contenu lipidique et présentent des caractéristiques de myofibroblastes, notamment en exprimant l'isoforme de type musculaire lisse de l'alpha actine (Figure 2). Les CEF myofibroblastiques (CEFm) possèdent un appareil de Golgi conséquent, un réticulum endoplasmique rugueux abondant, une grande quantité d'éléments du cytosquelette et elles sont très souvent entourées de fibres de collagène interstitiel. *In vitro*, l'activation des CEF est observée lorsque les cellules fraîchement isolées adhèrent sur plastique.

### **2. Caractérisation des CEF quiescentes et myofibroblastiques**

Plusieurs techniques complémentaires aident à l'identification des CEF en microscopie. Elles reposent sur la mise en évidence de la vitamine A contenue dans les CEF quiescentes, ou sur la présence de marqueurs spécifiques des CEF quiescentes et myofibroblastiques.

#### ***A. Mise en évidence de la vitamine A***

Sur coupe en congélation, la vitamine A fluoresce spontanément à 328 nm rendant ainsi sa détection aisée. Cependant, cette technique n'étant pas assez sensible chez l'homme,

la détection des protéines de transport de la vitamine A a été également utilisée. Enfin, en microscopie électronique, la vitamine A intracytoplasmique peut également être révélée par coloration à l'or (Hautekeete & Geerts, 1997). Ces méthodes ne permettent pas d'identifier les CEF myofibroblastiques, qui ont perdu leur contenu en vitamine A.

### ***B. Immunohistochimie***

Plusieurs marqueurs des CEF quiescentes et/ou myofibroblastiques ont été décrits. Cependant, leurs spécificités restent sujet à controverse car il existe d'une part des différences interspèces et d'autre part, une hétérogénéité des cellules à potentiel fibrogénique (Tableau I).

Initialement, la caractérisation des CEFm était basée sur la présence d'alpha actine de type muscle lisse, de desmine et de vimentine. Chez le rat comme chez l'homme, les CEF myofibroblastiques sont caractérisées par la présence d'alpha-actine de muscle lisse (Iredale *et al.*, 1998; Casini *et al.*, 1993). La desmine est une molécule du cytosquelette, localisée dans les filaments intermédiaires des cellules musculaires. Cependant, chez le rat, 50% des CEF de la région centrolobulaire n'expriment pas ce marqueur (Ballardini *et al.*, 1994; Ramm *et al.*, 1995). De plus, la desmine est présente dans les CEF quiescentes et myofibroblastiques de rat mais n'est pas exprimée par les CEF humaines (Schmitt-Graff *et al.*, 1991). Enfin, la plupart des CEF de rat et humaines quiescentes et myofibroblastiques expriment également la vimentine, une protéine des filaments intermédiaires des cellules musculaires. (Casini *et al.*, 1993; Fujimoto & Singer, 1986; Geerts *et al.*, 2001; Geerts *et al.*, 1998; Wu, Tao & Cramer, 1996a).

De nouveaux marqueurs des CEF ont récemment été identifiés : la « glial fibrillary acidic protein » (GFAP), la « neural cell adhesion molecule » (N-CAM), l'épimorphine et plus récemment la nestine. La GFAP est un composant majeur des filaments intermédiaires initialement découvert dans les astrocytes du système nerveux central. En immunohistochimie, sur coupe de foie de rat sain, la population de cellules exprimant le GFAP est située principalement dans la région centrolobulaire et est pratiquement inexistante dans l'espace périportal. Les études de colocalisation montrent des cellules exprimant la desmine mais pas la GFAP (Niki *et al.*, 1996). Chez l'homme, l'expression de GFAP par les CEF diffère de celle observée chez le rat. Sur les coupes de foie sain, les cellules positives pour la GFAP sont observées dans la région périportale alors que les cellules contenant de la vitamine A sont réparties dans tout le lobule (Neubauer *et al.*, 1996). *In vitro*, chez le rat, la

GFAP est exprimée dans les CEF quiescentes et dans les étapes précoces de l'activation, puis son expression diminue progressivement au cours du processus d'activation (Buniatian, Hamprecht & Gebhardt, 1996; Geerts *et al.*, 1998). La signification fonctionnelle de l'expression de GFAP dans les CEF reste inconnue. Dans les astrocytes, elle pourrait être responsable de l'acquisition et du maintien de la forme étoilée des astrocytes. Il est possible qu'elle joue un rôle similaire dans les CEF.

La protéine N-CAM est une protéine très exprimée dans le système nerveux central, en particulier dans les cellules gliales. Elle est exprimée faiblement dans les CEF de rat fraîchement isolées (Knittel *et al.*, 1996a; Nakatani *et al.*, 1996). Ce marquage n'est observé dans aucune autre cellule hépatique. Au cours de l'activation des CEF, l'expression de N-CAM est augmentée parallèlement à l'augmentation d'alpha-actine de muscle lisse (Knittel *et al.*, 1996a). Chez l'homme, la N-CAM est exprimée également et de façon prédominante dans l'espace périportal (Nakatani *et al.*, 1996).

L'epimorphine est une protéine de 150kDa exprimée à la surface des cellules mésenchymateuses et joue un rôle dans les interactions mésenchyme-épithélium au cours du développement (Hirai *et al.*, 1992). Elle est exprimée par les CEF de rat quiescentes et colocalise avec la desmine en immunohistochimie (Hirose *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1998).

La nestine est une protéine du filament intermédiaire préférentiellement exprimée par les cellules d'origine neuroectodermique. Elle est absente dans les CEF fraîchement isolées et son expression augmente au cours de leur activation. Son expression est faible dans le foie normal et augmente tardivement (au bout de 6 semaines) au cours de la fibrose provoquée par le CCl<sub>4</sub> chez le rat (Niki *et al.*, 1999).

La synaptophysine, une autre protéine neurale impliquée dans le contrôle de l'exocytose et de la transmission des neurotransmetteurs, est exprimée dans les CEF quiescentes et activées chez l'homme et le rat (Cassiman *et al.*, 1999).

Enfin, deux études récentes indiquent que chez le rat, au moins deux populations de cellules myofibroblastiques contribuent à la fibrose hépatique, les CEF activées et les myofibroblastes de la capsule. Ces populations se distinguent par l'expression de marqueurs sélectifs, en particulier l'expression de la protéase P100 pour les CEF myofibroblastiques, et de la fibuline-2 et de l'interleukine 6 (IL-6) pour les myofibroblastes hépatiques. Les deux populations expriment l'alpha-actine de muscle lisse (Knittel *et al.*, 1997; Knittel *et al.*, 1999a).

En conclusion, la population de cellules contribuant à la fibrogénèse hépatique est hétérogène. De plus, l'expression par les CEF de protéines neuronales a conduit plusieurs auteurs à poser la question de l'origine embryonnaire de ces cellules.

Marqueurs	Rat		Homme		Myofibroblastes de rat
	CEF Quiescentes	CEFm	CEF Quiescentes	CEFm	
$\alpha$ -Actine de muscle lisse	-	++	-	++	++
Desmine	+	++ ou - (hétérogène)	-	-	-
Vimentine	+	+	+	+	+++
N-CAM	+	+++	+	+++	-
GFAP	++	-/+	+	+ ou -/+	-
Epinorphine	+	?	?	?	?
Nestine	-	++	?	?	?
Synaptophysine	+	+	+	+	-
Fibuline-2	-	-	?	?	+++
Protéase P100	+++	+++	?	?	-
IL6	-	-	?	?	+++

**Tableau I : Caractérisation des CEFs**

### 3. Fonctions des CEF dans le foie normal

Dans le foie normal, les CEF prolifèrent peu. Leur fonction principale est l'absorption, le stockage et la sécrétion de la vitamine A. Les CEF sont également impliquées dans le maintien du dépôt matriciel, elles sécrètent les composants et modulent la dégradation de la matrice. Leur rôle dans la régulation du flux sanguin dans le sinusoiide est encore controversé (Mallat, 1998).

#### A. Rôle dans l'homéostasie de la vitamine A

Les CEF sont le site majeur de stockage de la vitamine A dans l'organisme. La vitamine A absorbée par les enterocytes est transportée dans le foie sous forme d'ester de rétinol qui est capté par les hépatocytes puis sécrété dans l'espace de Disse après liaison à la « retinol binding protein » (RBP) (Ghyselinck *et al.*, 1999). Le complexe rétinol-RBP est internalisé dans les CEF puis le rétinol est stocké sous forme d'esters (Matsuura *et al.*, 1999; Senoo *et al.*, 1990). Les mécanismes de régulation de la mobilisation du rétinol à partir des CEF sont mal connus. Certaines études suggèrent que le rétinol est libéré par les CEF et capté

par les hépatocytes où il est conjugué à la RBP avant d'être remis en circulation (Vicente *et al.*, 1998; Zou, Ekataksin & Wake, 1998).

### B. Rôle dans le dépôt de matrice extracellulaire

Les CEF jouent un rôle central dans le dépôt matriciel, d'une part en sécrétant les composants de la matrice extracellulaire et d'autre part, en modulant sa dégradation. Les CEF quiescentes synthétisent les constituants normaux de la matrice extracellulaire périsinusoidale, comme le montrent les études réalisées *in vitro*, sur des CEF en culture précoce et *in vivo* par hybridation *in situ* et immunohistochimie. Les CEF quiescentes synthétisent ainsi en faible quantité le collagène IV, la laminine, la tenascine, et les protéoglycanes (Arenson, Friedman & Bissell, 1988; Clement *et al.*, 1985; Friedman *et al.*, 1985; Loreal *et al.*, 1991; Maher *et al.*, 1988; Milani *et al.*, 1989; Van Eyken *et al.*, 1992). Les CEF quiescentes sont également capables de dégrader la matrice extracellulaire maintenant le dépôt matriciel. En effet, dans le foie sain, les CEF expriment la « matrix metalloprotéase » de type 1 (MMP-1) responsable de la dégradation des collagènes interticiels, principaux collagènes exprimés au cours des maladies du foie. Cette expression disparaît dans le foie fibreux (Knittel *et al.*, 1999b).

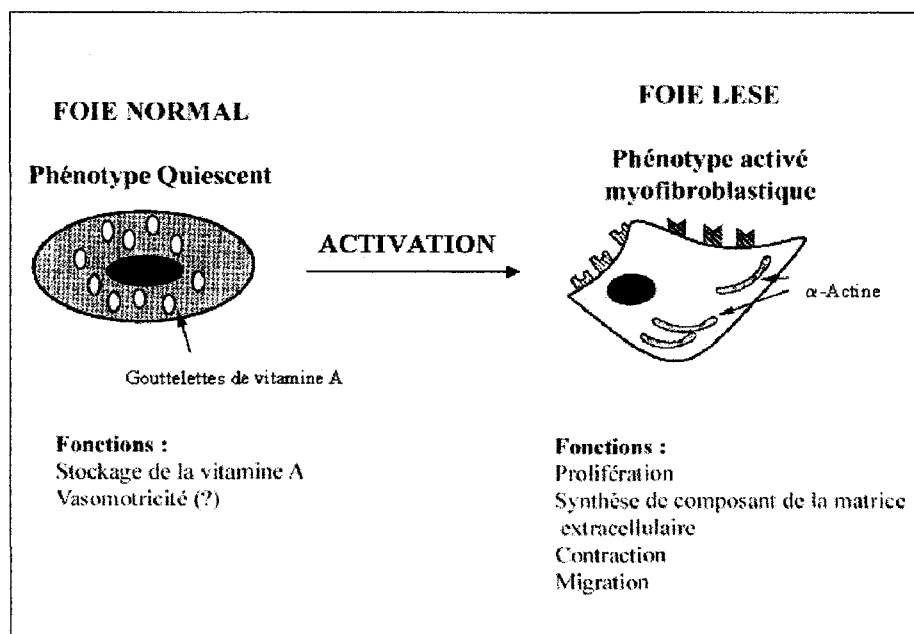


Figure 2 : Processus d'activation des CEF

#### 4. Rôle des CEF au cours des maladies aiguës et chroniques du foie

La fibrose hépatique est définie comme l'accumulation exagérée de matrice extracellulaire au sein du parenchyme hépatique. Elle résulte d'un déséquilibre entre une

synthèse accrue de composants de la matrice extracellulaire et la diminution de leur dégradation. La fibrose conduit à une dédifférenciation des hépatocytes (Bissell *et al.*, 1987) et une réduction de la porosité des cellules endothéliales (McGuire *et al.*, 1992). Ces différents changements ont été nommés capillarisation. Ils conduisent donc à une perte des fonctions hépatocytaires et une réduction des transports du sinusoiide vers l'espace de Disse. Au cours des maladies aiguës ou chroniques du foie, les CEF subissent un processus « d'activation » dans lequel elles acquièrent un phénotype myofibroblastique et sécrètent les composants fibrogéniques. Ce processus est l'étape initiale fondamentale de la fibrogénèse. Il est constitué de deux séquences d'évènements, l'initiation et la perpétuation. L'initiation correspond au changement précoce de phénotype des CEF au cours duquel elles deviennent sensibles aux facteurs de croissance. La perpétuation est l'étape où ces facteurs vont maintenir les CEF dans leur phénotype myofibroblastique (Figure 3).

### ***A. Mécanisme d'activation***

#### **a) L'initiation (Figure 3A)**

Ce sont des facteurs sécrétés par les hépatocytes endommagés, les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales et les plaquettes lors de l'atteinte hépatique qui vont initier le processus d'activation des CEF. Cette étape est caractérisée par une modification, par les CEF, d'une part de l'expression de gènes de réponse précoce et d'autre part de celles de gènes codant pour des cytokines, des facteurs de croissances et leurs récepteurs. Ainsi, l'activation de facteurs de transcription pourrait être l'une des étapes les plus précoces de l'activation des CEF, permettant secondairement l'induction de l'expression de récepteurs pour des cytokines majeures telles que le PDGF et le TGF beta-1. La recherche des ARNm induits précocement dans les CEF après injection de CCl<sub>4</sub> chez le rat a permis de détecter l'induction rapide d'un nouveau facteur de transcription appelé ZF9 (Lalazar *et al.*, 1997). Ce facteur transactive le promoteur du procollagène de type I. De nombreux autres facteurs de transcription sont augmentés dans la phase précoce d'activation tels que c-myb, NF-κB, SP1 ou AP-1 (Hellerbrand *et al.*, 1998b; Lee *et al.*, 1995; Rippe, Almounajed & Brenner, 1995; Svegliati-Baroni *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 1999). Leur activation s'accompagne de l'expression de leurs gènes cibles. Ainsi, l'augmentation de NF-κB au cours de l'initiation est associée à l'induction d'une protéine d'adhésion ICAM-1 (Hellerbrand *et al.*, 1998a; Hellerbrand *et al.*,

1998b). D'autre part, c-myc régule l'expression d'alpha actine du type muscle lisse (Lee *et al.*, 1995).

De plus, les CEF répondent de façon très précoce aux cytokines et aux facteurs de croissance, indiquant une expression rapide de leurs récepteurs. Ainsi, on observe une augmentation de l'ARNm des récepteurs de type II du TGF- $\beta$  une heure seulement après lésion hépatique (Lalazar *et al.*, 1997). Le récepteur  $\beta$  du PDGF est également induit au cours des premiers temps de l'activation des CEF (Pinzani *et al.*, 1994). Son expression est régulée par le TGF- $\beta$  (Pinzani *et al.*, 1995).

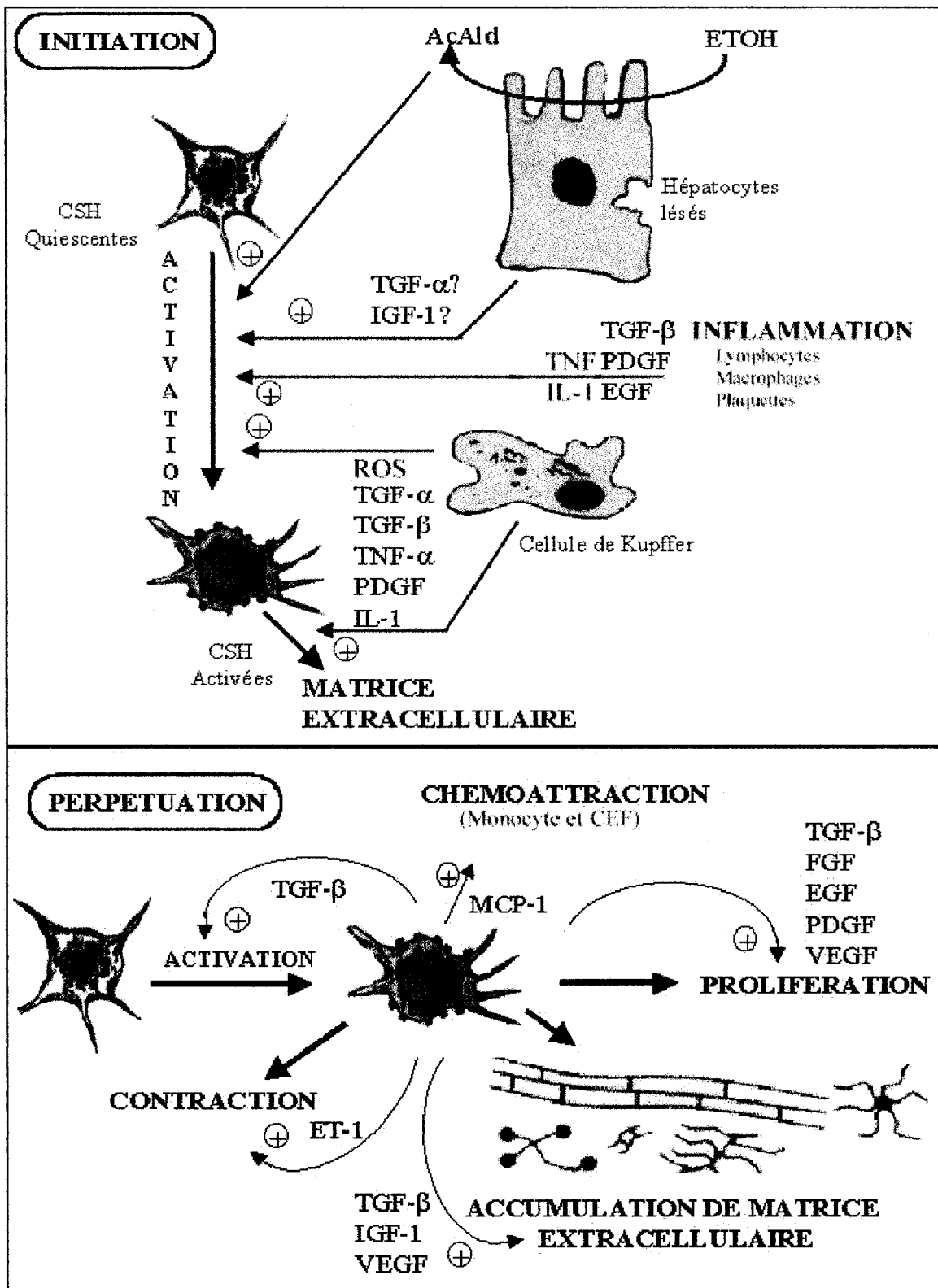
Enfin, le stress oxydatif joue également un rôle majeur dans l'étape d'initiation. En effet, lors de l'atteinte hépatique, les hépatocytes et les cellules de Kupffer produisent des espèces réactives de l'oxygène qui déclenchent le processus d'activation des CEF. La peroxydation lipidique membranaire des hépatocytes par des radicaux libres conduit à la formation d'aldéhydes et de radicaux libres intermédiaires. *In vitro*, les produits de peroxydation lipidique stimulent la prolifération des CEF et la production de collagène de type I par ces cellules (Lee *et al.*, 1995), et ces effets sont inhibés par les anti-oxydants tels que la vitamine E.

Par ailleurs, la métabolisation par les hépatocytes de substances exogènes telle que l'éthanol, génère de l'acétaldéhyde qui stimule la production de composants de la matrice extracellulaire par les CEF. Des études *in situ* et *in vitro* ont montré une corrélation entre la présence de ces métabolites et l'expression de collagène par les CEF (Paradis *et al.*, 1997; Parola *et al.*, 1993).

#### i) Facteurs sécrétés par les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales semblent également jouer un rôle dans l'activation des CEF. En effet, ces cellules sécrètent un variant de fibronectine (isoforme IIIA) qui favorise l'activation des CEF quiescentes (Jarnagin *et al.*, 1994). De plus, les cellules endothéliales convertissent la forme latente de TGF- $\beta$ 1, en forme active fibrogénique via l'activation de la plasmine (Rieder *et al.*, 1993).





**Figure 3 : Mécanisme d'activation des cellules étoilées du foie**

(AcAld : acétaldéhyde, CEF : Cellule étoilée du foie, EGF : Epidermal Growth Factor, ET-1 : Endothéline-1, ETOH : Ethanol, FGF : Fibroblast Growth Factor, HGF : Hepatocyte Growth Factor, IL-1 : Interleukine-1, IGF : Insulin like Growth Factor, MCP-1 : Monocyte Chemoattractant protein 1, PDGF : Platelet Derived Growth Factor, ROS : Reactive Oxygen Species, TGF : Tranforming Growth Factor, TNF : Tumor Necrosis Factor, VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor)

## ii) Facteurs sécrétés par les cellules de Kupffer

La sécrétion de cytokines par les hépatocytes stimule l'infiltration et l'activation des cellules de Kupffer menant vers la phase inflammatoire. De la même manière que les hépatocytes, le milieu conditionné de cellules de Kupffer accélère l'activation des CEF (Meyer, Bachem & Gressner, 1990). Les facteurs produits par les cellules de Kupffer, en particulier le TGF- $\beta$ 1, agissent à la fois sur l'augmentation de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire, sur la prolifération et sur la perte de vitamine A (Meyer *et al.*, 1990; Win *et al.*, 1993). Les cellules de Kupffer sécrètent également de nombreux autres cytokines profibrotiques et promototiques telles que le PDGF, le FGF, le TGF- $\alpha$ , et IL-1 (Baird, Mormede & Bohlen, 1985; Bissell *et al.*, 1995; Gressner, 1996).

### **b) La perpétuation (Figure 3B)**

L'étape de perpétuation est associée à l'acquisition de nouvelles fonctions des CEF :

- i. la prolifération
- ii. la dégradation de matrice extracellulaire normale
- iii. la synthèse de composés fibrogéniques
- iv. le chimiotactisme
- v. la contraction

### i) La prolifération

L'augmentation du nombre de CEFm dans le site de lésion est une étape importante dans le mécanisme de la fibrogénèse. Elle résulte de l'effet mitogénique de cytokines et de facteurs de croissance sécrétés localement, qui agissent de façon autocrine ou paracrine sur les CEF. Le principal facteur mitogène pour les CEF actuellement connu est le « platelet derived growth factor » (PDGF) (Pinzani *et al.*, 1991). Chez l'homme, les gènes codant pour les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont surexprimés dans le foie cirrhotique (Pinzani *et al.*, 1996c) ce qui suggère un rôle du PDGF dans la physiopathologie de la fibrose. L'expression par les CEF de la chaîne  $\beta$  du récepteur du PDGF apparaît 24 heures après l'administration de CCl<sub>4</sub> (Wong *et al.*, 1994) alors que les lésions histologiques sont encore mineures, et cette expression rend les CEF sensibles au PDGF. D'ailleurs, ce facteur de croissance est sécrété par les CEF (Marra *et al.*, 1994). D'autres facteurs de croissance, tels que le TGF- $\alpha$ , le FGF, l'IGF-I, la

thrombine et le VEGF pouvant être sécrétés par les CEFm stimulent leur prolifération (Ankoma-Sey *et al.*, 1998; Bachem, Riess & Gressner, 1989; Failli *et al.*, 1995; Gressner, Brenzel & Vossmeier, 1993; Marra *et al.*, 1995; Matsuoka, Pham & Tsukamoto, 1989; Pinzani, Abboud & Aron, 1990; Pinzani *et al.*, 1989). Les effets du TGF- $\beta$  sur la prolifération des CEF dépendent de l'espèce. Chez le rat, le TGF- $\beta$  est antiprolifératif (Matsuoka *et al.*, 1989) alors que chez l'homme, il exerce des effets mitogènes indirects, via l'augmentation de la sécrétion de PDGF (Win *et al.*, 1993).

Par ailleurs, l'accumulation des CEFm est limitée par plusieurs facteurs inhibant leur prolifération. L'interféron  $\gamma$ , une cytokine produite par les cellules inflammatoires, inhibe la prolifération des CEFm (Mallat *et al.*, 1995b). De plus, notre groupe a mis en évidence l'effet antiprolifératif de l'endothéline-1 (ET-1) que nous décrivons plus en détail dans le chapitre suivant, et celui du « C-type natriuretic peptide » (CNP) (Mallat *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 1999).

Les voies de signalisation mises en jeu dans la stimulation de la prolifération des CEF sont bien caractérisées en ce qui concerne le PDGF, le mitogène le plus puissant pour les CEFm. Le PDGF se lie à des récepteurs ayant une activité tyrosine kinase qui s'autophosphorylent lors de la liaison du PDGF à son récepteur, permettant ainsi le recrutement de nombreuses molécules de signalisation telles que Grb2, mSos. La stimulation de Ras qui en résulte conduit à l'activation de ERK (Marshall, 1995), la stimulation d'AP1, l'induction de l'expression de c-fos et la prolifération cellulaire (Pinzani *et al.*, 1996a; Svegliati-Baroni *et al.*, 1999). De plus, l'activation par le PDGF de la phosphoinositol 3 kinase (PI3K) est nécessaire à la stimulation de la prolifération des CEF par des voies indépendantes de ERK (Marra *et al.*, 1997).

Les voies de transduction conduisant à l'inhibition de la prolifération des CEFm ont été également caractérisées. L'augmentation d'AMPc par l'ET-1 ou les prostaglandines de type E2 (PGE2), ou l'élévation de GMPc par le CNP réduit la prolifération des CEFm et conduit à l'inhibition de l'activation de ERK (Mallat *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 1999). Par ailleurs, la phosphorylation de CREB en réponse à l'AMPc est impliquée dans l'inhibition de la prolifération des CEFm (Houglum, Lee & Chojkier, 1997; Kawada *et al.*, 1996).

## ii) La dégradation de la matrice extracellulaire normale

Dans le foie normal, la matrice extracellulaire est constituée d'une lame basale de faible densité composée essentiellement de collagène de type IV, de laminine et de protéoglycanes. La matrice extracellulaire d'un foie fibreux est riche en particulier en collagènes interstitiels (collagène de type I et III) et en fibronectine. Ces observations suggèrent que la dégradation de la matrice extracellulaire normale est une étape importante dans le développement de la fibrose hépatique. De fait, au cours des maladies chroniques du foie ou *in vitro* dans les CEFm en culture, on observe une augmentation de l'expression des métalloprotéases de la matrice (MMP) qui dégradent la matrice extracellulaire normale, en particulier de la gélatinase A (MMP-2), gélatinase B (MMP-9) et stromélysin (MMP-3) (Knittel *et al.*, 1999b; Theret *et al.*, 1997; Vrochides *et al.*, 1996; Vyas *et al.*, 1995) (Tableau II).

Type de MMP	Chez l'homme	Substrats dégradés dans le foie
Collagénases	1,8,13	Collagène I, III, X (tenascin)
Gélatinases	2, 9	Gélatine, collagène IV, V, élastine, protéoglycanes, vitronectin
Stromelysines	3,10	Proteoglycanes, collagène IV, V, fibronectine, laminine, élastine
MT-MMP	14	Collagène I et III, protéoglycanes, laminine, fibronectine, vitronectine, Activation de MMP-2

**Tableau II : Les différents types de MMP dans le foie et leurs substrats principaux**

## iii) Synthèse des composés fibrogéniques et blocage de leur dégradation

La progression de la fibrose est assurée d'une part par la synthèse en excès de constituants matriciels (Tableau III) qui vont remplacer la matrice extracellulaire normale, mais également par la diminution de la dégradation des composés fibrogéniques.

### *Régulation de la synthèse des composés fibrogéniques*

Le TGF- $\beta$ 1 est l'un des médiateurs essentiels de la fibrogénèse. Dans le foie, il est produit par les cellules de Kupffer, les plaquettes et les CEF (Nagy, Schaff & Lapis, 1991; Nakatsukasa *et al.*, 1990a; Nakatsukasa *et al.*, 1990b). Le TGF- $\beta$ 1 est clairement associé à la fibrose hépatique. Il augmente la synthèse des collagènes de type I, III, et IV, des protéoglycanes et de glycoprotéines (laminines, ténascine, entactine, fibronectine) (Casini *et al.*, 1993; Knittel *et al.*, 1996c) par les CEF ainsi que la production d'anti-protéase, telles que

l' $\alpha$ 2-macroglobuline et le PAI-1 (Knittel, Fellmer & Ramadori, 1996b). Il a été montré que le TGF- $\beta$ 1 induit l'expression de procollagène de type I dans les CEF en agissant au niveau transcriptionnel (Inagaki *et al.*, 1995). Également, chez l'homme et chez le rat, la production de collagène et de fibronectine est augmentée par l'IGF-1 (Svegliati-Baroni *et al.*, 1999). L'EGF stimule la production de protéoglycanes tel que la decorin, le biglycan ou le syndecan (Gressner, 1994).

Principaux composants de la matrice extracellulaire		
Dans le foie sain	Dans le foie fibrotique	Sécrétés par les CEFm
<b>Collagènes</b> Types IV	<b>Collagènes</b> Types I, III, IV, V, VI	<b>Collagènes</b> Types I, III, IV
<b>Glycoprotéines</b> Laminine Entactine	<b>Glycoprotéines</b> Fibronectine Laminine Entactine	<b>Glycoprotéines</b> Fibronectine Laminine Entactine
<b>Protéoglycanes</b> Perlecan	Tenascine Unduline Vitronectine <b>Protéoglycanes</b> Perlecan Syndecan Biglycan Decorine Betaglycan Aggrecan	Tenascine Unduline <b>Protéoglycanes</b> Perlecan Syndecan Decorine Betaglycan Biglycan

**Tableau III : Composants de la matrice extracellulaire dans le foie normal et dans le foie fibrotique. Comparaison avec les composants de la matrice extracellulaire sécrétés par les CEFm**

#### *Inhibition de la dégradation des composés fibrogéniques*

L'expression des TIMP-1 et TIMP-2 est augmentée dans les CEFm en culture augmentés dans les modèles expérimentaux de fibrose, et chez l'homme au cours des maladies chroniques du foie (Benyon *et al.*, 1996; Ebata *et al.*, 1997; Herbst *et al.*, 1997). Elle précède l'augmentation de l'expression du collagène de type I et pourrait conduire à une diminution de l'activité de dégradation de la matrice extracellulaire. L'expression de TIMP-1 et TIMP-2 est augmentée par le TGF- $\beta$ 1 et le TNF (Knittel *et al.*, 1999b). Récemment, la « fibroblaste activation protein » (FAP) a été identifiée dans le foie cirrhotique où elle colocalise avec les cellules exprimant l' $\alpha$ -actine de muscle lisse et *in vitro* dans les CEFm.

Cette enzyme possède une activité gélatinase et une activité oligopeptidase qui pourrait également jouer un rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire au cours de la fibrose (Levy *et al.*, 1999).

### *Signalisation impliquée dans la synthèse de composants de la matrice extracellulaire*

On ne possède que peu de données sur les mécanismes impliqués dans la régulation de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire. La plupart des études concernant la régulation de l'expression de collagène I. Plusieurs voies seraient impliquées, notamment les cascades des MAPK (ERK et JNK), ou le stress.

Dans les CEF, le TGF- $\beta$ , le PDGF, l'IGF-1 ou l'EGF stimulent la cascade Ras/ERK via l'activation de Raf1 et MEK. Le rôle essentiel de ERK dans la synthèse de collagène a pu être démontré en transfectant un dominant négatif de ERK ou de Ras dans les CEFm. En fait, la stimulation de ERK permet l'activation de deux facteurs de transcription, Sp1 et NF1, essentiels à l'induction du gène du collagène en réponse au TGF- $\beta$ . (Davis, Chen & Beno, 1996; Pinzani *et al.*, 1996a; Svegliati-Baroni *et al.*, 1999).

D'autres enzymes de la cascade des MAPK, en particulier la JNK seraient impliquées dans l'augmentation de la production de collagène I en réponse au 4-hydroxynonanal (HNE) (Parola *et al.*, 1993). Le HNE formerait des adduits avec la JNK, ce qui conduirait à l'activation de l'enzyme et à la phosphorylation du facteur de transcription c-Jun (Parola *et al.*, 1998), qui peut alors se lier à un élément de réponse dans le promoteur du collagène I (Chen & Davis, 1999).

D'autres facteurs stimulent la synthèse de matrice extracellulaire. Ainsi, l'acétaldéhyde un produit du métabolisme éthylique augmente la production de fibronectine et de collagène de type I (Casini *et al.*, 1991). Les CEF exposées à l'acétaldéhyde activent la PKC qui conduit à l'induction des gènes de réponse précoce, c-Fos et c-Jun. (Casini *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1998b). Par ailleurs, le stress oxydatif activé en réponse au TGF- $\beta$  dans les CEF myofibroblastiques conduit à l'activation du facteur de transcription C/EBP $\beta$  qui induit ainsi le gène du collagène I (Garcia-Trevijano *et al.*, 1999).

L'inhibition du gène du collagène de type I en particulier en réponse au TNF- $\alpha$  serait relayé par des protéine G sensibles à la toxine de B pertussis et impliquerait la production de céramide (Hernandez-Munoz *et al.*, 1997).

#### iv) Le chimiotactisme

La migration des CEFm augmente leur accumulation aux sites de lésions (Ikeda *et al.*, 1999). Cette migration est stimulée par le PDGF et la « Monocyte chemoattractant protein 1 » (MCP-1) (Ikeda *et al.*, 1999; Marra *et al.*, 1999b), deux facteurs sécrétés par les CEFm (Marra *et al.*, 1994; Marra *et al.*, 1999a; Marra *et al.*, 1995; Marra *et al.*, 1993). De plus, la synthèse de MCP-1 et de MIP-2, un chemoattractant pour les neutrophiles, permet le recrutement d'un grand nombre de cellules inflammatoires, ce qui favorise la perpétuation du processus d'activation des CEFm (Hellerbrand *et al.*, 1998b; Marra *et al.*, 1999a).

Comme dans de nombreuses cellules, la principale protéine impliquée dans la transduction du signal chemotactique dans les CEF est la « focal adhesion kinase » (FAK) (Rankin & Rozengurt, 1994; Schaller *et al.*, 1995). Son activation permet le recrutement de la PI3K (Chen & Guan, 1994; Marra *et al.*, 1997) et de la phospholipase C  $\gamma$  (PLC  $\gamma$ ) (Carloni *et al.*, 1997) impliquées dans la polymérisation de l'actine en réponse au PDGF.

#### v) La contraction

Les CEFm deviennent capables de se contracter en réponse à différents peptides vasoactifs et ainsi de réguler le flux sanguin. De ce fait, elles seraient impliquées dans la physiopathologie de l'hypertension portale. En culture, ces cellules se contractent en réponse à divers agents tels que le thromboxane A<sub>2</sub>, les prostaglandines F<sub>2</sub>, la thrombine, l'angiotensine-2, la vasopressine et la substance P (Bataller *et al.*, 1997; Kawada, Klein & Decker, 1992; Kawada *et al.*, 1993; Pinzani *et al.*, 1992) mais le principal vasoconstricteur est l'endothéline-1 (ET-1) (Housset, Rockey & Bissell, 1993b; Pinzani *et al.*, 1996b). L'ensemble de ces facteurs exerce leurs effets contractiles en augmentant le taux de calcium cytosolique.

Le principal relaxant pour les CEFm est l'oxyde nitrique qui s'oppose en particulier aux effets contractiles de l'ET-1 (Kawada *et al.*, 1993). De plus, le « vascular endothelial growth factor » (VEGF), le « C-Type natriuretique peptide » (CNP), les PGE<sub>2</sub> et les PGE<sub>1</sub> contrecarrent également les effets vasoconstricteurs de la thrombine ou de l'ET-1 (Kawada *et al.*, 1992; Mashiba *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998c). Le CNP agit par une voie GMPc dépendante, et les PGE<sub>2</sub> via la production d'AMPc. Le mécanisme relaxant du VEGF reste à déterminer.

### **c) Résolution de la fibrose et devenir des CEF myofibroblastiques**

Au cours des atteintes hépatiques aiguës, chez l'homme ou dans les modèles expérimentaux chez le rat, le processus de cicatrisation s'accompagne d'une disparition des CEFm. Deux hypothèses peuvent expliquer cette disparition : i) une réversion de phénotype des CEFm vers un état quiescent, ii) la mort cellulaire par apoptose.

L'apoptose des CEFm a été observé dans un modèle expérimental de maladie aiguë du foie chez le rat, provoqué par l'injection d'une dose unique de CCl<sub>4</sub> (Iredale *et al.*, 1998). Cette apoptose s'accompagne d'une augmentation de l'expression du ligand Fas, CD95 et de protéines proapoptotiques telles que BCl<sub>2</sub> et p53 (Cales, 1998; Gressner, 1998; Saile *et al.*, 1999).

Il n'existe aucune donnée concernant la réversion de phénotype des CEFm mais les CEF peuvent être maintenues dans leur phénotype quiescent lorsqu'elles sont cultivées sur une lame basale hépatique normale (Friedman *et al.*, 1989). Ainsi, un retour à une composition normale en matrice extracellulaire faisant suite au processus de réparation pourrait permettre un retour à un phénotype quiescent des CEFm. Egalement, l'IL-10 qui augmente l'activité de la collagénase interstitielle pourrait être une cytokine importante pour la réversion des CEFm. L'augmentation de son expression au cours de l'activation des CEF pourrait limiter l'accumulation des composés fibrogéniques (Thompson *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998a).

### **d) Rôle des CEF dans la carcinogenèse hépatique**

Dans les hyperplasies, les adénomes ou les carcinomes hépatiques, on observe un grand nombre de cellules exprimant de l'alpha-actine de muscle lisse, de la vimentine et de la desmine autour de la tumeur au niveau de la capsule fibreuse. L'étude de l'ultrastructure de ces cellules favorise l'hypothèse que ces cellules sont des CEFm (Enzan *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1997; Schmitt-Graff *et al.*, 1991). Des études *in vitro* confirment que le milieu conditionné de cellules d'hépatocarcinomes favorise le processus d'activation des CEF (Faouzi *et al.*, 1999). D'autre part, le milieu conditionné de CEFm augmente le pouvoir invasif des cellules d'hépatocarcinome. Cet effet pourrait être médié par le « hepatocyte growth factor » (HGF) produit par les CEFm (Neaud *et al.*, 1997).



### III. Les endothélines

#### 1. Les différentes endothélines et de leurs gènes

##### A. Structure des endothélines

En 1988, Yanagisawa et ses collaborateurs ont isolé un peptide vasoconstricteur puissant provenant du surnageant de cellules endothéliales d'aorte de porc en culture, l'endothéline-1 (ET-1) (Yanagisawa *et al.*, 1988). Par criblage homologue d'une banque humaine d'ADN complémentaire, deux nouvelles endothélines ont été identifiées : l'ET-2 (et son équivalent murin, Endothéline  $\beta$ ) et l'ET-3. Ces trois formes d'endothélines sont structurellement similaires (Inoue *et al.*, 1989a). En effet, elles sont toutes composées de vingt et un acides aminés contenant deux ponts disulfures intramoléculaires qui relient les acides aminés 1 et 15 d'une part, et 3 et 11 d'autre part. Leur séquence en acides aminés est également très proche car l'ET-2 et l'ET-3 ne diffèrent respectivement de l'ET-1 que par deux et six acides aminés (Figure 4). Les ET-1, ET-2 et ET-3 sont codées par trois gènes différents, localisés respectivement dans les chromosomes 6, 1 et 20 (Arinami *et al.*, 1991). Les sarafotoxines des toxine de venin d'aspic possèdent des structures et des fonctions similaires à celle des endothélines, suggérant une origine évolutive commune (Takasaki *et al.*, 1988) (Figure 4).

##### B. Distribution des Endothélines

La synthèse des endothélines, en particulier d'ET-1 et d'ET-3, a lieu dans un très grand nombre de tissus vasculaires et non vasculaires. L'ET-1 est exprimée dans le poumon, le cerveau, le rein, le cœur, l'estomac, le pancréas, le testicule, la rate (Yanagisawa *et al.*, 1988). L'ARNm de l'ET-2 est présent dans le colon, le cœur, l'intestin, et la médullaire rénale (Sokolovsky, 1992). Un ARNm de 3 kb codant pour l'ET-3 est exprimé dans le cerveau, le rein le jéjunum l'estomac et la rate. Deux autres ARNm de 2.0 kb et 3.3 kb codant également pour ET-3, ont été mis en évidence respectivement dans le globe oculaire et le petit intestin (Shiba *et al.*, 1992).

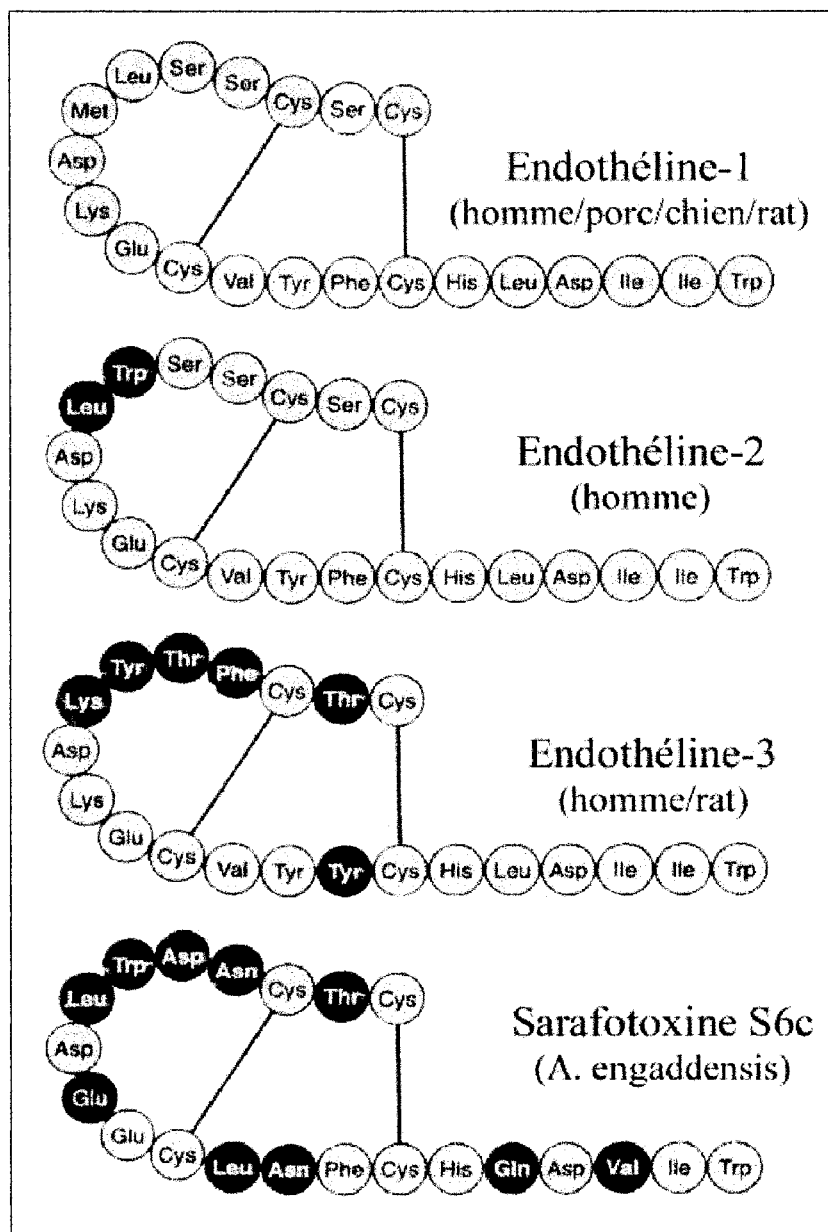
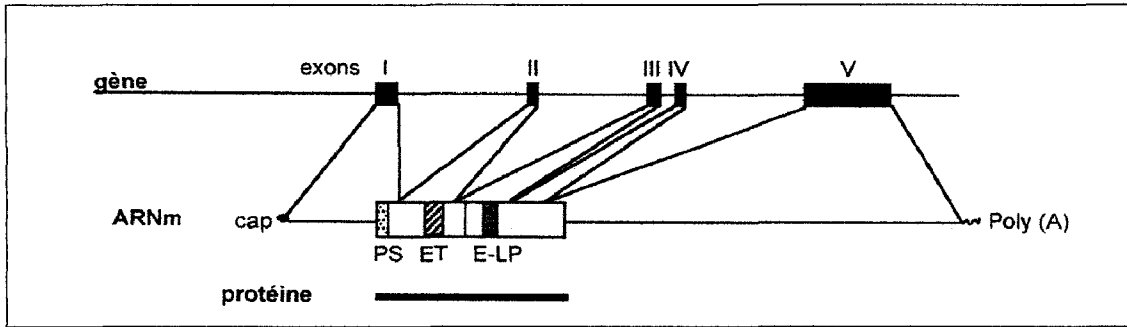


Figure 4 : La famille des endothélines

### C. Structure des gènes des endothélines

Le gène de l'ET-1 contient cinq exons et quatre introns (Bloch *et al.*, 1989a; Bloch *et al.*, 1989b; Inoue *et al.*, 1989b). La séquence nucléotidique codant pour l'ET-1 est contenue entre le second et le troisième exon (Figure 5). La partie 3' non traduite de l'ARN contient 250 bases, qui sont très conservées entre l'homme et le porc. Cette séquence serait importante pour la stabilité de l'ARNm. La région 5' du gène contient en particulier des éléments de réponse pour AP1. Les gènes des différentes endothélines ne sont pas liés génétiquement les uns aux autres. Cependant, ils sont structurellement très similaires, suggérant qu'ils proviennent d'une origine commune et se sont séparés très tôt au cours de l'évolution (Bloch *et al.*, 1989a; Bloch *et al.*, 1989b).



**Figure 5 : Structure du gène et de l'ARNm de la préproET-1 humaine**

(PS : peptide signal ; ET :Endothéline ; E-LP : Endothelin-like peptide)

## 2. Synthèse et maturation des endothélines

### A. Maturation des ET

Comme d'autres peptides actifs, les endothélines sont synthétisées à partir de précurseurs protéiques distincts, les prépro-endothélines, dont la taille varie en fonction de la forme considérée et de l'espèce, entre 202 et 238 acides aminés. Le clivage de ces précurseurs par une endopeptidase de la famille des furines, aboutit à la formation de protéines intermédiaires, les proendothélines ou big-endothélines qui comportent 37 à 41 acides aminés (Denault *et al.*, 1995). La big-endothéline est à son tour clivée par une métalloprotéase, l'endothelin-converting-enzyme (ECE). Les ECE clivent l'ET-1 et l'ET-2 à un site Trp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup> et, en ce qui concerne l'ET-3, le clivage se fait au niveau d'un Trp<sup>21</sup>-Ile<sup>22</sup> (Inoue *et al.*, 1989a; Yanagisawa *et al.*, 1988). Enfin, les endothélines sont inactivées par clivage de l'extrémité C-terminale par une endopeptidase neutre au niveau de l'Asp<sup>18</sup>-Ile<sup>19</sup>, ce qui conduit au relargage d'un tripeptide Ile<sup>19</sup>-Ile<sup>20</sup>-Trp<sup>21</sup> et une endothéline totalement inactive (Jackman *et al.*, 1993). (Figure 6)

### B. Les endothelin-converting-enzymes (ECE)

Trois formes de ECE ont été clonées l'ECE-1, l'ECE-2, et l'ECE-3 (Emoto & Yanagisawa, 1995; Hasegawa *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1993). L'analyse de leurs ADN complémentaires révèle que (i) ce sont des métalloprotéases car elles possèdent la séquence His-Glu-(Ile/Leu/Met)-X-His de la liaison du zinc, (ii) elles sont membranaires et (iii) comportent un grand nombre de sites de glycosylation. Chaque isoforme possède une spécificité, une distribution tissulaire et une localisation cellulaires différentes.

### a) Spécificité des ECE

Les ECE-1 et ECE-2 clivent préférentiellement la big-ET-1 (Emoto & Yanagisawa, 1995; Ohnaka *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994), alors que l'ECE-3 serait spécifique de la big-ET-3 (Hasegawa *et al.*, 1998). L'ECE clivant spécifiquement la big-ET-2 a été décrite dans des cellules d'adénocarcinomes, mais n'a toujours pas été purifiée (Yorimitsu *et al.*, 1995). L'ECE-1 peut également cliver un grand nombre d'autres prohormones telles que la neurotensine, la substance P, ou la bradykinine avec la même efficacité que l'ET-1. Cette étude met en doute son implication dans le métabolisme spécifique de l'ET-1 (Johnson, Stevenson & Ahn, 1999).

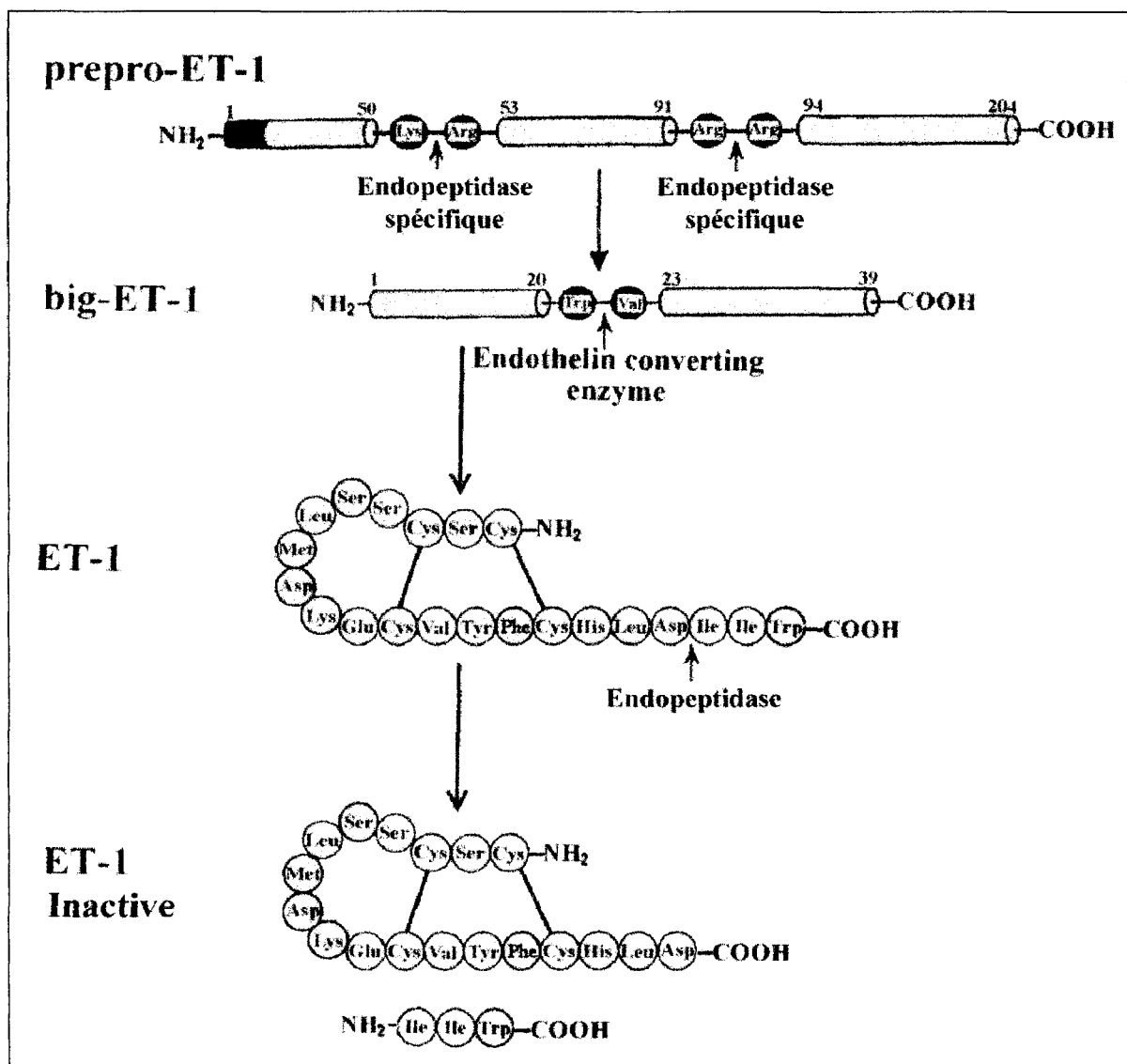
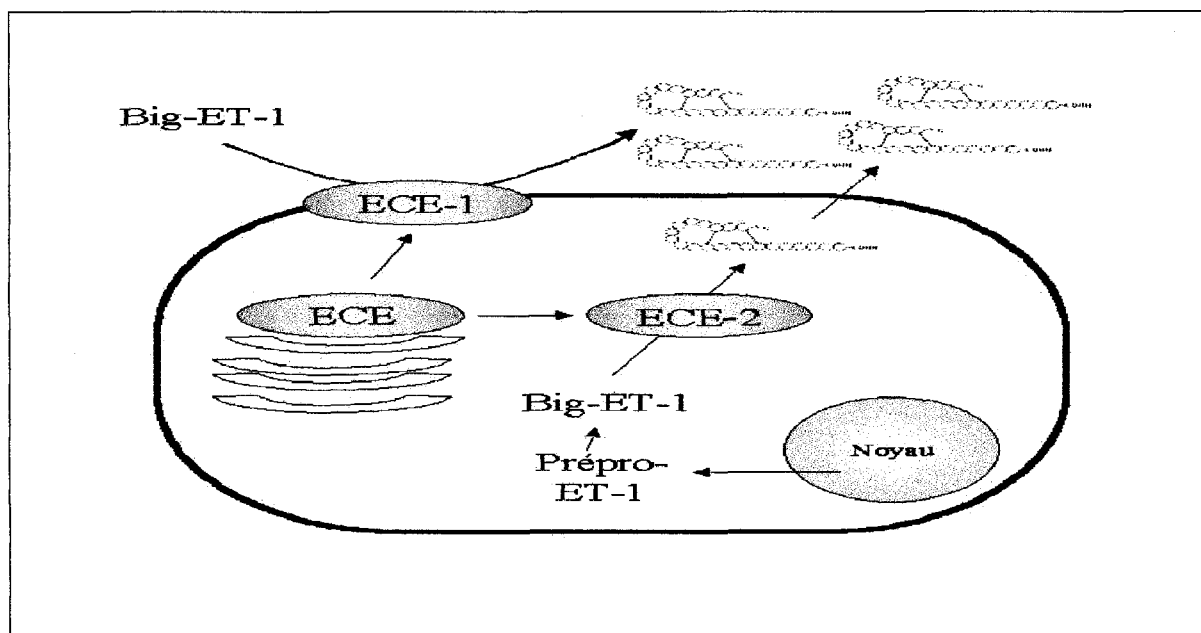


Figure 6 : Maturation et inactivation de l'ET-1

## **b) Localisation subcellulaire**

L'étude des pH optimums de l'ECE-1 et de l'ECE-2 a montré que l'ECE-1 est active à pH neutre, alors que l'ECE-2 a un pH optimum à 5,5 et est totalement inactive à pH neutre. Ces résultats suggèrent que les deux isoformes ont une localisation cellulaire différente, l'ECE-2 étant située dans un compartiment cellulaire acide (Russell & Davenport, 1999).



**Figure 7 : Voie de synthèse de l'ET-1**

## **c) Distribution tissulaire des ECE**

L'analyse de la distribution tissulaire de l'ECE-1 par Northern blot, hybridation *in situ* et immunoblot révèle la présence de son ARNm et de la protéine dans le poumon, le pancréas, le placenta, les glandes surrénales, l'ovaire, le testicule le cerveau et dans des lignées cellulaires neuronales. L'ECE-2 présente une distribution tissulaire identique, mais cette isoforme n'est présente qu'en faible quantité par rapport à l'ECE-1 (Barnes & Turner, 1997; Takahashi *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1994). L'ECE-3 a été purifiée à partir de l'iris de bœuf, mais sa distribution est encore inconnue (Hasegawa *et al.*, 1998).

## ***C. Sécrétion des endothélines***

La demi-vie de l'ET-1 dans le plasma est très courte (<1min) et sa concentration circulante (0.1 à 5 pM selon les auteurs) est bien inférieure aux concentrations généralement nécessaires à l'obtention de ses effets biologiques. Alors que l'ET-3 est retrouvée en faible

quantité dans le plasma, l'ET-2 n'est pas détectable. Au vu de ces données, les ETs semblent être des facteurs agissant préférentiellement de façon paracrine ou autocrine (Sokolovsky, 1992).

Outre les cellules endothéliales, d'autres types cellulaires sécrètent de l'ET-1 telles que des cellules épithéliales de poumon ou intestinales (Shigematsu *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1997), les kératinocytes (Tsuboi *et al.*, 1995), les cellules thyroïdiennes (Vainio *et al.*, 1996) ou encore les cellules trophoblastiques du placenta (Shigematsu *et al.*, 1996). L'origine cellulaire d'ET-2 et d'ET-3 est encore mal connue.

#### ***D. Régulation de la sécrétion des endothélines***

La synthèse d'ET-1 est stimulée par le transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Kurihara *et al.*, 1989), des cytokines telles que le tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Marsden & Brenner, 1992), l'interleukine-1, le thromboxane A2 (Chua, Hamdy & Chua, 1996) ou encore des substances vasoactives telles que la thrombine (Emori *et al.*, 1992), la noradrenaline (Pernow *et al.*, 1990), l'angiotensine II (Ferri *et al.*, 1999), la vasopressine (Imai *et al.*, 1992), la bradykinine (Marsden *et al.*, 1991). Enfin, l'ET-1 stimule sa propre synthèse (Tableau IV).

La synthèse d'ET-1 est inhibée par l'oxyde nitrique, les prostacyclines, et les facteurs natriurétiques (Emori *et al.*, 1993; Fujisaki *et al.*, 1995; Kourembanas *et al.*, 1993; Razandi *et al.*, 1996), l'héparine (Imai *et al.*, 1993), les estrogènes (Akishita *et al.*, 1996) ou la force de cisaillement (Malek & Izumo, 1992; Malek *et al.*, 1999; Yoshizumi *et al.*, 1989) (Tableau IV).

### **3. Les récepteurs des endothélines**

#### ***A. Les différents types de récepteurs***

L'injection intraveineuse d'ET-1, d'ET-2 ou d'ET-3 chez le rat conduit tout d'abord à une diminution de la pression artérielle puis à une hypertension prolongée. L'ET-1 est un vasoconstricteur plus puissant que l'ET-3, alors que les deux peptides possèdent des activités hypotensives équivalentes. De même, l'ET-1 perfusée dans l'artère mésentérique provoque un effet vasoconstricteur plus puissant que celui observé au cours de la perfusion d'ET-3, alors

Facteurs	Effet	Type cellulaire/tissu
<b>PréProET-1</b>		
IL-1	+	Cell. endothéliales, épithéliales respiratoires
IL-6	+	Cellules épithéliales respiratoires
TNF- $\alpha$	+	Cell. endothéliales, mésangiales, épithéliales respiratoires et
TGF- $\beta$	+	rénales Cell. endothéliales, musculaires lisses, mésangiales, antéhypophysaires, épithéliales respiratoires et
PDGF-AA	+	glomérulaires, IMCD
PDGF-AB, BB	+	Cell. musculaires lisses
Phényléphrine	+	Cell. mésangiales
Thrombine	+	Cell. endothéliales
Adrenaline, Insuline	+	Cell. endothéliales, mésangiales, épithéliales trachéales et
Angiotensine II	+	glomérulaires Cell. endothéliales
Vasopressine	+	Fibroblastes cardiaques, cardiomyocytes, cell. musculaires
ET-1	+	lisses Cell. mésangiales
ET-3	+	Fibroblastes cardiaques (ETA), cellules musculaires lisses,
Ionophores calciques	+	mésangiales (ETB)
Ester de Phorbol	+	Cell. endothéliales
LPS	+	Cell. endothéliales
PH acide	+	Cell. endothéliales, épithéliales glomérulaires, macrophages
Hypoxie	+	Cell. épithéliales respiratoires, macrophages Cell. endothéliales
Forskoline	-	Cell. endothéliales, épithéliales intestinales, IMCD, cardiomyocytes, rein, foie
PGE2, PGI2	-	Cell. endothéliales
PTHrp, ANF	-	Cell. endothéliales
IFN $\gamma$	-	IMCD
Corticoïde	-	Cell. épithéliales respiratoires
IGF-1	-	Cell. antéhypophysaires
NO	-	Cell. endothéliales Cell. endothéliales
<b>Prépro ET-2</b>		
EGF	-	Adénocarcinome rénale
<b>Prépro ET-3</b>		
Hypoxie	-	Rein
TGF- $\beta$	-	Cell. antéhypophysaires
IGF-1, Insuline	+	Cell. antéhypophysaires

**Tableau IV : Facteurs modifiant la synthèse et/ou la sécrétion des endothélines**

(EGF : Epidermal Growth Factor, ET : Endothéline, IGF : Insulin like Growth Factor, PDGF : Platelet Derived Growth Factor, TGF : Transforming Growth Factor, TNF : Tumor Necrosis Factor, NO : Nitric Oxyde, IMCD : Cellule épithéliale rénale du canal collecteur de la médullaire intermédiaire, ANF : Atrial Natriuretic Factor, PG : Prostaglandine, PTHrp : parathyroid hormone-related peptide, IFN $\gamma$  : Interféron gamma)

qu'à faibles doses les deux peptides provoquent un effet vasodilatateur comparable. Sur la base de ces données, il avait été suggéré que les effets vasculaires des endothélines étaient relayés par deux classes de récepteurs, l'un relayant la vasoconstriction (ETA) et l'autre la vasodilatation (ETB). Ces observations ont été confirmées sur la base de données pharmacologiques. Dans les tissus vasculaires, les récepteurs ETA sont présents dans les cellules musculaires lisses et lient avec une forte affinité l'ET-1 et ET-2 et avec une plus faible affinité l'ET-3 (Arai *et al.*, 1990). Les récepteurs ETB sont principalement exprimés dans les cellules endothéliales et lient toutes les isoformes de l'endothéline avec la même affinité (Sakurai *et al.*, 1990). Un troisième récepteur, ETC, a été identifié chez le *Xenopus laevis* qui lie préférentiellement l'ET-3 (Karne, Jayawickreme & Lerner, 1993). Cependant, ce récepteur n'a jamais été décrit chez les mammifères. Par ailleurs, l'analyse de la liaison des antagonistes des récepteurs ETB a permis de suggérer l'existence de deux isoformes du récepteur ETB : ETB1 et ETB2 (Douglas, Meek & Ohlstein, 1994b). Le récepteur ETB2 relayerait les effets vasoconstricteurs de l'ET-1, et l'ETB1 les effets vasodilatateurs (Tableau VI).

### **B. Distribution tissulaire des récepteurs**

Les récepteurs ETA et ETB sont présents dans les mêmes organes (Tableau V). Cependant, la distribution cellulaire des récepteurs est différente dans un même organe. Par exemple, dans le cerveau, les récepteurs ETA sont localisés majoritairement dans les vaisseaux sanguins, alors que les récepteurs ETB sont exprimés dans les cellules gliales ou encore dans les cellules épendymaires. Dans le rein, les récepteurs ETA sont localisés dans les cellules de muscles lisses des vaisseaux sanguins, alors que les récepteurs ETB sont exprimés dans l'endothélium glomérulaire, la vasa recta ou encore dans le segment fin de l'anse de Henle. Dans le cœur, les deux récepteurs sont exprimés dans le myocarde et seul l'ETA est présent dans l'aorte (Hori *et al.*, 1992).

	Cœur	Poumon	Cerveau	Foie	Appareil Digestif	Rein	Utérus	Testicule	Placenta
ETA	+++	+++	+	+	++	+	++	+++	++
ETB	+	+++	+++	+	++	++	++	ND	+++

**Tableau V : Expression des récepteurs des endothélines chez l'homme**

(+++ : Fortement exprimé, ++ : moyennement exprimé, + : faiblement exprimé, - : indétectable, ND : Non déterminé)



### **C. La structure des récepteurs des endothélines**

Les récepteurs de l'ET-1 possèdent une structure comprenant sept domaines transmembranaires, une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale cytoplasmique, et sont couplés aux protéines G. Ils présentent entre eux une homologie de séquence en acides aminés de 60% et divergent dans leurs extrémités N-terminale. Cependant contrairement aux autres récepteurs couplés aux protéines G, la partie N-terminale de ces récepteurs ne jouerait aucun rôle dans la sélectivité pour le ligand (Sakamoto *et al.*, 1993). Des différences sont également observées dans la régulation post-transcriptionnelle des récepteurs. Ainsi, la palmitoylation des récepteurs ETA bloque la transduction du signal mais semble n'avoir aucun effet sur les récepteurs ETB (Horstmeyer *et al.*, 1996). Cependant, comme la plupart des récepteurs couplés au protéine G, la désensibilisation des récepteurs ETA et ETB est consécutive à leur phosphorylation par une « G protein receptor kinase ». (Cramer, Muller-Esterl & Schroeder, 1997; Cramer, Muller-Esterl & Schroeder, 1998).

### **D. Pharmacologie des récepteurs de l'ET**

Dans un premier temps, la différence d'affinité entre l'ET-1 et l'ET-3 a permis de suggérer l'existence de différents types de récepteurs. La liaison de l'ET-1 à ses récepteurs est quasiment irréversible et le complexe endothéline-récepteur est rapidement internalisé. La dissociation lente de ces récepteurs peut expliquer les effets prolongés des endothélines (Devesly *et al.*, 1990; Hilal-Dandan *et al.*, 1997).

Par la suite, de nombreux agonistes et antagonistes dérivant de produits naturels ont été décrits tels que la sarafotoxine S6c, un agoniste spécifique des récepteurs ETB ou le BE-18257B, un antagoniste des récepteurs ETA, isolé à partir du produit de la fermentation de *streptomyces misakiensis* (Ihara *et al.*, 1991). La modification de ce peptide a permis la synthèse d'un autre pentapeptide cyclique très utilisé grâce à sa meilleure affinité, sa solubilité et sa sélectivité pour le récepteur ETA : le BQ123 (Douglas *et al.*, 1994a; Ishikawa *et al.*, 1992). A partir de la structure du BQ123, d'autres antagonistes des récepteurs ETA ont été développés, les tripeptides linéaires de synthèse, le FR139317 et PD151242 (Aramori *et al.*, 1993; Davenport *et al.*, 1994). La modification de ces tripeptides a conduit à la synthèse d'agonistes spécifiques pour les récepteurs ETB : BQ3020, IRL620 et d'antagonistes des récepteurs ETB : BQ788. Par ailleurs, la synthèse du PD142893, un antagoniste qu'on croyait non sélectif des récepteurs des endothélines a permis de suggérer l'existence d'une seconde forme de récepteurs ETB, les récepteurs ETB1 (Douglas *et al.*, 1994b). Enfin, d'autres

antagonistes puissants non sélectifs et surtout non peptidiques ont été caractérisés, tels que le bosentan ou le SB209670. Ces produits ont une demi-vie relativement longue dans le sang et peuvent être utilisés *in vivo*. (Tableau VI).

	ETA	ETB		ETC
		ETB1	ETB2	
Ordre d'affinité	ET-1=ET-2>ET-3	ET-1=ET-2=ET-3		ET-1=ET-2<ET-3
Agonistes		Sarafotoxine S6C IRL1620 BQ3020	Sarafotoxine S6C IRL1620 BQ3020	
Antagonistes	BQ123 PD142893  Bosentan SB209670	PD142893 BQ788 Bosentan SB209670	BQ788 Bosentan SB209670	

**Tableau VI : Pharmacologie des récepteurs de l'endothélines**

#### 4. Les fonctions des endothélines

Bien que toujours considérées comme les plus puissants vasoconstricteurs connus à ce jour, les endothélines exercent de nombreuses autres actions biologiques dans des tissus non vasculaires (Tableau VII). En particulier, l'ET-1 et l'ET-3 jouent un rôle majeur lors du développement, dans le processus de migration de la crête neurale (Clouthier *et al.*, 1998; Gariépy, Cass & Yanagisawa, 1996; Hosoda *et al.*, 1994; Kurihara *et al.*, 1995a; Kurihara *et al.*, 1995b; Kurihara *et al.*, 1994). Au cours de la cicatrisation, l'ET-1 peut également stimuler la migration cellulaire et augmenter la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire, ce qui lui confère un rôle profibrogène, en particulier dans le rein (Kohan, 1993). Dans les cellules épithéliales qui représentent un site important de leur synthèse, les endothélines régulent les activités de transport hydro-électrolytiques. Dans le rein notamment, l'ET-1 et l'ET-3 inhibent la réabsorption d'eau et de sodium par le tube collecteur en réponse à la vasopressine (Nadler, Zimpelmann & Hebert, 1992).

##### A. Endothélines et prolifération

Les endothélines régulent positivement ou négativement la prolifération et l'apoptose. Elles stimulent la prolifération de différents types cellulaires tels que les astrocytes (Lazarini *et al.*, 1996), les cellules mésangiales glomérulaires (Simonson *et al.*, 1989), les mélanocytes (Tada *et al.*, 1998), des perycites vasculaires (Yamagishi *et al.*, 1993) ou des cellules gliales

(MacCumber, Ross & Snyder, 1990). Elles exercent également des effets antiprolifératifs dans les cellules de mélanomes humains (Okazawa *et al.*, 1998), les cellules épithéliales trachéales (Ninomiya, Inui & Masaki, 1998) ou les CEF myofibroblastiques (Mallat *et al.*, 1995a). L'effet mitogénique de l'ET-1 est généralement relayé par les récepteurs ETA alors que ses effets antiprolifératifs impliquent les récepteurs ETB.

### ***B. Endothélines et apoptose***

L'endothéline exerce également des effets pro et anti apoptotiques suivant le type cellulaire. Dans les mélanomes, l'ET-1 induit l'apoptose via ses récepteurs ETB, consécutivement à une induction et une translocation de p53 dans le noyau (Okazawa *et al.*, 1998). En revanche, les effets apoptotiques obtenus par déprivation de sérum dans les fibroblastes, et par le paclitaxel, un anticancéreux dans les cellules musculaires lisses musculaires, est inhibé par l'ET-1 par l'intermédiaire des récepteurs ETA (Shichiri, Marumo & Hirata, 1998a; Shichiri *et al.*, 1998b; Wu-Wong *et al.*, 1997). Enfin, lors du développement de la crête neurale, l'ET-1 semble protéger les cellules mésenchymateuses de l'apoptose permettant ainsi un développement normal (Thomas *et al.*, 1998). Les voies de transduction activées par l'ET-1 dans ce processus ne sont pas encore connues.

	<b>Effets</b>
Développement	Migration de la crête neurale
Cœur	Chronotrope et inotrope positif
Vasculaire	Vasoconstriction Régulation du tonus vasculaire
Rein	Inhibition de la filtration glomérulaire Excretion sodique Inhibition du relargage de renine
Poumon	Contraction des bronchioles
Appareil reproducteur	Augmentation sécrétion de LH et FSH Contraction utérine Stimulation la production de testostérone Contraction prostatique

**Tableau VII : Les principaux effets des endothélines**

## ***C. Endothélines et foie***

### **a) Synthèse et récepteurs de l'ET-1 dans le foie**

Dans le foie normal, la synthèse d'ET-1 est très faible (0,05 pg/mg de protéines) (Leivas *et al.*, 1995). Les ARNm de la prépro-endothéline-1 sont principalement exprimés dans les cellules endothéliales du sinusoïde. Ils sont également détectables en faibles quantités dans les cellules de Kupffer et les CEF (Eakes *et al.*, 1997; Housset *et al.*, 1993b; Rockey *et al.*, 1998). La synthèse d'ET-1 peut également avoir lieu dans les hépatocytes, dans des circonstances particulières telles que le développement embryonnaire ou en cas de transformation maligne. L'ET-1 et big-ET-1 sont libérées dans le surnageant de culture par les cellules de la lignée hépatocytaire HepG2 (Suzuki *et al.*, 1989).

Sur coupes de foie, les ARNm de l'ECE-1 ont été localisés dans les cellules endothéliales des sinusoïdes et des vaisseaux. De plus, chez l'homme, il a été possible de mettre en évidence une synthèse d'ET-1 dans les cellules épithéliales biliaires intra-hépatiques, ainsi que dans les cellules épithéliales de la vésicule biliaire (Shao, Yan & Rockey, 1999)

Les sites de liaison des endothélines dans le foie ont d'abord été identifiés par des études de clairance effectuées chez le rat. Après injection dans la circulation générale d'ET-1 ou d'ET-3 radiomarquées, une grande partie de la radioactivité est détectée dans les CEF, les cellules endothéliales de la veine porte et de la veine centrolobulaire (Gondo *et al.*, 1993). Des études *in vitro* montrent que les récepteurs ETA et ETB des endothélines sont majoritairement exprimés dans les CEF mais sont également présents dans les hépatocytes. Les récepteurs ETB sont également détectés dans les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales du sinusoïde hépatique (Mallat *et al.*, 1995a; Housset *et al.*, 1993b; Jouneaux *et al.*, 1994; Stephenson *et al.*, 1995) (Figure 8). Ainsi, comme dans les autres organes, la colocalisation des lieux de synthèse de l'ET-1 et de ses récepteurs suggère des actions autocrines et paracrines du peptide.

### **b) Actions de l'ET-1 dans le foie sain**

#### **i) Effets vasculaires**

De nombreuses travaux ont été consacrés au rôle de l'ET-1 dans la régulation du flux sanguin hépatique. L'apport exogène d'ET-1 dans le foie isolé perfusé conduit à une augmentation soutenue de la pression portale (Gandhi, Stephenson & Olson, 1990; Okumura *et al.*, 1994; Zhang, Pegoli & Clemens, 1994). Cet effet est reproduit chez l'animal entier

après injection intraveineuse d'ET-1 dans la veine fémorale ou la veine porte. L'augmentation de la pression portale en réponse à l'ET-1 dans le foie normal résulte de l'augmentation des résistances intrahépatiques, causées par la vasoconstriction des vaisseaux porte (Okumura *et al.*, 1994). Un effet vasopresseur de l'ET-1 sur les sinusoides pourrait également contribuer à l'augmentation des résistances intrahépatiques, mais cet effet est controversé.

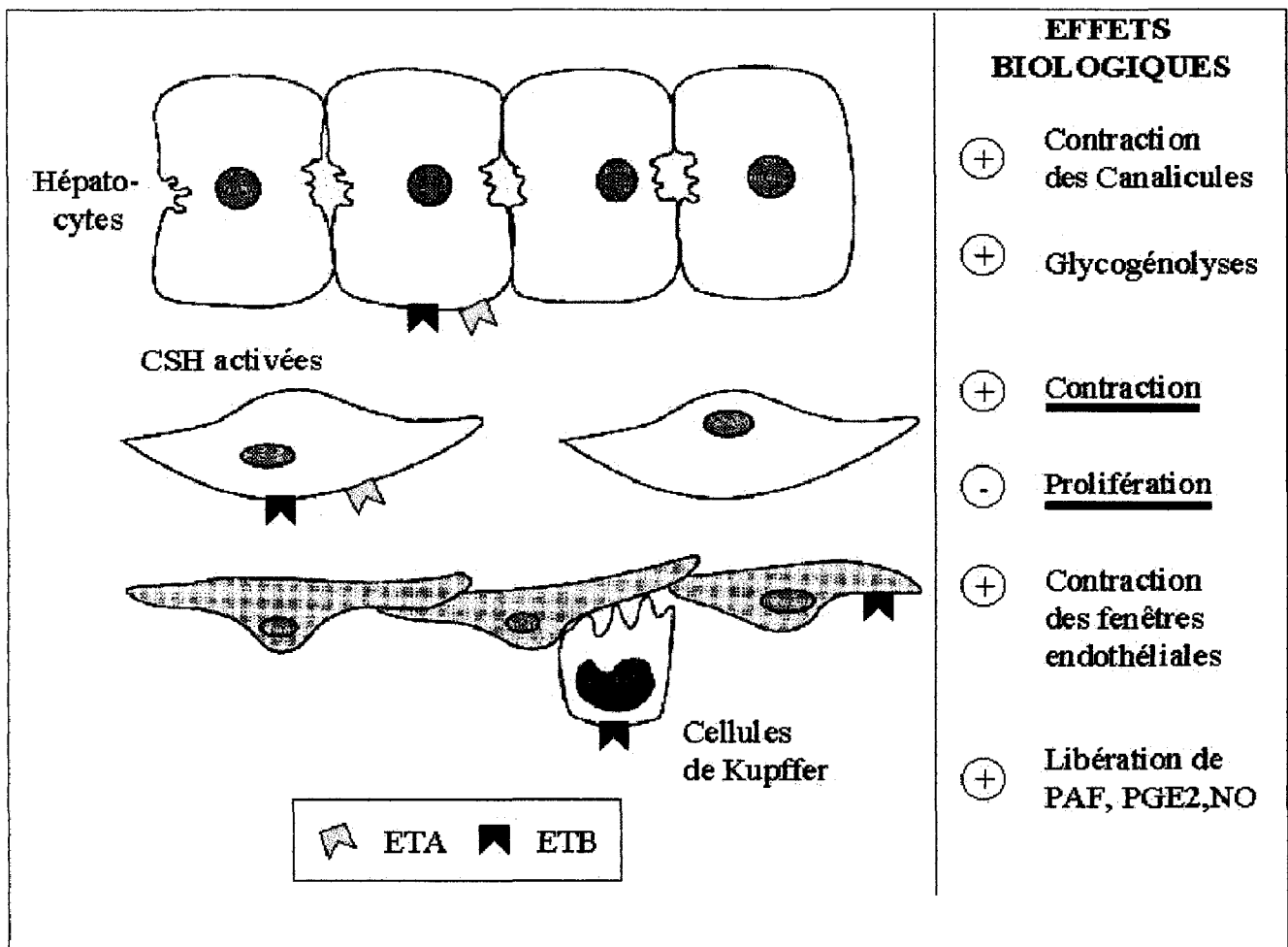
## ii) Effets non vasculaires

Parmi les effets extravasculaires de l'ET-1 dans le foie, les effets métaboliques ont été les premiers décrits. L'ET-1, via ses récepteurs ETB, augmente la glycogenolyse dans les hépatocytes. Cet effet est relayé par une augmentation du calcium cytosolique (Serradeil-Le Gal *et al.*, 1991) consécutivement à l'activation de la phospholipase C et l'inhibition de la pompe à calcium des membranes plasmiques (Jouneaux *et al.*, 1994). Par ailleurs, dans les cellules de Kupffer, la liaison de l'ET-1 aux récepteurs ETB stimule la sécrétion de PGE2 et de « platelet activating factor » (PAF) (Mustafa *et al.*, 1995; Stephenson *et al.*, 1997).

L'ET-1 exerce également des effets sur le flux biliaire. A fortes concentrations, elle provoque une diminution du flux biliaire (Tanaka *et al.*, 1994 ; Bauer *et al.*, 1994). Ces effets sont bloqués en présence d'agents vasodilatateurs tels que les prostacyclines, l'oxyde nitrique ou la papavérine, suggérant que la cholestase observée est secondaire à l'action vasoconstrictrice de l'ET-1 (Bauer *et al.*, 1994; Isales, Nathanson & Bruck, 1993; Tanaka *et al.*, 1994; Tran-Thi, Kawada & Decker, 1993). A l'inverse, une faible concentration d'ET-1 augmente la sécrétion biliaire probablement par la stimulation du transport vésiculaire hépatocytaire (Tanaka *et al.*, 1994). L'ET-1 augmente également la fréquence de contraction des canalicules biliaires (Kamimura *et al.*, 1993). Ainsi, l'ET-1 peut favoriser le flux biliaire dans des conditions physiologiques. Cependant à forte concentration, elle pourrait être impliquée dans les complications des maladies de foie provoquées par une cholestase (Figure 8).

## c) Rôle de l'ET-1 dans les lésions hépatiques d'ischémie-reperfusion

Au cours de la transplantation hépatique, une augmentation de la concentration plasmatique d'ET-1 est constatée pendant la période post opératoire précoce chez l'homme et chez l'animal (Gandhi *et al.*, 1996a). Dans les modèles expérimentaux d'ischémie reperfusion, la concentration d'ET-1 est augmentée dans la veine porte, la veine hépatique et



**Figure 8 : Effets hépatiques de l'endothéline**

(Souligné : effets des endothélines dans une situation pathologique)

PAF : Platelet Activating Factor ; PGE2 : Prostaglandine type E2 ; NO : Nitrique Oxyde)

dans la veine cave suprahépatique et le tissu hépatique (Kawamura *et al.*, 1995). Son accroissement est constaté dès la phase d'hypoxie mais se majore encore après la reperfusion (Goto *et al.*, 1994). Cette augmentation d'endothéline serait responsable d'une part d'une vasoconstriction de la veine porte et d'autre part de lésions hépatocellulaires. En effet, l'administration d'antagonistes des récepteurs ou d'anticorps anti-endothéline avant l'ischémie reperfusion permet d'augmenter le flux sanguin hépatique et de diminuer la pression portale (Kitayama *et al.*, 1997). Ce même traitement permet également de diminuer les lésions endothéliales hépatocellulaires induites par l'ischémie reperfusion, ce dont témoigne une amélioration de la sécrétion biliaire et une diminution des activités des enzymes hépatiques circulantes (Goto *et al.*, 1994; Kitayama *et al.*, 1997; Pannen *et al.*, 1998). Le rôle de l'ET-1 dans la survenue des lésions hépatocellulaires et des perturbations hémodynamiques du foie dues à l'ischémie reperfusion au cours de la transplantation hépatique suggère que l'utilisation d'antagonistes des endothélines puisse constituer une

approche pharmacologique utile pour atténuer les effets néfastes des endothélines dans ces circonstances.

#### **d) Rôle de l'ET-1 dans les maladies chroniques du foie**

De nombreuses études ont montré que les concentrations plasmatiques d'ET-1 et/ou ET-3 étaient augmentées chez les patients atteints de cirrhose (Gerbes *et al.*, 1995; Pinzani *et al.*, 1996b). Elles sont d'autant plus élevées que la maladie de foie est sévère (Hartleb *et al.*, 1994), en particulier lorsque la cirrhose est compliquée par une ascite, un syndrome hépato-rénal ou une infection bactérienne (Moore *et al.*, 1992). Cette augmentation d'endothélinémie est expliquée d'une part la réduction du catabolisme de l'endothéline (Gandhi, Sproat & Subbotin, 1996b) et d'autre part une augmentation de la synthèse d'ET-1 dans les cellules endothéliales, les cellules épithéliales biliaires et les CEF myofibroblastiques (Housset *et al.*, 1993a; Housset *et al.*, 1993b; Pinzani *et al.*, 1996b; Rieder, Ramadori & Meyer zum Buschenfelde, 1991). Cette stimulation est favorisée, dans les CEF myofibroblastiques par les facteurs augmentés au cours de la fibrogénèse tels que le PDGF, le TGF- $\beta$  et le PAF (Eakes & Olson, 1998; Pinzani *et al.*, 1996b; Rieder *et al.*, 1991). Par ailleurs, on observe une régulation de l'expression d'ECE-1 dans les cellules endothéliales et les CEF myofibroblastiques (Shao *et al.*, 1999). Cette augmentation d'ET-1 peut également contribuer à la vasoconstriction et à l'hyperfiltration rénale qui sont à l'origine du syndrome hépato-rénal. Il a ainsi été possible d'améliorer de façon significative la fonction rénale de patients atteints de syndrome hépato-rénal grâce à l'administration de BQ123 un antagoniste des récepteurs ETA (Soper, Latif & Bending, 1996).

Le rôle de l'ET-1 dans la physiopathologie de la fibrogénèse hépatique est complexe. En effet, plusieurs arguments suggèrent que l'ET-1 pourrait limiter le développement de la fibrose hépatique. Notre groupe a en effet démontré que l'ET-1 inhibe la prolifération des CEFm par l'intermédiaire de ses récepteurs ETB. De plus, l'expression des récepteurs ETB est très augmentée dans le foie cirrhotique ainsi que dans les CEFm de rat isolés à partir d'animaux ayant une fibrose expérimentale induite par le CCl<sub>4</sub> (Gandhi *et al.*, 1998; Leivas *et al.*, 1998). Enfin, l'administration d'un antagoniste des récepteurs ET-1 augmente la fibrogénèse induite par le CCl<sub>4</sub> (Poo *et al.*, 1999). Toutefois, il a été montré que le récepteur ETA favorise le processus d'activation myofibroblastique des CEF et stimule leur prolifération (Pinzani *et al.*, 1996b; Rockey *et al.*, 1998). Cette fonction du récepteur ETA est étayée par une étude dans un modèle de fibrose expérimentale induite par la ligature de

cholédoque qui montre que l'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur ETA ralentit le processus de fibrogénèse (Cho *et al.*, 2000). L'ensemble de ces travaux indique donc que la surproduction hépatique d'ET-1 au cours des hépatopathies chroniques semble avoir deux effets opposés sur le développement de la fibrogénèse : un effet profibrogénique par l'intermédiaire des récepteurs ETA et un effet antifibrogénique relayé par les récepteurs ETB.

Les CEFm acquièrent des propriétés contractiles qui interviennent dans la physiopathologie de l'hypertension portale. En effet, en se contractant en réponse à divers agents vasoconstricteurs, et en particulier à l'ET-1, elles réduisent le calibre des capillaires sinusoides et constituent ainsi l'un des éléments concourant à augmenter la résistance intrahépatique et à provoquer de l'hypertension portale. Toutefois, le rôle de l'ET-1 dans la physiopathologie de l'hypertension portale est controversé. En effet, chez le rat, des résultats montrent que dans un modèle d'hypertension portale induite par ligature de la voie biliaire principale ou par injection de CCl<sub>4</sub>, l'administration de bosentan, un antagoniste ETA/ETB, réduit la pression portale (Rockey & Weisiger, 1996). Cependant, une étude contradictoire récente montre que dans le même modèle d'hypertension portale induite par l'administration de CCl<sub>4</sub>, l'injection de RO485696, un antagoniste ETA/ETB de seconde génération, n'a aucun effet sur l'hypertension portale chez le rat cirrhotique (Poo *et al.*, 1999). Là encore, l'utilisation d'antagonistes sélectifs peut s'avérer décisive.

## **5. Transduction du signal des endothélines**

### ***A. Les différents couplages des récepteurs des endothélines aux protéines G***

Les récepteurs des ETs appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G. L'utilisation des toxines de pertussis (PTX) et de cholera (CTX) ont permis de mettre en évidence le couplage complexe des récepteurs des endothélines aux protéines G. En effet, le couplage des récepteurs ETA et ETB à une protéine G donnée dépend du type cellulaire. Ainsi, les récepteurs ETA sont couplés à Gi dans les cellules endothéliales de capillaires du cerveau (Ladoux & Frelin, 1991) et à Gs dans les cellules vasculaires de muscle lisse (Eguchi *et al.*, 1993a). De même, les récepteurs ETB sont couplés à Gi dans les cellules mésangiales (Simonson & Dunn, 1990a) et dans les astrocytes (Couraud *et al.*, 1991) et à Gs dans les cellules endothéliales de capillaires du cerveau (Vigne, Ladoux & Frelin, 1991). Enfin dans certains types cellulaires un même



récepteur peut être couplé à 2 protéines G différentes. Par exemple, Gq et Gs sont couplées aux récepteurs ETB dans le foie (Jouneaux *et al.*, 1994) et aux récepteurs ETA dans les cellules endothéliales (Eguchi *et al.*, 1993a). L'ensemble de ces résultats suggère que les second messagers activés en réponse aux endothélines peuvent être très variés : Calcium, AMPc, ou MAPK (Figure 9).

### ***B. Le calcium, l'IP3, le DAG et la PKC***

Quel que soit le récepteur de l'endothéline, on observe toujours une augmentation de calcium cytosolique consécutivement à la liaison de l'ET à son récepteur. Cependant, les mécanismes par lequel l'ET-1 augmente le calcium diffèrent selon les récepteurs impliqués. En effet, dans les cellules de muscle lisse d'aorte de rat, les récepteurs ETA activent rapidement l'élévation de calcium par la voie IP3 (Kasuya *et al.*, 1989a; Kasuya *et al.*, 1989b; Pang *et al.*, 1989) alors que le récepteur ETB augmente le calcium plus tardivement (Kang, Kang & Lee, 1998; Naik *et al.*, 1998) en stimulant l'influx de calcium à travers des canaux dont la nature reste très controversée et dépend probablement du type cellulaire. Les premières études indiquaient que l'ET-1 activait des canaux calciques dépendant du voltage (VOC) de deux types, sensible (type L) et insensible (type T) aux dihydropyridines (Goto *et al.*, 1989; Simonson *et al.*, 1989; Vigne *et al.*, 1990a; Xuan, Watkins & Whorton, 1991). Des travaux plus récents ont montré que les canaux calciques ROC (receptor operated calcium channel) seraient activés par les ETs (Stanimirovic *et al.*, 1994; Wilkes *et al.*, 1991).

Egalement, l'implication de la PKC dans les effets biologiques des ETs a été montrée dans différents systèmes cellulaires. Dans les cellules endothéliales des capillaires du cerveau, l'activation de la PLC par l'ET-1 est réduite après traitement des cellules par des esters de phorbol (Vigne *et al.*, 1990b). Dans ce cas, la PKC contribuerait par un mécanisme de rétrocontrôle négatif de la réponse cellulaire à l'ET-1. La stimulation de la PKC par l'ET-1 est également responsable de l'inhibition du taux d'AMPc stimulée par la vasopressine dans les cellules épithéliales rénales du canal collecteur de la médullaire interne (Kohan & Hughes, 1993).

### ***C. L'AMPc***

Là encore, les ETs régulent positivement et négativement le taux d'AMPc selon la nature du récepteur ETA ou ETB ou le type cellulaire.

La transfection des deux récepteurs dans des cellules CHO a montré que l'ET-1 augmente le taux d'AMPC lorsque les cellules surexpriment les récepteurs ETA, mais inhibe la formation d'AMPC dans les cellules surexprimant ETB (Aramori & Nakanishi, 1992; Takagi *et al.*, 1995). En accord avec ces données, l'ET-1 stimule la production d'AMPC via les récepteurs ETA dans les cellules de muscle lisse vasculaire et respiratoire ou dans les cellules trachéales embryonnaires (Eguchi *et al.*, 1993a; Oda *et al.*, 1992; Takimoto *et al.*, 1996). L'ET-1 par l'intermédiaire des récepteurs ETB inhibe au contraire la production d'AMPC stimulée la forskoline dans les cellules endothéliales vasculaires et des astrocytes (Eguchi, Hirata & Marumo, 1993b; Lazarini *et al.*, 1996). Cependant, les récepteurs ETA inhibent la production d'AMPC dans les myocytes cardiaques ventriculaires et dans le myomètre, dans des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et dans une lignée cellulaire d'astrocytome (Couraud *et al.*, 1991; Hilal-Dandan *et al.*, 1994; Khac, Naze & Harbon, 1994; Ladoux & Frelin, 1991) alors que l'ET-1 par l'intermédiaire de ses récepteurs ETB stimule la formation d'AMPC dans les cellules musculaires lisses du sphincter de l'iris (el-Mowafy & Abdel-Latif, 1994). Enfin, dans les cellules cardiaques auriculaires, l'ET-1 n'exerce aucun effet sur le taux d'AMPC, ni à l'état basal, ni après stimulation par l'isoprotérénol (Vigne, Lazdunski & Frelin, 1989).

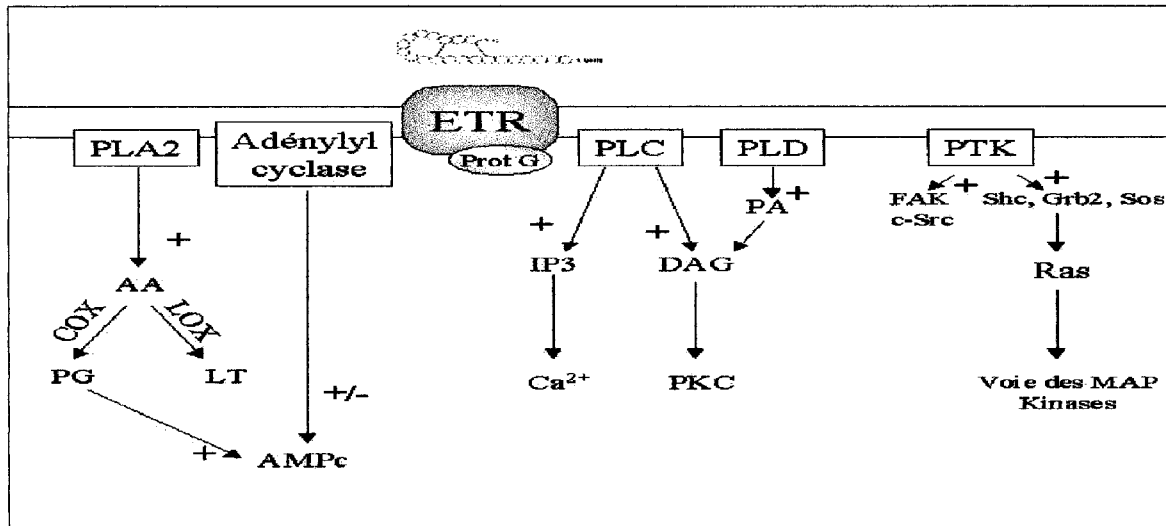
#### ***D. Les autres seconds messagers***

L'ET-1 peut activer la phospholipase D (PLD), l'enzyme qui hydrolyse les phosphatidylcholines membranaires, conduisant à la libération de choline et d'acide phosphatidique (Kester *et al.*, 1992; MacNulty, Plevin & Wakelam, 1990; Suzuki, Oiso & Kozawa, 1994). Ce dernier peut à son tour être transformé en DAG par une phosphatidique hydrolase. Cette voie de signalisation constitue une autre source de DAG qui pourrait être responsable de l'activation prolongée de la PKC (Griendling, Tsuda & Alexander, 1989; Suzuki *et al.*, 1997).

Dans de nombreux types cellulaires, les ETs activent la PLA2. Cette enzyme catalyse la formation d'acide arachidonique (Barnett *et al.*, 1994; Kruger *et al.*, 1995; Resink, Scott-Burden & Buhler, 1989). L'acide arachidonique peut être ensuite métabolisé par les cyclooxygénases, ce qui conduit à la formation de prostaglandines et de thromboxanes, ou par la lipoxycgénase ce qui conduit à la formation de leucotriènes (Filep *et al.*, 1991; Fukunaga *et al.*, 1991; Resink *et al.*, 1989; Stanimirovic *et al.*, 1993). La production de PGE2 en réponse à l'ET-1 peut, par un mécanisme indirecte, augmenter à son tour le taux d'AMPC comme cela a

été montré dans la glande hypophysaire antérieure et dans les cellules mésangiales (Matsumoto *et al.*, 1996; Simonson & Dunn, 1990b).

L'ET-1 active également la production de nitrique oxyde (NO) en stimulant la NO synthase (NOS) via les récepteurs ETB exclusivement. Cette production de NO rend compte des effets vasodilatateurs de l'ET-1 (Filep, Battistini & Sirois, 1993; Stephenson *et al.*, 1997).



**Figure 9 : Voies de signalisation associées aux récepteurs des endothélines**

(COX : Cyclooxygénase, LOX : Lipoxygénase, PA : Acide Phosphatidique, PKC: Protéine Kinase C, IP3 : Inositol tri-phosphate, FAK : Focal Adhésion Kinase, DAG : Diacyl Glycerol, AA : Acide Arachidonique, PG : Prostaglandines, AMPc : Adenosine mono phosphate cyclique, LT : Leucotriène, PL : Phospholipase, PTK : Protéine Tyrosine kinase)

L'ET-1 active également les MAPK, ERK, JNK et p38-MAPK dans les cellules de muscle lisse pulmonaire, dans les myocytes cardiaques ou dans les fibroblastes. L'activation de ERK par l'ET-1 est impliquée dans ses effets mitogènes et est consécutivement à l'activation de la voie Shc/Grb2/Ras (Alexandrov *et al.*, 1998; Clerk, Michael & Sugden, 1998; Shapiro *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 1999; Yamboliev, Hruby & Gerthoffer, 1998). Alors que l'activation de JNK ou p38 MAPK jouerait un rôle majeur dans l'hypertrophie cardiaque (Clerk *et al.*, 1998).

Enfin, l'ET-1 active également une petite protéine G, Rho A qui est impliqué dans le remaniement du cytosquelette. L'activation de cette voie semble impliqué dans la régulation de la contraction des cellules de muscle lisse. Les voies de transduction conduisant à cette activation restent inconnues (Wang & Bitar, 1998).

### ***E. Voies de transduction impliquées dans la régulation de la prolifération et dans l'apoptose en réponse aux ETs***

L'effet mitogénique implique l'activation de la voie p21Ras/ERK (Extracellular Regulated Kinase) (Foschi *et al.*, 1997; Imokawa, Yada & Kimura, 1996; Lazarini *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 1999) qui conduit à l'induction des gènes de réponse précoce tels que c-fos, fra-1, c-jun, c-myc, Egr-1 (Bagnato *et al.*, 1997; Shamim *et al.*, 1999; Simonson *et al.*, 1989). Enfin, l'activation de la FAK (focal adhésion kinase) est également impliquée dans les effets mitogéniques de l'ET-1 dans les astrocytes (Bagnato *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 1999).

Les effets antiprolifératifs de l'ET-1 impliquent l'inhibition de la voie des MAPK et de c-Jun. Cette inhibition des MAPK est consécutive à une augmentation de la production de prostaglandines (PGE2/PGI2) qui à leur tour augmentent le taux d'AMPc (Mallat *et al.*, 1996) (Figure 9).

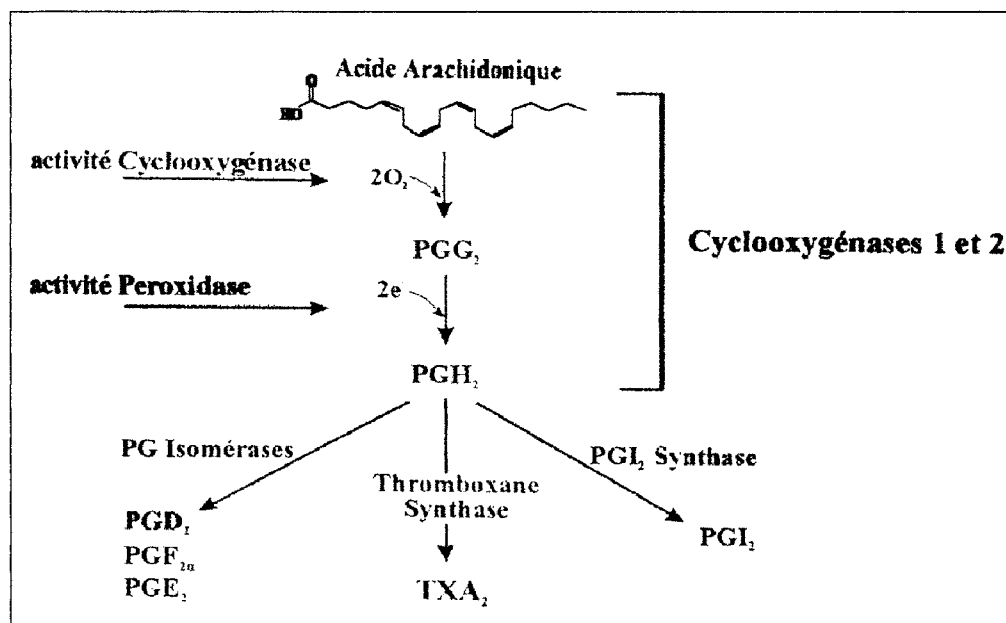
## IV. Les cyclooxygénases

### 1. Les différentes cyclooxygénases et leurs pharmacologies

Les cyclooxygénases (COX) ou prostaglandine H2 synthétases sont les enzymes qui catalysent la biosynthèse des prostanoïdes dont les prostaglandines, à partir de l'acide arachidonique (AA). Elles possèdent deux activités enzymatiques distinctes au sein de la même protéine :

- une activité cyclooxygénase conduisant à la formation d'endoperoxyde cyclique PGG<sub>2</sub> et la libération de deux molécules d'O<sub>2</sub>
- une activité peroxydase réduisant un groupement 15-hydroperoxyde de la PGG<sub>2</sub> en 15-hydroxyle et donne le PGH<sub>2</sub>.

La PGH<sub>2</sub> est alors transformée en prostaglandines primaires : PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, et tromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) par des prostaglandines ou des tromboxane synthases spécifiques (Figure 10)



**Figure 10 : Voie de synthèse des prostaglandines**

(PG : Prostaglandine ; TX :Thromboxane)

Il existe actuellement deux isoformes de COX : COX-1 et COX-2. La COX-1 a été clonée en 1988 par trois groupes indépendants (DeWitt & Smith, 1988; Merlie *et al.*, 1988; Yokoyama, Takai & Tanabe, 1988). La mise en évidence de la COX-2 date du début des années 90 (DuBois *et al.*, 1994; Kujubu *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 1991). Les deux isoformes possèdent un

poids moléculaire de 71 KDa et une grande similarité de structure. Elles existent sous forme homodimérique et possèdent un hème ferrique, de nombreux sites de glycosylation et deux sites catalytiques (Smith, Garavito & DeWitt, 1996).

Les COX sont codées par deux gènes différents. Le gène de la COX-2 humaine (8,3 kb) contient 10 exons (Kujubu & Herschman, 1992). Celui de la COX-1 (22 kb) contient 11 exons, et ne contient pas de TATA box, caractéristique d'un gène de ménage (Kraemer, Meade & DeWitt, 1992). En accord avec ces données, la COX-1 est exprimée constitutivement dans un grand nombre de tissus. Elle est impliquée dans l'expression basale de prostaglandines. Elle est très abondante dans le rein, l'estomac, les plaquettes et l'endothélium vasculaire. La COX-2 est généralement indétectable à l'état basal mais peut être induite rapidement (entre 2 et 6 heures) dans les fibroblastes (Kujubu *et al.*, 1993), les cellules endothéliales (Jones *et al.*, 1993), les monocytes (O'Sullivan *et al.*, 1992) ou encore les follicules ovariens (Sirois, Simmons & Richards, 1992) en réponse à des facteurs de croissances, des hormones, des endotoxines bactériennes, des cytokines ou encore des agents promoteurs de tumeurs. Cependant, des données récentes indiquent que le gène de la COX-1 peut être induit au cours du développement (Brannon *et al.*, 1994) et inhibé dans les cellules endothéliales en réponse au FGF acide (Hla & Maciag, 1991; Wadleigh & Herschman, 1999). D'autre part, la COX-2 est exprimée constitutivement dans le cerveau, les testicules, dans la macula densa rénale, dans l'épithélium de la trachée, et les îlots de Langherhans (Harris *et al.*, 1994; Sorli *et al.*, 1998; Walenga *et al.*, 1996; Yamagata *et al.*, 1993) et pourrait ainsi dans ces cellules, participer à la régulation de la production basale de prostaglandines

## ***A. Pharmacologie des cyclooxygénases***

### **a) Les inhibiteurs non sélectifs**

Les COX sont inhibés par les antiinflammatoires non stéroïdiens (AINS). Le premier AINS découvert est un dérivé acétylé du salylate, l'aspirine qui inhibe irréversiblement les deux isoformes de COX par acétylation. D'autres molécules ont par la suite été développées : l'indométacine, l'ibuprofène ou le sulindac...(Tableau VIII) Cependant, ces inhibiteurs non sélectifs provoquent des lésions gastriques et également des problèmes rénaux dus à l'inhibition de la production basale de PG relayée par la COX-1.

### **b) Les inhibiteurs sélectifs COX-2**

C'est dans le but de réduire ces effets secondaires que des molécules inhibant spécifiquement la COX-2 ont été mises au point en tant qu'agents antidouleurs, antipyrétiques ou anti-inflammatoires liés à l'augmentation de l'expression de la COX-2. L'utilisation d'une molécule de première génération, le méloxicam, un inhibiteur sélectif de COX-2, montre que les troubles gastriques sont significativement moins importants que ceux provoqués par des inhibiteurs non sélectifs (Furst, 1997). Des produits plus spécifiques comme le NS-398 ou encore le SC-58125 ont été développés. Comme le méloxicam, les tests cliniques montrent des effets secondaires réduits (Mizuno *et al.*, 1997; Penning *et al.*, 1997). Deux molécules, le viox et le celebrex (dérivé du SC58125) ont été récemment commercialisés dans le cadre du traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

Type de drogues	IC50 COX-1 ( $\mu$ M)	IC50 COX-2 ( $\mu$ M)
<b><u>Inhibiteurs non sélectifs (AINS)</u></b>		
Piroxicam	0,0005	0,3
Aspirine	1,67	278
Indométhacine	0,028	1,68
Ibuprofène	3	3,5
<b><u>Inhibiteurs sélectifs COX-2</u></b>		
Méloxicam	4,8	0,43
Nimesulide	9,2	0,52
SC58125	38,7	0,27
NS398	16,8	0,10
L-745, 337	369	1,5
Celecoxib	15	0,04

**Tableau VIII : Pharmacologie des cyclooxygénases**

### ***B. Localisation nucléaire de la COX-2***

Classiquement les PG agissent par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G pour exercer leurs fonctions. Cependant, un effet intracellulaire des PG a été considéré suggéré par la mise en évidence d'une localisation périmoléculaire de la COX-2 (Morita *et al.*, 1995; Otto & Smith, 1994). Par ailleurs, la découverte de récepteurs nucléaires, les « peroxisome proliferator-activated receptors » (PPAR) pouvant lier les PG et les acides gras a conforté cette hypothèse (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995; Krey *et al.*, 1997).

## ***C. Recombinaison homologue des COX***

### **a) Invalidation de la COX-1**

Les souris hétérozygotes invalidées pour le gène de la COX-1 sont viables mais les souris homozygotes meurent avant la naissance, suggérant un rôle de la COX-1 dans le développement embryonnaire. Cependant, contrairement au rôle protecteur proposé de la COX-1 dans l'estomac et le rein, renforcé par l'effet délétère des AINS, ces souris invalidées pour la COX-1 ne présentent aucun dysfonctionnement rénal ni ulcération gastrique. De façon surprenante, et en opposition avec le rôle supposé exclusif de la COX-2 dans l'inflammation, ces souris invalidées pour la COX-1 présentent une réponse inflammatoire modifiée. En effet, on observe un retard du recrutement des monocytes et de la sécrétion de cytokines chez les souris hétérozygotes en réponse à l'acide arachidonique. C'est lorsque la COX-2 est induite après deux heures que les PG produites initient le processus inflammatoire. Ainsi, la production précoce de PG ne peut être due qu'à la COX-1. (Langenbach *et al.*, 1995).

### **b) L'invalidation de la COX-2**

Les souris homozygotes invalidées pour le gène de la COX-2 survivent entre 8 et 16 semaines. Une néphropathie est observée 6 semaines après la naissance et sa sévérité ne cesse d'augmenter jusqu'à la mort de l'animal. Elle est due à un arrêt précoce de la maturation du rein. En effet, on observe un faible pourcentage de néphrons formés et la grande majorité des glomérules sont immatures. Lorsque l'animal vieillit, les néphrons fonctionnels s'atrophient, conduisant à un arrêt des fonctions rénales. D'autre part, les femelles sont stériles car incapables d'ovuler (Dinchuk *et al.*, 1995; Morham *et al.*, 1995). Ces résultats montrent un rôle constitutif de la COX-2 dans l'ovulation. Par ailleurs, de façon surprenante, le processus inflammatoire en réponse à l'acide arachidonique n'est pas altéré. Cependant, une augmentation de la quantité de prostaglandines est tout de même observée en réponse à une inflammation provoquée (Morham *et al.*, 1995). Cette élévation de PG semble due à la COX-1. L'ensemble de ces résultats confirme que la COX-1 est impliquée dans les événements précoces de l'inflammation. De plus, ils réfutent l'implication indispensable de la COX-2 dans le processus inflammatoire



## **2. Les fonctions des COX**

Les prostaglandines jouent un rôle majeur dans la régulation de l'inflammation, la prolifération cellulaire, la réparation tissulaire, la parturition...

### ***A. Dans l'appareil digestif***

Dans la plupart des espèces, et chez l'homme, les prostaglandines sont synthétisées majoritairement par la COX-1 dans l'estomac. Cependant, une petite quantité de COX-2 est également présente constitutivement (Kargman *et al.*, 1996).

Le rôle des PG constitutivement produites dans l'appareil digestif est fondamental. Tout d'abord, les prostaglandines et plus particulièrement les PGI<sub>2</sub> exercent un rôle cytoprotecteur dans l'intestin. Cet effet est largement dû à leur capacité vasodilatatrice qui régule ainsi le flux sanguin dans la muqueuse (Russell, 1986) mais également l'activation de la prolifération des cellules épithéliales par les PG produites par la COX-1 (Cohn *et al.*, 1997). Enfin, ces PG stimulent également la sécrétion de bicarbonate (Crampton, Gibbons & Rees, 1987; Moriarty *et al.*, 1986). L'induction de la COX-2 favorise la guérison des ulcérations gastriques (Jaszewski, Graham & Stromatt, 1992; Mizuno *et al.*, 1997).

### ***B. COX-2 et cancer colorectal***

Le rôle de la COX-2 dans la progression de la carcinogenèse colorectale a été initialement suggéré par le fait que la COX-2 est surexprimée dans plus de 80% des cancers colorectaux humains. Des études épidémiologiques démontrent que chez les patients traités par des AINS, le risque de développement d'un cancer colorectal est réduit de moitié (Williams, Smalley & DuBois, 1997). De plus, les inhibiteurs de COX-2 possèdent une activité antinéoplasique dans différents modèles de tumeurs colorectales (Dubois *et al.*, 1998). En effet, alors que les cellules non transformées n'expriment pas de COX-2, une induction marquée de l'enzyme est observée dans les cellules tumorales. *In vitro*, le blocage de l'activité COX-2 inhibe la prolifération de cellules cancéreuses coliques et provoque leur apoptose (Dubois *et al.*, 1998). De nombreuses données suggèrent aujourd'hui un rôle de la COX-2 dans le développement de nombreux autres cancers (Prescott & Fitzpatrick, 2000)

### ***C. Dans le rein***

Le rein contient majoritairement de la COX-1. Cependant, un faible niveau de COX-2 est détecté (Harris *et al.*, 1994). La distribution des isoformes de COX est différente. En effet,

la COX-1 est présente dans le tubule collecteur, alors que la COX-2 est localisée au niveau de la macula densa. Enfin, dans les cellules mésangiales en culture, on observe une augmentation de la production de PGE2 et de PGI2 après l'induction de la COX-2 par des cytokines ou des facteurs de croissance (Martin *et al.*, 1994)

Dans le rein normal, les PG produites par la COX-1 régulent la réabsorption d'eau et de sodium en réponse à la vasopressine (Conte *et al.*, 1992). De plus, l'expression de COX-2 est augmentée dans la macula densa suite à une déprivation de sel. Enfin, les PG régulent la sécrétion de rénine qui est indispensable dans la régulation de l'homéostasie sodique sanguine (Harris *et al.*, 1994). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle clé des PG dans l'absorption d'eau et de sodium. Par ailleurs, les PG ne jouent aucun rôle dans la régulation du flux sanguin dans un rein normal, mais sont impliquées dans le maintien du tonus vasculaire lors d'une compression rénale (Corradi & Arendshorst, 1985). Enfin, il a été montré que le maintien d'une fonction normale du rein dépend de la production de PG chez des patients présentant une insuffisance rénale ou une cirrhose (Bosch-Marce *et al.*, 1999; Laffi *et al.*, 1997).

#### ***D. Dans le système nerveux central***

Chez l'homme, l'expression d'ARNm de COX-1 et de COX-2 est équivalente (O'Neill & Ford-Hutchinson, 1993). La COX-1 est exprimée préférentiellement dans les neurones du système nerveux central. La COX-2 est également exprimé constitutivement dans des régions spécifiques : le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus, la moelle épinière (Breder, Dewitt & Kraig, 1995; Breder & Saper, 1996). La COX-2 est également présente dans les cellules non neuronales du système nerveux central (Breder *et al.*, 1995; Breder & Saper, 1996).

Les PG produites semblent être impliquées dans des fonctions intégratives complexes telles que la modulation du système nerveux autonome et le processing sensoriel (Breder *et al.*, 1995; Yamagata *et al.*, 1993). Les PGE2 transmettent le signal neuronal au niveau de l'aire préoptique de l'hypothalamus antérieur qui est le centre thermorégulateur (Cao *et al.*, 1996). La synthèse de PGE2 est stimulée consécutivement à l'induction de la COX-2 dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins crâniens et dans la microglie, par les cytokines et plus particulièrement l'IL-1 qui sont sécrétées suite à l'action de pyrogènes (Cao *et al.*, 1996; Elmquist *et al.*, 1997). De plus, les PG sont impliquées dans la douleur ou plus particulièrement dans l'hyperalgésie. Cependant, les centres neuronaux impliqués dans la génération de la douleur n'expriment qu'une faible quantité de COX-2. En fait, la moelle

épinière, riche en COX-2, est probablement le lieu de ce processus nociceptif (Ferreira, 1972; Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 1996). L'implication des PG dans l'hyperalgésie a été démontré par l'administration de PGE2 à des rats (Ferreira & Lorenzetti, 1996; Nishihara *et al.*, 1995) et par l'effet analgésique de l'ibuprofène, l'aspirine ou le NS-398 sont des analgésiques potentiels lorsqu'ils sont injectés au rat (Malmberg & Yaksh, 1992; Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 1996).

Enfin, la production de PG favoriserait le développement de la maladie d'Alzheimer. En effet, une étude épidémiologie a montré que les utilisateurs réguliers de AINS ont un risque de développer la maladie d'alzheimer réduit de moitié (McGeer, Schulzer & McGeer, 1996; Stewart *et al.*, 1997). Cette maladie est caractérisée par l'apparition de plaques contenant une grande quantité de la protéine  $\beta$ -amyloïde qui est capable d'activer la microglie, la sécrétion de cytokines et d'autres effets caractéristiques de l'inflammation. L'hypothèse proposée est que les AINS réduisent la réponse de la microglie à cette protéine et diminuent la réponse inflammatoire relayée par les PG.

### ***E. Dans le foie***

Les COX ont un rôle hépatoprotecteur et seraient également impliquées dans la régénération hépatique et l'hépatocarcinogénèse.

#### **a) Distribution des COX dans le foie**

Dans le foie normal, les isoformes de COX sont peu exprimées (O'Neill & Ford-Hutchinson, 1993). La COX-1 est exprimée uniquement dans les cellules endothéliales, et les deux isoformes sont présentes dans les cellules de Kupffer (Koga *et al.*, 1999; Nanji *et al.*, 1997).

#### **b) COX et hépatotoxicité**

Le rôle hépatoprotecteur des PG est connu depuis plus de 20 ans et a été démontré dans différents modèles d'hépatites, induites par le paracétamol, le tetrachlorure de carbone, et la galactosamine. En effet, l'administration de dérivés stables de PGE1, de PGE2 ou de PGI2 réduit l'inflammation et la nécrose hépatocytaire et normalise des transaminases (Guarner *et al.*, 1988 ; Bursch *et al.*, 1989, Takano *et al.*, 1998)

### **c) COX et régénération hépatique**

Les PG sont également impliquées dans la régénération hépatique. En effet, on observe une augmentation de PGE2 entre 3 et 10 heures après hépatectomie partielle qui coïncide avec l'activation de la prolifération des hépatocytes (Tsujii *et al.*, 1993). L'effet mitogène des PGE2 a été confirmé *in vitro* sur des hépatocytes en culture (Hashimoto *et al.*, 1997). De plus, les PGE2 régulent la production de cytokines tels que l'IL-6 et l'IL-1, qui jouent un rôle majeur dans la régénération hépatique (Goss *et al.*, 1993).

### **d) COX et hépatocarcinogénèse**

Il n'existe que très peu de données concernant le rôle des COX, et particulièrement de la COX-2, dans le développement des cancers primitifs du foie. Une induction de la COX-2 hépatique a été décrite dans un modèle expérimental d'hépatocarcinogénèse (régime déficient en choline). Dans ce modèle, l'administration d'aspirine ou de piridoxam diminue le nombre de foyers préneoplasiques et néoplasiques alors que l'ibuprofène et l'indométacine n'ont que peu ou pas d'effet (Denda *et al.*, 1997; Endoh *et al.*, 1996), suggérant un effet du piridoxam et de l'aspirine indépendant du blocage des COX-1/COX-2. D'autre part, au cours d'une étude menée chez 44 patients, une surexpression de COX-2 et de COX-1 a été mise en évidence au sein des carcinomes hépatocellulaires (CHC) différenciés alors que cette expression disparaît dans les CHC peu différenciés (Koga *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de la COX-2 et de la COX-1 dans les étapes précoces de la carcinogénèse hépatique mais restent à confirmer.

## **EXPOSE DES TRAVAUX**

Les CEFm jouent un rôle majeur dans le développement de la fibrose hépatique, la complication majeure des malades chroniques du foie. Au cours de ce travail, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la prolifération des CEFm humaines et mis en évidence le rôle central de la COX-2.

Le premier article concerne la mise en évidence de l'implication de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les effets antiprolifératifs de ET-1 et du TNF- $\alpha$ . Nous avons également caractérisé les mécanismes impliqués dans l'induction de la COX-2 et démontré l'importance du facteur de transcription NF- $\kappa$ B.

Dans le deuxième article, nous avons mis en évidence que la sphingosine 1 phosphate est un second messager antiprolifératif de l'ET-1.

Dans le troisième article, nous démontrons que l'effet mitogénique du PDGF et de la thrombine est la résultante d'une voie positive et d'une voie négative de régulation de la prolifération des CEFm. La composante négative implique la voie COX-2.

Les données bibliographiques relatives à chacune de ces études figurent dans l'introduction des articles inclus dans ce mémoire :

GALLOIS C., HABIB A., TAO J., MACLOUF J. MOULIN S., MALLAT A., and LOTERSZTAJN S., Role of NF-KappaB in the growth inhibitory effect of ET-1 and TNF-alpha in human hepatic stellate cells : involvement of cyclooxygenase-2 (1998)  
J. Biol Chem, 273, 23183-23190.

GALLOIS C, DAVAILLE J, HABIB A, LI L, MALLAT A, TAO J, LEVADE T, and LOTERSZTAJN S., Antiproliferative effects of sphingosine-1-phosphate in human hepatic myofibroblasts: a cyclooxygenase-2-mediated pathway. (2000)  
J. Biol Chem, 275, 34628-34633.

MALLAT A, GALLOIS C., TAO J., HABIB A., MACLOUF J., MAVIER P., PREAUX A.M., and LOTERSZTAJN S., Platelet-derived growth factor-BB and Thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cells proliferation, (1998)  
J. Biol Chem, 273, 27300-27305.

**ARTICLE 1**

## **V. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) est un facteur de transcription ubiquitaire activé par les cytokines, les facteurs de croissance, le stress ou encore certains virus. NF- $\kappa$ B stimule la transcription de nombreux gènes tels que les gènes viraux, les gènes de l'immunité, de l'inflammation et les gènes de facteurs impliqués dans la régulation de la prolifération. Les fonctions de NF- $\kappa$ B dans l'immunité sont bien déterminées, cependant, peu d'études ont été réalisées sur les fonctions de ce facteur de transcription dans le foie (Baeuerle & Baltimore, 1996; Barnes, 1997; Thanos & Maniatis, 1995).

### **1. Caractérisation de NF- $\kappa$ B et de son inhibiteur I $\kappa$ B**

#### ***A. La famille Rel***

NF- $\kappa$ B comprend 5 membres p50, p52, p65 (Rel A), Rel B et cRel. Toutes les protéines de cette famille sont caractérisées par un motif de liaison à l'ADN situé en N-terminal, et par un domaine de dimérisation appelé domaine d'homologie Rel. Les facteurs cRel, Rel B et p65 possèdent un domaine de transactivation à leur extrémité C-terminale domaine qui est absent dans les sous unités p50 et p52.

NF- $\kappa$ B se lie à l'ADN sous forme d'un homo ou d'un hétérodimère composé le plus souvent des sous unités p50/p65. L'élément de réponse caractéristique est 5'GGGANNTCCC3' ; cependant, selon le dimère considéré, l'élément de réponse peut varier (Baeuerle & Baltimore, 1996).

#### ***B. La famille I $\kappa$ B***

A l'état basal, NF- $\kappa$ B est complexé dans le cytoplasme à une sous unité inhibitrice I $\kappa$ B. La présence d'I $\kappa$ B masque le peptide signal nucléaire du dimère NF- $\kappa$ B et permet ainsi son maintien sous forme inactive dans le cytoplasme. Il existe trois isoformes de I $\kappa$ B : I $\kappa$ B- $\alpha$  et I $\kappa$ B- $\beta$  et I $\kappa$ B- $\epsilon$  récemment clonée. Ces sous unités sont caractérisées par la présence de six motifs ankyrines, qui sont impliqués dans le processus protéolytique permettant la libération du dimère NF- $\kappa$ B (Perkins, 2000)

### **2. Mécanisme d'activation**

En réponse à une stimulation, I $\kappa$ B- $\alpha$  est phosphorylée sur les sérines 32 et 36 et I $\kappa$ B- $\beta$  sur les sérines 19 et 23, puis ubiquitinylé ce qui permet sa dégradation par le protéasome. Le



dimère NF- $\kappa$ B peut alors transloquer dans le noyau, se lier à son élément de réponse (Figure 11) et réguler la transcription de ses gènes cibles. (pour revue : O'Neill & Kaltschmidt, 1997; Siebenlist, Franzoso & Brown, 1994). Le mécanisme de phosphorylation de I $\kappa$ B restait inconnu, jusqu'à la découverte récente des I $\kappa$ B kinases.

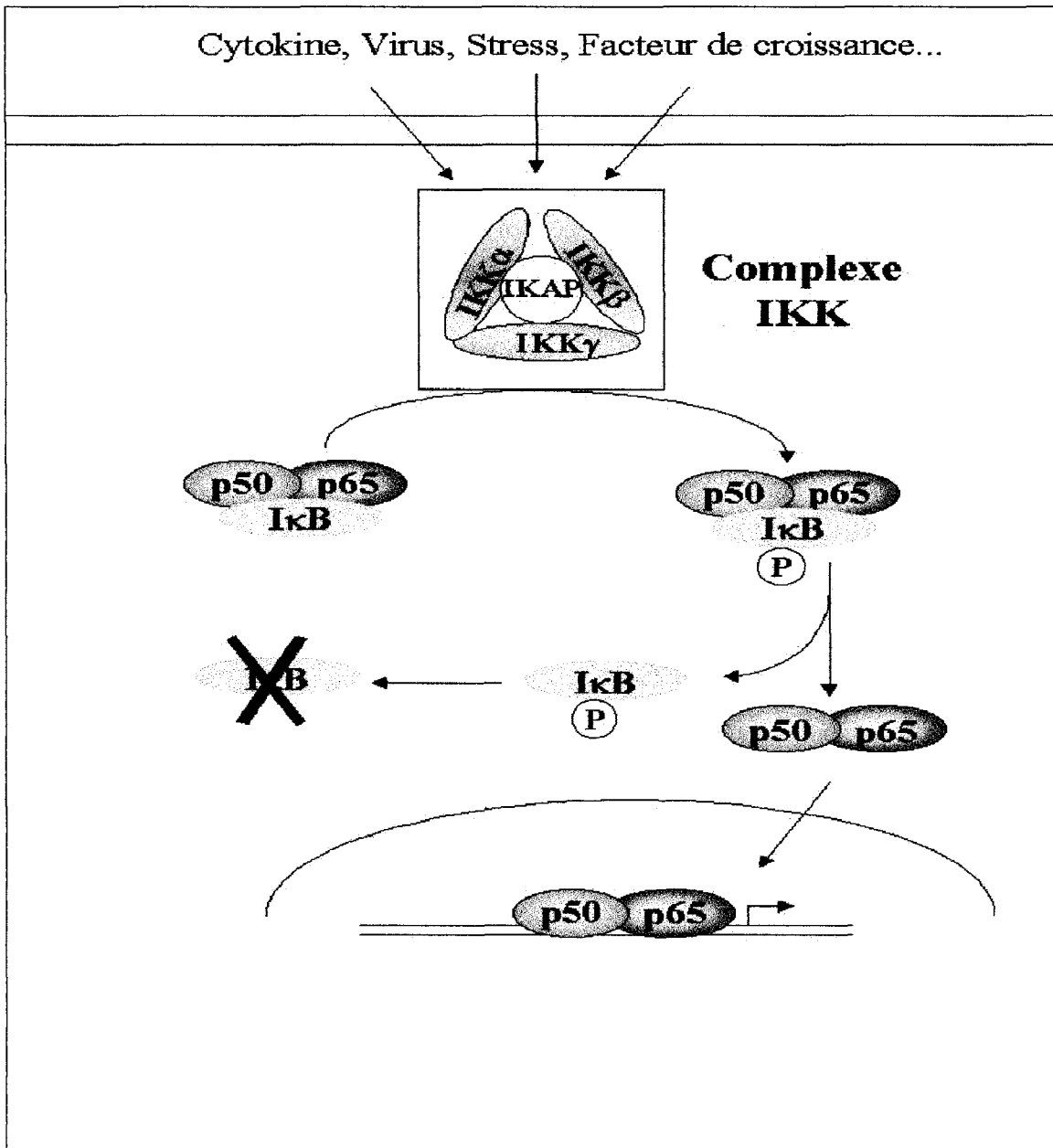
## **A. Les I $\kappa$ B kinases**

### **a) La famille des IKK**

Les I $\kappa$ B kinases (IKK) phosphorylant I $\kappa$ B font parti d'un complexe protéique supérieur à 700 kDa, dont deux membres, IKK-1 (87 kDa) et IKK-2 (85kDa), ont été récemment identifiés (DiDonato *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1997; Regnier *et al.*, 1997; Zandi *et al.*, 1997). Ces kinases peuvent former des homo ou hétérodimères *in vitro* et sont capables de phosphoryler directement I $\kappa$ B- $\alpha$  ou I $\kappa$ B- $\beta$  sans distinction (Lee *et al.*, 1998a; Zandi, Chen & Karin, 1998). Ce complexe protéique IKK comprend également i) une sous unité régulatrice, IKK $\gamma$  ou NEMO qui maintient d'IKK sous une forme inactive (Yamaoka *et al.*, 1998); ii) IKAP (IKK complex associated protein) qui participe à la formation et au maintien de l'intégrité du complexe IKK (Cohen, Henzel & Baeuerle, 1998).

### **b) Activation des IKK**

NF- $\kappa$ B peut être activé par de nombreuses cytokines et en particulier par le TNF- $\alpha$ . La liaison des cytokines à leurs récepteurs entraîne la phosphorylation du complexe IKK permettant la stimulation de son activité kinase (Bhullar *et al.*, 1998; Chu *et al.*, 1998; Delhase *et al.*, 1999; Uhlik *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1998; Yin *et al.*, 1998). Les kinases activant le complexe IKK ne sont pas clairement identifiées mais incluraient la MEKK-1 (MAPK/ERK kinase kinase), kinase impliquée dans l'activation de JNK (Lee *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998a).



**Figure 11 : Mécanisme d'activation de NF-Kappa-B**

### 3. Les gènes cibles de NF-κB

Les gènes cibles de NF-κB sont très divers. On trouve des cytokines telle que l'IL-6, des molécules d'adhésion telle que VCAM-1, des neuropeptides telle que la dynorphine, des chemoattractants tel que MCP-1 ou encore des enzymes dont fait partie la COX-2 (O'Neill & Kaltschmidt, 1997; Yamamoto *et al.*, 1995). Enfin, l'un des gènes cibles de NF-κB est IκB-α lui-même. L'induction de IκB-α permettrait ainsi l'inactivation de NF-κB en complexant le facteur de transcription dans le noyau et entraînant son retour dans le cytosol (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1997; Renard *et al.*, 2000).

#### **4. NF- $\kappa$ B et foie**

Peu d'études ont été réalisées sur les fonctions de NF- $\kappa$ B dans le foie. Seules les sous unités p50, p65, cRel ont été identifiées mais p52 ne serait pas exprimé (Essani *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1995).

L'activation de NF- $\kappa$ B est observée en réponse à une stimulation des hépatocytes par l'endotoxine, le TNF, ou le LPS (Essani *et al.*, 1996; Freedman *et al.*, 1992; Han & Brasier, 1997) et également lors de la régénération hépatique (FitzGerald *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1992). L'activation de NF- $\kappa$ B dans les hépatocytes protège de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  lors de la régénération hépatique et au cours du développement embryonnaire du foie. En effet, chez les animaux invalidés pour la sous unité p65 de NF- $\kappa$ B, on observe une atteinte hépatique importante due à une apoptose massive des hépatocytes (Beg *et al.*, 1995). Chez les animaux invalidés pour le gène de l'IKK $\beta$ , l'activation de NF- $\kappa$ B est bloquée et le phénotype observé est identique (Doi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1999). Par ailleurs, nous avons vu précédemment que NF- $\kappa$ B était impliqué dans le processus d'activation des CEF quiescentes (voir paragraphe « Signaux impliqués lors de la prolifération et la mobilité des CEF »).

#### **5. Implication de NF- $\kappa$ B dans la prolifération et l'apoptose**

Les effets de NF- $\kappa$ B sur la prolifération cellulaire sont controversés. En effet, NF- $\kappa$ B est impliqué dans la stimulation de la prolifération de nombreux types cellulaires tels que les lymphocytes T et B (Baldwin *et al.*, 1991), les cellules 3T3 (beauparlant, oncogene, 1994) et les hépatocytes lors de la régénération hépatique (FitzGerald *et al.*, 1995). Cependant, dans les cellules Hela ou les cellules de carcinome mammaire, NF- $\kappa$ B serait impliqué dans l'inhibition de la prolifération (Dejardin *et al.*, 1995).

Enfin, NF- $\kappa$ B régule l'apoptose. Son rôle antiapoptotique est largement documenté, en particulier dans les hépatocytes (Beg *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996b). Cependant le rôle proapoptotique de NF- $\kappa$ B a également été décrit. En effet, le gène suppresseur de tumeur p53 contient un élément de réponse NF- $\kappa$ B dans son promoteur. La surexpression de NF- $\kappa$ B dans des neuroblastomes ou des WEHI 293 cells conduit à l'induction de p53 et à une apoptose massives de ces cellules Grimm *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1995) Ainsi, selon le type cellulaire, NF- $\kappa$ B exerce des effets positifs ou négatifs sur la prolifération et l'apoptose.

Dans le premier article, nous avons mis en évidence le rôle de la COX-2 dans les effets antiprolifératifs de l'ET-1 et du TNF- $\alpha$ . Nous avons étudié les mécanismes d'induction de la COX-2 et centré notre étude sur NF- $\kappa$ B dont la COX-2 est l'un des gènes cibles.

## Role of NF- $\kappa$ B in the Antiproliferative Effect of Endothelin-1 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ in Human Hepatic Stellate Cells

INVOLVEMENT OF CYCLOOXYGENASE-2

(Received for publication March 6, 1998, and in revised form June 10, 1998)

Cyrille Gallois, Aïda Habib\*, Jiangechuan Tao, Stephanie Moulin, Jacques Maclouf\*, Ariane Mallat, and Sophie Lotersztajn§

From the Unite INSERM 99, Hopital Henri Mondor, 94010 Creteil and the Unite INSERM 348, Institut Foch et de Recherche Circulation Lauboisiere, Hopital Lauboisiers, 75010 Paris, France

During chronic liver diseases, hepatic stellate cells (HSC) acquire an activated myofibroblast-like phenotype and proliferate and synthesize fibrosis components. Endothelin-1 (ET-1), which inhibited the growth of human myofibroblastic HSC, increased the formation of two NF- $\kappa$ B DNA binding complexes; this effect was also observed with tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). The complexes were identified as the p50/p50 and p50/p65 NF- $\kappa$ B dimers. Activation of NF- $\kappa$ B was associated with the degradation of the inhibitory protein I $\kappa$ B- $\alpha$ ; no I $\kappa$ B- $\beta$  was detected. Activation of NF- $\kappa$ B and degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  were prevented by the NF- $\kappa$ B inhibitors sodium salicylate and MG-132. In addition to cyclooxygenase-1 (COX-1), COX-2 is also constitutively expressed in human HSC, and the use of dexamethasone and of SC-58125, a selective COX-2 inhibitor, revealed that COX-2 accounts for basal COX activity. Moreover, COX-2 mRNA and protein were up-regulated by ET-1 and TNF- $\alpha$ , whereas COX-1 was unaffected. Induction of COX-2 and stimulation of COX activity by ET-1 and TNF- $\alpha$  were prevented by sodium salicylate and MG-132, suggesting that activation of NF- $\kappa$ B by either factor is needed for stimulation of COX-2. Finally, SC-58125 and dexamethasone reduced the growth inhibitory effect of ET-1 and TNF- $\alpha$ , indicating that activation of COX-2 is required for inhibition of HSC proliferation. Taken together, our results suggest that NF- $\kappa$ B, by inducing COX-2 expression, may play an important role in the negative regulation of human myofibroblastic HSC proliferation.

Hepatic stellate cells (1) (HSC), also known as Ito cells, fat storing cells, or perisinusoidal cells, play a crucial role in the pathogenesis of liver inflammation and fibrosis (1). Following acute or chronic liver injury, HSC transdifferentiate from a

quiescent cell containing large retinoid droplets to an activated myofibroblast like cell (2). In response to growth factors and cytokines expressed by neighboring cells, activated HSC display enhanced mitogenicity and secrete multiple inflammatory cytokines and components of fibrosis (1). Experimental models of liver injury have shown an increased proliferation of activated HSC (3, 4), and several studies have focused on factors that may limit growth of these cells. In particular, we have shown that binding of endothelin-1 (ET-1) to its G protein-coupled ETB receptor leads to inhibition of human activated myofibroblastic HSC proliferation, following prostaglandin production (5, 6).

NF- $\kappa$ B is an essential regulator of the expression of viral genes, as well as of a number of genes involved in immune, inflammatory, and growth responses (7-9). This family of transcription factors comprise at least five members, p65 (RelA), p50, p52, RelB, and the product of the c-Rel protooncogene, which form homo- or heterodimers and bind to a DNA sequence called the  $\kappa$ B motif. In most cell types, NF- $\kappa$ B is present in the cytosol in an inactive form, as a heterodimer of a 50 kDa (p50) and 65 kDa (p65) subunit, bound to one of the I $\kappa$ B inhibitory proteins. Of the different I $\kappa$ Bs, I $\kappa$ B- $\alpha$  and the more recently identified I $\kappa$ B- $\beta$  have been well characterized. All known activators of NF- $\kappa$ B (cytokines, phorbol esters, growth factors, and viral trans activators) rapidly phosphorylate I $\kappa$ B- $\alpha$ , resulting in its ubiquitination and degradation through a proteasome-dependent pathway. Degradation of I $\kappa$ B- $\beta$  occurs more slowly and is induced by agonists that cause persistent activation of NF- $\kappa$ B (10). The free NF- $\kappa$ B dimer subsequently translocates into the nucleus, where it activates gene transcription (7, 9, 11). Resynthesis of I $\kappa$ B- $\alpha$  is induced by NF- $\kappa$ B and allows resequestration of NF- $\kappa$ B in the cytoplasm, shutting down the NF- $\kappa$ B response (11).

Cyclooxygenases (COX) are the rate limiting enzymes in the biosynthetic pathway of prostaglandins and thromboxanes from arachidonic acid. These enzymes catalyze the conversion of arachidonic acid to PGH<sub>2</sub>, the committed step in prostanoïd synthesis. Two isozymes are found in mammalian tissues: COX-1 and COX-2. The COX-1 isoform is constitutively expressed in most cells, and the COX-2 gene, generally absent in resting cells, is rapidly induced by hormones, cytokines, and tumor promoters (12). Sequencing of the human cyclooxygenase 2 promoter region has revealed the presence of two NF- $\kappa$ B consensus sites, which are important in the induction of the COX-2 mRNA by TNF- $\alpha$  (13).

Since some evidence supports a role of NF- $\kappa$ B in the activation of genes that regulate cell growth arrest (14, 15), in this study, we investigated whether activation of NF- $\kappa$ B may be involved in the negative control of human myofibroblastic HSC proliferation. We show that two factors that inhibit the growth

This work was supported by the INSERM, the Université Paris XII Val de Marne, the Association pour la Recherche sur le Cancer, and the Ligue départementale du Val de Marne de la Recherche contre le Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Correspondence: This paper is dedicated to the memory of Jacques Maclouf, our friend and esteemed collaborator.

\* To whom correspondence should be addressed: Unite INSERM 99, Hopital Henri Mondor, 94010 Creteil, France. Tel.: 33 1 49 81 35 44 fax: 33 1 49 98 09 08; E-mail: loterszt@in3.jussieu.fr.

The abbreviations used are: HSC, hepatic stellate cell; ET, endothelin; G-6-PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; SMC, smooth muscle; COX, cyclooxygenase; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; DTI, dithiothreitol; HIV-1 RT, human immunodeficiency virus long terminal repeat; PMSE, phenylmethylsulfonyl fluoride; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; PGE, prostaglandin E.

of human HSC, ET-1 [5, 6] and TNF- $\alpha$  (the present study) activate NF- $\kappa$ B in these cells. We also report that activation of NF- $\kappa$ B by both factors leads to the induction of cyclooxygenase-2 (COX-2), which mediates inhibition of human HSC growth. All these results suggest that NF- $\kappa$ B, by inducing COX-2 expression, may play an important role in the negative regulation of human myofibroblastic HSC proliferation.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials.** ET-1 and sarafotoxin S6C were from Novabiochem (France), and TNF- $\alpha$  was from Pro-protech (Tebu, France). Sodium salicylate, dexamethasone, and ibuprofen were obtained from Sigma (France). [*meth*-<sup>3</sup>H]Thymidine (25 Ci/mmol) and [<sup>32</sup>P]dATP (5,000 Ci/mmol) were purchased from Amersham Corp. (France). Fetal calf serum was from J. Bio Laboratories (France). Pooled human AB positive serum was supplied by the National Transfusion Center. Antibodies against p65 and I $\kappa$ B  $\alpha$  were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu, France), and antibodies against p50 and I $\kappa$ B  $\beta$  were kindly provided by Robert Weil (URA CNRS 1149, Paris, France). SC 58125 was a gift from Dr. P. C. Isakson (Seattle). MG-132 was from Biomol (Tebu, France). cDNA probe for human COX-2 was a gift from Dr. S. Prescott (University of Lahr), and the human GAPDH cDNA probe was from CLONTECH (Ozyme, France).

**Isolation and Culture of Human Myofibroblastic HSC.** Human HSC in their activated myofibroblastic phenotype were obtained by outgrowth of normal liver explants obtained from surgery of benign or malignant liver tumors. This procedure was performed in accordance with ethical regulations imposed by the French legislation. Explants were incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% serum (5% fetal calf serum, 5% pooled human serum), and exhaustive characterization of these cells has already been published [17]. Cell isolates were routinely characterized by a positive staining for smooth muscle  $\alpha$ -actin, a marker of HSC in their myofibroblastic phenotype. Experiments were performed between passages 3 and 7, without any noticeable difference in results observed with cells obtained from various passages or from various livers. All experiments were performed on confluent cells made quiescent in serum free Waymouth medium over 3 days.

**DNA Synthesis Assay.** DNA synthesis was measured in triplicate wells by incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine, as described previously [6]. Following pretreatment for 60 min with 25  $\mu$ M SC 58125 or 18 h with dexamethasone or vehicle, confluent quiescent cells were restimulated for 30 h with TNF- $\alpha$  or ET-1, in the presence of 5% human serum. [<sup>3</sup>H]Thymidine (0.5  $\mu$ Ci/well) was added during the last 6 h of incubation.

**Preparation of Whole Cell and Nuclear and Cytoplasmic Extracts.** Confluent cells in 12 well plates were made quiescent in serum free Waymouth medium over 3 days. HSC were then incubated for various times with either ET-1 (0.1  $\mu$ M), sarafotoxin S6C (0.1  $\mu$ M), TNF- $\alpha$  (50 ng/ml), or vehicle. When indicated, cells were pretreated either for 30 min with the NF- $\kappa$ B inhibitors sodium salicylate (20 mM) or MG-132 (50  $\mu$ M) or 18 h with dexamethasone (0.1  $\mu$ M). After a wash in ice cold phosphate buffered saline, cells were lysed for 15 min at 4°C in whole cell extraction buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, containing 0.5% Nonidet P-40, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 1 mM EGTA, pH 8, 10 mM NaF, 1 mM vanadate, 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.4 mM DTT). Lysates were centrifuged at 20,000  $\times$  g for 10 min at 4°C, and the supernatants (whole cell extract) were stored at -80°C until use.

Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared as described by Dignam *et al.* [18] with minor modifications. Confluent cells in 10 cm dishes were made quiescent in serum free Waymouth medium over 3 days and were further incubated for various times with the indicated effectors. Cells were then washed two times in 10 ml of ice cold phosphate buffered saline and resuspended in 100  $\mu$ l of buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A). The cells were allowed to swell on ice for 15 min, after which 12.5  $\mu$ l of 10% Nonidet P-40 was added. The tubes were shaken gently and centrifuged at 2,000  $\times$  g for 10 min at 4°C, and supernatants were used as cytoplasmic extracts. The pellet nuclei were re-suspended in 10  $\mu$ l of buffer C (20 mM HEPES, pH 7.9, containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A). After 30 min at 4°C under constant agitation, nuclear debris were centrifuged at 20,000  $\times$  g for 15 min. The supernatant (nuclear extract) was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

**Preparation of DNA Probes for Electrophoretic Mobility Shift Assay.**

Sense and antisense oligomers containing NF- $\kappa$ B-binding sites were annealed, and the double stranded oligomer was radiolabeled with T4 polynucleotide kinase and [<sup>32</sup>P]dATP. The incorporated nucleotides were removed by filtration through a G50 Plus column. Sequences of the oligomers containing the positive regulatory element (P $\kappa$ B- $\kappa$ B sequence) of the I $\kappa$ B-1TR were 5'-ACAGCGAATTCCTCCCTGGGCAATTCACAGG-3' and 60-oligonucleotides containing the  $\kappa$ B responsive element of the COX-2 promoter were 5'-GGAGAGGGGATTCCTCCCTGGG-3'. In some experiments, we also used with similar results an oligomer (Promega) corresponding to the consensus sequence of NF- $\kappa$ B from the  $\alpha$  light chain enhancer. The sequence of the oligomer containing the HNF3 sequence of the HNF1 promoter was 5'-TCGAGCTCCAAAGTAAACAGAGCAGT-3'.

**Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).** Nuclear extracts (5–10  $\mu$ g of protein) were incubated in the binding reaction medium (20 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM KCl, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF) for 15 min at 4°C, followed by a 15-min incubation with 0.5  $\mu$ g of [<sup>32</sup>P]labeled oligonucleotide at room temperature. The DNA-protein complexes were analyzed on a 5% polyacrylamide gel in 0.25 $\times$  Tris borate EDTA electrophoresis buffer. Gels were run at 150 V for 90 min, dried, and autoradiographed. In competition assays, 100-fold of either unlabeled NF- $\kappa$ B, HNF3, or COX-2 oligonucleotides were added to the binding reaction for 15 min before addition of the radiolabeled probe. In the supershift experiments, the binding reaction containing the antibodies were incubated for 1 h at room temperature before adding the radioactive probe.

**RNA Preparation and Northern Blot Analysis.** Confluent cells were made quiescent in serum free Waymouth medium over 3 days and were then stimulated with 0.1  $\mu$ M ET-1 or 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , as indicated. Total RNA was extracted in guanidinium thiocyanate, as described previously [5]. RNA samples (20  $\mu$ g/lane) were denatured, fractionated by electrophoresis through a 1% agarose formaldehyde gel and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell). Prehybridization was performed at 42°C in 5 $\times$  SSU (1 $\times$  SSC, 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate) containing 50% formamide, 1 Denhardt's, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10% dextran, 170  $\mu$ g/ml heparin, and 200  $\mu$ g/ml salmon sperm DNA. cDNA probes for COX-2 and human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were labeled with  $\alpha$ -<sup>32</sup>PdATP using a random priming Ready to Go kit (Pharmacia). Blots were hybridized overnight at 42°C with the [<sup>32</sup>P]labeled probes, washed at 22°C for 1 min with 2 $\times$  SSU, 0.1 $\times$  SDS and once in 0.2 $\times$  SSU, 0.1 $\times$  SDS at 55°C and exposed to x-ray film (Hyperfilm, Amersham) at -70°C. Hybridization signals were quantified by Fuji Bio-imaging analyzer (Fuji, Tokyo, Japan). Results are relative to GAPDH expression, which was used as an internal standard to correct for variations in loading and transfer. Results are expressed as fold over basal COX-2/GAPDH ratio.

**Western Blotting Analysis.** After electrophoresis on a denaturing SDS gel, proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes and blocked for 1 h at room temperature in Tris-His, pH 8, containing 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 5% skim milk. Detection of I $\kappa$ B  $\alpha$ , I $\kappa$ B  $\beta$ , I $\kappa$ B  $\gamma$ , COX-1, 20, and COX-2 [23] was performed after incubation for 2 h at room temperature, with their specific antibody diluted 1:1000, 1:500, 1:2000, and 1:5000 fold, respectively. After 1 h incubation with 2000-fold diluted horseradish peroxidase conjugated anti IgG antibody and extensive washings, immunodetected proteins were visualized by using an enhanced chemiluminescence ECL assay kit (Amersham) according to the manufacturer's instructions.

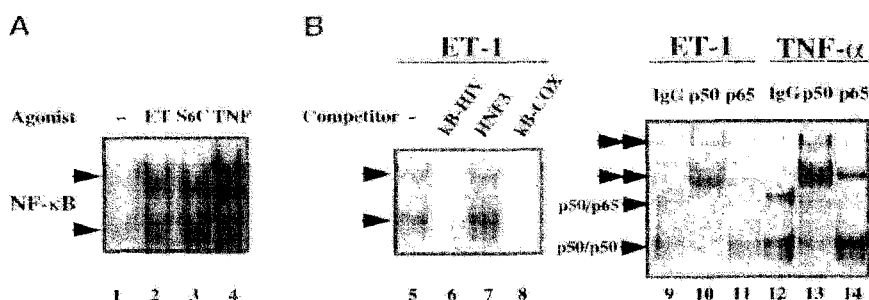
**Cyclooxygenase Activity and PGE<sub>2</sub> Release.** Confluent cells were made quiescent in serum free Waymouth medium over 3 days and were then pretreated for 60 min with either 25  $\mu$ M SC 58125, 25  $\mu$ M ibuprofen, 20 mM sodium salicylate, 50  $\mu$ M MG-132 or 18 h with 0.1  $\mu$ M dexamethasone. Cells were further stimulated for the time indicated with 0.1  $\mu$ M ET-1 or 50 ng/ml TNF- $\alpha$ . When indicated, 10  $\mu$ M arachidonic acid freshly diluted in 0.1% bovine serum albumin was added for 30 min at the end of incubation. Release of PGE<sub>2</sub> in the medium was assayed as described previously [6].

**Assay of Protein Concentration.** Protein concentration was determined by Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, France) according to the manufacturer's instructions.

**Statistics.** Results are expressed as mean  $\pm$  SE of *n* experiments. Statistical analysis was determined by Student's unpaired *t* test with *p* < 0.05 considered significant.

#### RESULTS

**ET-1, the ETB Receptor Agonist Sarafotoxin S6C, and TNF- $\alpha$  Activate NF- $\kappa$ B in Human Myofibroblastic HSC.** Nuclear proteins isolated from ET-1 or TNF- $\alpha$  treated human



**Fig. 1. Activation of NF- $\kappa$ B by ET-1, sarafotoxin S6C, and TNF- $\alpha$  in human myofibroblastic HSC: specificity and characterization of the NF- $\kappa$ B-DNA complexes involved.** *A*, EMSA of NF- $\kappa$ B in nuclear extracts of human HSC treated with ET-1, S6C, or TNF- $\alpha$ . Nuclear extracts were prepared from HSC made quiescent by incubation in serum free medium over 3 days and further incubated for 60 min in the absence (*lane 1*) or in the presence of 0.1  $\mu$ M ET-1 (*lane 2*), 0.1  $\mu$ M S6C (*lane 3*), or 50 ng/ml TNF- $\alpha$  (*lane 4*). EMSA was performed as described under "Experimental Procedures," using a radiolabeled probe containing the  $\kappa$ B motif of the HIV LTR promoter. *B*, competition with specific and non-specific oligonucleotides. Nuclear extracts from ET-1 treated cells were assayed for NF- $\kappa$ B activity, as described in *A* in the absence (*lane 5*) or presence of an excess of unlabeled oligonucleotide containing the  $\kappa$ B motif of the HIV LTR promoter (*lane 6*), the HNF3 sequence (*lane 7*), or the  $\kappa$ B motif of the human COX-2 promoter (*lane 8*). *C*, characterization of the complexes activated by ET-1 and TNF- $\alpha$ . Nuclear extracts from ET-1 (*lane 9*), TNF- $\alpha$  (*lane 12*), or untreated HSC were incubated for 1 h with either 2  $\mu$ g/ml control rabbit IgG (*lanes 9* and *12*), of p50 antibodies (IR-*lanes 10* and *13*), or of p65 antibody (*lanes 11* and *14*). EMSA was performed as described in *A*. Antisera specificity, produced by binding of the p50 and p65 antibody, are identified by double arrowsheads. The autoradiograms shown are representative of three experiments.

myofibroblastic HSC were analyzed in electrophoretic mobility gel shift assays (EMSA) using a radiolabeled DNA probe containing the  $\kappa$ B sequence of the HIV LTR promoter. As shown in Fig. 1*A* (*lane 2*), ET-1 increased the formation of two NF- $\kappa$ B-DNA binding complexes. This activation was also observed with the ETB receptor agonist sarafotoxin S6C (Fig. 1*A*, *lane 3*). TNF- $\alpha$ , which activates NF- $\kappa$ B in numerous cell types [7, 39], increased DNA binding complexes with profiles similar to ET-1 (Fig. 1*A*, *lane 4*).

The specificity and composition of the complexes stimulated by ET-1 and TNF- $\alpha$  were next examined. Competition experiments, performed with an excess of unlabeled nucleotide corresponding either to the HIV LTR  $\kappa$ B or to one of the  $\kappa$ B-responsive elements of the human COX-2 (E7), eliminated the binding activity of the labeled probe (Fig. 1*B*, *lanes 6* and *8*). In contrast, addition of the same excess of an unlabeled oligonucleotide containing the unrelated HNF3 consensus sequence had no effect (Fig. 1*B*, *lane 7*). These data indicate that the DNA binding activity increased with ET-1 and TNF- $\alpha$  is specific for the  $\kappa$ B motif. Supershift experiments using antibodies to each of the NF- $\kappa$ B/Rel proteins were performed to identify the proteins present in the NF- $\kappa$ B binding complexes. Incubation of nuclear extracts from ET-1 treated cells with p50 antibodies caused a supershift of the two complexes, indicating that p50 is present in both DNA-protein complexes (Fig. 1*B*, *lane 10*). The anti-p65 antibody had no effect on the faster DNA-protein complex, whereas it supershifted the slower migrating complex (Fig. 1*B*, *lane 11*). Antibodies to p52, c-Rel, and RelB had no effect (data not shown). Similar supershifts were obtained upon incubation of nuclear extracts from TNF- $\alpha$  treated cells with the p50 and p65 antibodies (Fig. 1*B*, *lanes 13* and *14*), indicating that ET-1 and TNF- $\alpha$  induce the formation of the same binding complexes. The effect of ET-1 was time dependent (Fig. 2*A*), being initiated after 15 min and persisting for 3 h. Activation of NF- $\kappa$ B by TNF- $\alpha$  occurred more rapidly and was observed as soon as 2–5 min after addition of the cytokine (Fig. 2*B*).

Taken together, these results indicate that ET-1 and TNF- $\alpha$  increase the formation of two NF- $\kappa$ B binding complexes in human myofibroblastic HSC, one containing the p50/p50 homodimer and the other the p50/p65 heterodimer.

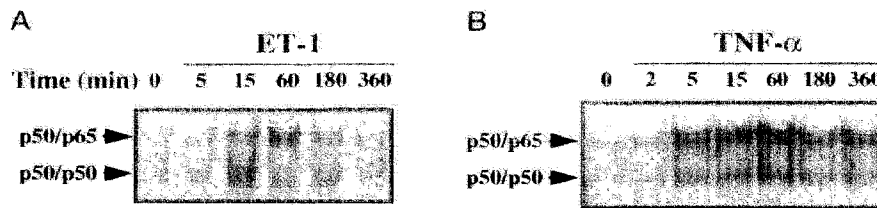
**ET-1 and TNF- $\alpha$  induce the degradation of I $\kappa$ B  $\alpha$  in Human Myofibroblastic HSC.** We studied I $\kappa$ B regulation by ET-1 and TNF- $\alpha$  in the cytosolic fraction of human HSC treated with ET-1 or

TNF- $\alpha$  for various times. The levels of I $\kappa$ B  $\alpha$  were analyzed by Western blot analysis using a specific I $\kappa$ B  $\alpha$  antibody. A protein with an expected size of 37 kDa was detected in cytosolic extracts of unstimulated cells (Fig. 3, *A* and *B*). Treatment of human HSC with ET-1 resulted in degradation of I $\kappa$ B  $\alpha$  after 15 min, in keeping with the time course of NF- $\kappa$ B activation. Total resynthesis was observed upon 3 h of treatment (Fig. 3*A*). TNF- $\alpha$ -induced degradation of I $\kappa$ B  $\alpha$  was observed within 2 min and was total after 5 min (Fig. 3*B*), in agreement with the rapid activation of NF- $\kappa$ B by TNF- $\alpha$  (Fig. 2*B*). Since resynthesis of I $\kappa$ B  $\alpha$  occurred when activation of NF- $\kappa$ B was maintained, we investigated whether degradation of I $\kappa$ B  $\beta$  could account for this prolonged activation of NF- $\kappa$ B. However, no signal corresponding to the 47 kDa protein I $\kappa$ B  $\beta$  was found in untreated human HSC, whereas I $\kappa$ B  $\beta$  was detected in untreated Jurkat cells taken as control (Fig. 3*C*).

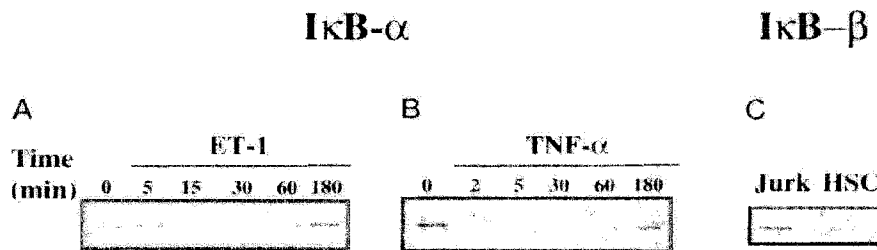
These results demonstrate that both ET-1 and TNF- $\alpha$  induce the degradation of I $\kappa$ B  $\alpha$ , an event that is associated with the increased formation of NF- $\kappa$ B complexes. The activation of NF- $\kappa$ B does not involve I $\kappa$ B  $\beta$ .

**ET-1 and TNF- $\alpha$  Up-regulate Cyclooxygenase 2 (COX-2) in Activation of NF- $\kappa$ B in Human Myofibroblastic HSC.** We have previously shown that the growth inhibitory effects of ET-1 are mediated by prostaglandins in human myofibroblastic HSC [6]. Therefore, we next explored whether ET-1 and TNF- $\alpha$  regulate COX-2 in these cells, through the NF- $\kappa$ B signal in the promoter of this gene [13].

Endothelin-1 caused a rapid and sustained up-regulation of COX-2 mRNA, which was maximally increased by 4-fold after 15 min and remained elevated for at least 18 h (Fig. 4*A*). The induction of COX-2 mRNA was associated with an increase in COX-2 protein, observed after 4 h stimulation with ET-1 and lasting for at least 18 h (Fig. 4*B*). Activation of COX-2 protein expression was reproduced by the ETB agonist sarafotoxin S6C (see Fig. 5*B*), and was totally blocked by the non-selective ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> antagonist PD-148931 (not shown). In contrast, the selective ET<sub>A</sub> antagonist BQ123 did not affect COX-2 stimulation by ET-1 (not shown). Finally, pertussis toxin treatment did not modify ET-1-induced COX-2 expression (not shown). Tumor necrosis factor- $\alpha$  also up-regulated COX-2 mRNA and protein expression with a time course similar to that of ET-1 (Fig. 4*A* and *B*), whereas COX-2 expression was not affected (Fig. 5*C*). It should be noted that, in contrast to many other cell types [12, 21, 23], COX-2 protein is expressed in untreated HSC (Figs. 4



**Fig. 2. Kinetics of NF- $\kappa$ B activation by ET-1 and TNF- $\alpha$  in human myofibroblastic HSC.** Nuclear extracts were prepared from HSC in triplicate by incubation in serum free medium over 3 days and further incubated for various times with 0.1  $\mu$ M ET-1 (A) or 50 ng/ml TNF- $\alpha$  (B). EMSA was performed as described under "Experimental Procedures" using a radiolabeled probe containing the  $\kappa$ B motif of the HLA-1 promoter. The autoradiogram shown is representative of four experiments.



**Fig. 3. Kinetics of I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation by ET-1 and TNF- $\alpha$  in human myofibroblastic HSC.** Cytoplasmic extracts were obtained from confluent HSC made quiescent by incubation in serum free medium over 3 days and further incubated for various times with 0.1  $\mu$ M ET-1 (A) or 50 ng/ml TNF- $\alpha$  (B). Western blot measurements of I $\kappa$ B- $\alpha$  in the cytoplasmic extracts were performed as described under "Experimental Procedures" using a specific I $\kappa$ B- $\alpha$  antibody. C shows a Western blot of cytoplasmic extracts obtained from untreated HSC and Jurk cells and was revealed with a specific I $\kappa$ B- $\beta$  antibody (18).

and 5).

We investigated whether NF- $\kappa$ B is involved in up-regulation of COX-2 by ET-1 and TNF- $\alpha$  by means of two NF- $\kappa$ B inhibitors: the proteasome inhibitor MG-132 (23, 24) and the anti-inflammatory compound sodium salicylate (25). Both NF- $\kappa$ B inhibitors effectively reduced activation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation by TNF- $\alpha$  (Fig. 5A) and ET-1 (not shown). Sodium salicylate and MG-132 blunted activation of COX-2 mRNA (Fig. 5A), COX-2 protein (Fig. 5B) by ET-1, SC, and TNF- $\alpha$ . The NF- $\kappa$ B inhibitors also prevented activation of COX activity, measured as PGE<sub>2</sub> released in the presence of exogenously added arachidonic acid (Fig. 6A). The expression of COX-1 protein was unaffected by these treatments (Fig. 5C). Finally, ibuprofen, an anti-inflammatory compound that inhibits cyclooxygenase (26, 27) without affecting NF- $\kappa$ B (25) had no effect on the induction of COX-2 protein expression (not shown).

COX activity was also measured as PGE<sub>2</sub> released from endogenous arachidonic acid. As shown in Fig. 6B, in these conditions, ET-1 also caused a 3-fold increase in PGE<sub>2</sub> release, which was prevented by SC-58125, an inhibitor of COX-2 activity (28) (Fig. 6B). Similar results were obtained when assessing the effect of SC-58125 on stimulation of COX activity by ET-1 or TNF- $\alpha$  in the presence of exogenous arachidonic acid (not shown).

We also used dexamethasone, which inhibits COX-2 transcription by blocking activation of the transcription factors NF- $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B present in the COX-2 promoter and also by inducing a rapid de-stabilization of COX-2 mRNA (12). It should be noted that, as described in recent studies (29), dexamethasone treatment did not modify either I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation or NF- $\kappa$ B DNA binding activation by ET-1 and TNF- $\alpha$  (not shown), suggesting direct interference of dexamethasone with the transcriptional potential of NF- $\kappa$ B (29). Dexamethasone reduced ET-1 stimulated COX-2 protein expression to levels below that of untreated cells (Fig. 6B inset). Stimulation of PGE<sub>2</sub> release by ET-1 was also abolished following treatment with dexamethasone (Fig. 6B). Finally, ibuprofen, a COX-1/

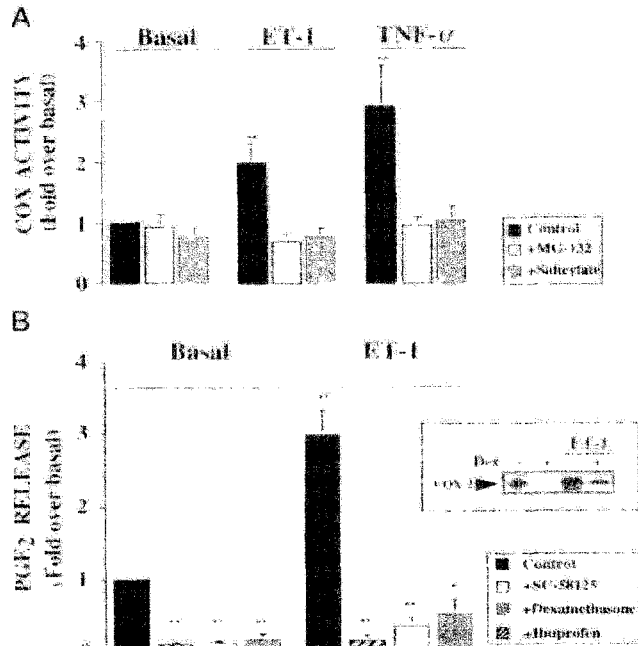
COX-2 inhibitor reduced stimulation of similar release by ET-1 (Fig. 6B) to levels comparable to those obtained with dexamethasone and SC-58125. It should be stressed that basal PGE<sub>2</sub> release (Fig. 6B) and basal COX activity (not shown) were dramatically reduced by dexamethasone and by the selective COX-2 inhibitor SC-58125, in keeping with the basal expression of COX-2 in human HSC (Figs. 4 and 5). Moreover, ibuprofen had a similar inhibitory effect on basal PGE<sub>2</sub> release than the COX-2 inhibitors (Fig. 6B). These results indicate that the major part of PGE<sub>2</sub> released in basal conditions derives from COX-2 activity.

Altogether these results indicate that not only COX-1 but also COX-2 is constitutively expressed in human myofibroblastic HSC and that the COX-2 isoform accounts for the constitutive COX activity. They also demonstrate that in human HSC, ET-1 and TNF- $\alpha$  up-regulate COX-2, and this induction involves NF- $\kappa$ B activation.

**The Inhibitory Cyclooxygenase 2 (COX-2) Mediates the Growth Inhibitory Effect of ET-1 and TNF- $\alpha$  in Human Myofibroblastic HSC.** We have shown that ET-1 inhibits the growth of human myofibroblastic HSC (5, 6), but the effect of TNF- $\alpha$  has not yet been investigated. As shown in Fig. 7B, TNF- $\alpha$  dose-dependently inhibited the growth of human myofibroblastic HSC. This contrasts with the autogenic effect of the cytokine reported in rat HSC (20). We next investigated whether induction of COX-2 is involved in the regulation of human myofibroblastic HSC proliferation. Addition of SC-58125 or dexamethasone to serum-stimulated cells strongly reduced the antiproliferative effects of ET-1 (Fig. 7A) and TNF- $\alpha$  (Fig. 7B). These results suggest that activation of COX-2 is a key event in the pathway leading to inhibition of HSC proliferation by ET-1 and TNF- $\alpha$ .

It should be noted that blocking COX-2 activity with either SC-58125 or dexamethasone enhances [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation into DNA of serum-stimulated cells (see legend to Fig. 7). Accordingly, serum by itself enhances PGE<sub>2</sub> production (not shown), which in turn inhibits myofibroblastic HSC growth (6). Therefore, although mitogenic, serum also generates negative

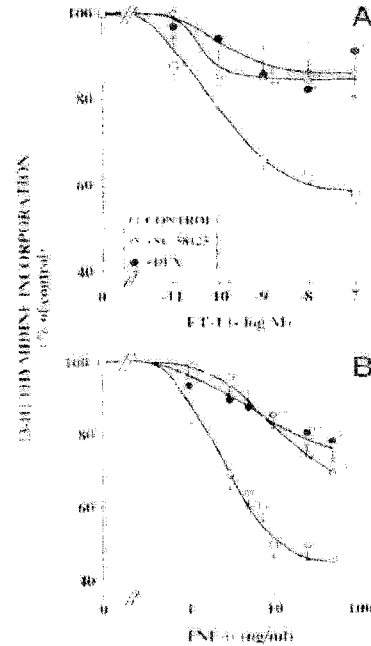




**Fig. 6. Effects of NF- $\kappa$ B inhibitors and of COX inhibitors on cyclooxygenase activity stimulated by ET-1 and TNF- $\alpha$ .** *A*, effects of NF- $\kappa$ B inhibitors on COX activity. HSC were made quiescent by incubation in serum free medium for 24 days and further pretreated for 60 min with MG-132 (30  $\mu$ M) or 30 min with sodium salicylate (20  $\mu$ M) as described in Fig. 5, before treatment for 6 h with 0.1  $\mu$ M ET-1 and 50 ng/ml TNF- $\alpha$ . At the end of incubation, 10  $\mu$ M of aspirin or acid was added for 30 min, and PGE<sub>2</sub> released in the supernatants was measured as described under "Experimental Procedures." Basal PGE<sub>2</sub> release was set as 100% and represents the mean  $\pm$  SE of five experiments and each value is expressed as percent of respective control.  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ;  $p < 0.01$ , versus control basal levels. *B*, effects of COX inhibitors on PGE<sub>2</sub> release. Confluent quiescent cells were pretreated with either 0.1  $\mu$ M dexamethasone for 18 h or for 60 min with either 25  $\mu$ M SC-58125 or 25  $\mu$ M ibuprofen and further incubated for 6 h in the absence or presence of 0.1  $\mu$ M ET-1. PGE<sub>2</sub> released in the supernatants was measured as described under "Experimental Procedures." Bar PGE<sub>2</sub> release was set as 100% and represents the mean  $\pm$  SE of three experiments and each value is expressed as percent of respective control.  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ;  $p < 0.01$ , versus control basal levels. *Inset*, effect of dexamethasone on COX 2 protein expression. Western blot analysis of a total cell extract was performed as described in Fig. 4. Results are the mean of five experiments.

has barely been reported [32, 36]. The finding that ET-1 and TNF- $\alpha$  activate NF- $\kappa$ B in human myofibroblastic HSC constitutes another example of convergent pathways activated by growth inhibitory signals provided by cytokines and G-protein coupled receptors. The signaling cascade activated upstream of I $\kappa$ B remains to be determined but may involve one of the recently identified I $\kappa$ B kinases [37, 40].

Among the possible target genes of NF- $\kappa$ B in human myofibroblastic HSC, we focused on type 2 cyclooxygenase, since the promoter of this gene contains a NF- $\kappa$ B consensus site in its promoter region [14], and because we have demonstrated that inhibition of human HSC growth involve proinflammatory production. However, the presence and regulation of COX isoforms have not been previously documented in HSC. Our results demonstrate that the two COX isoforms, COX 1 and COX 2, are present in human HSC. As described in other cells, COX 1 is constitutively expressed in human HSC but in contrast to many other cell types, constitutive HSC also express the COX 2 protein isoform. Activation of COX activity by ET-1 and TNF- $\alpha$  is reduced by dexamethasone and by the selective



**Fig. 7. Dexamethasone and SC-58125 reduce the growth inhibitory effects of ET-1 and TNF- $\alpha$ .** Confluent cells were made quiescent by incubation in serum free medium over 1 day, and further pretreated for 18 h with 0.1  $\mu$ M dexamethasone or for 60 min with 25  $\mu$ M SC-58125, at the conditions described in Fig. 6. Cells were then stimulated with 25  $\mu$ M aspirin, together with varying concentrations of ET-1 (*A*) and TNF- $\alpha$  (*B*), and proliferation [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation into DNA was measured as described under "Experimental Procedures." Results represent the mean  $\pm$  SE of three experiments and each value is expressed as percent of respective control. 32 (30)  $\pm$  19% (100), dexamethasone, 56.8(47)  $\pm$  13.7% (pm SC-58125), 43.8(76)  $\pm$  18% (100),  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ;  $p < 0.01$ , versus control.

COX/2 inhibitor SC-58125 to levels comparable to that obtained with the COX 1/COX 2 inhibitor ibuprofen. These results, together with the fact that ibuprofen, SC-58125 and dexamethasone dramatically reduce basal COX activity indicate that, in human HSC, the major part of PGE<sub>2</sub> levels found in basal conditions derives from COX 2 activity. Therefore, COX 2 accounts for the constitutive COX activity. The role of the "transient" COX 1 isoform in human HSC remains to be explored, in particular in view of recent results showing that COX 1 may behave as a delayed response gene [1]. The COX 2 isoform present in human HSC is also inducible, as shown by the rapid increase of its mRNA and protein expression in response to ET-1, saraloxin S60, and TNF- $\alpha$ . The equal potency of ET-1 and saraloxin S60 to activate COX 2 (Fig. 7) and the lack of effect of the ETB antagonist on ET-1-induced COX 2 expression (not shown) indicates that the ETB receptor is involved. Upregulation of COX 2 mRNA by these factors is sustained and is associated with a long-lasting increase in protein activity. Induction of COX 2 by ET-1 and TNF- $\alpha$  is inhibited by two different classes of NF- $\kappa$ B blockers: the proteasome inhibitor MG-132, which blocks I $\kappa$ B degradation (23, 24), and the anti-inflammatory compound sodium salicylate (25), which is a potent inhibitor of NF- $\kappa$ B, with being ineffective on purified cyclooxygenase activity (26). The  $\kappa$ -NF- $\kappa$ B inhibitors do not affect COX 1 protein expression. These results, which indicate that upregulation of COX 2 requires NF- $\kappa$ B activation, are consistent with the presence of an NF- $\kappa$ B binding element in the promoter of the COX 2 gene [12], which is absent from that of the COX 1 gene [12]. Our data are in line with recent observations implicating NF- $\kappa$ B in COX 2 mRNA down regulation

kin-1, TNF- $\alpha$ , or lipopolysaccharide by means of p65 antisense or NF- $\kappa$ B inhibitors (13, 42–44).

Results from several studies indicate that COX-2 may be involved in the regulation of cell proliferation. Whereas most reports support a role of COX-2 in mitogenesis (45, 46), recent data have shown that COX-2 may also be involved in growth arrest (47, 48). Interestingly, Bornfeldt *et al.* (47) have recently reported that overexpression of COX-2 in human smooth muscle cells is associated with a marked inhibition of proliferation. In human HSC, blunting COX-2 activity with dexamethasone and with the selective COX-2 inhibitor SC-58125 blocks the growth inhibitory effect of ET-1 and TNF- $\alpha$ , indicating that activation of COX-2 by either factor is a key event in the pathway leading to inhibition of HSC proliferation. We have previously shown that rapid production of prostaglandins leads to an increase in cyclic AMP and to the blockade of early events preceding human HSC proliferation such as mitogen-activated protein kinase activation (6). Our preliminary results suggest that this rapid production of prostaglandins would be ensured by stimulation of the COX-2 activity expressed in resting myofibroblastic HSC.<sup>5</sup> In contrast, induction of COX-2 mRNA and protein by ET-1 and TNF- $\alpha$  would result in a more sustained production of prostaglandins and could be involved in the inhibition of more distal events, such as regulation of ET-1 receptors<sup>2</sup> and regulation of cell cycle components (49).

As described for COX-2, activation of NF- $\kappa$ B has generally been linked to mitogenesis (50–53), but recent data indicate that induction of NF- $\kappa$ B is also associated with growth arrest and cellular differentiation (14, 16). In particular, NF- $\kappa$ B stimulates the tumor suppressor gene p53 (16), and p65 interacts with the cell cycle inhibitor p21<sup>WAF1</sup> (15). Also, overexpression of the NF- $\kappa$ B member c-Rel arrests the proliferation of HeLa cells by interacting with p21<sup>WAF1</sup> (14). Because of the cytotoxic effect of NF- $\kappa$ B inhibitors during prolonged cell growth experiments, the present study does not provide a direct demonstration for a role of NF- $\kappa$ B in the negative regulation of human HSC growth. Nevertheless, it is tempting to speculate that NF- $\kappa$ B, by up-regulating COX-2 in response to ET-1 and TNF- $\alpha$ , plays a major role in the negative regulation of human myofibroblastic HSC growth.

The physiopathological consequences of our findings in the context of liver fibrosis remains to be determined. On the one hand, the consensus sequence for NF- $\kappa$ B is present in the promoter of several genes activated by TNF- $\alpha$ , which are involved in the inflammatory process associated with the development of liver fibrosis. For example, monocyte chemoattractant protein-1 or intercellular adhesion molecule-1 are expressed in rat HSC and up-regulated by TNF- $\alpha$  (55, 56), however, TNF- $\alpha$  is mitogenic for rat HSC (30). On the other hand, prostaglandins E are antifibrogenic in an *in vivo* model of liver fibrosis (57), and *in vitro* studies show that in rat HSC, prostaglandins E inhibit both collagen I production (57) and cell proliferation (58). These findings, together with the fact that ET-1 and TNF- $\alpha$  inhibit the growth of human myofibroblastic HSC, following NF- $\kappa$ B-dependent COX-2 induction, would be in favor of a negative regulatory role of this pathway in liver fibrogenesis.

In summary, we show here that two growth inhibitory peptides for human myofibroblastic HSC, ET-1 via its ETB receptors and TNF- $\alpha$ , induce NF- $\kappa$ B dependent up-regulation of COX-2, resulting in inhibition of HSC proliferation. These results suggest that NF- $\kappa$ B may play an important role in the negative regulation of human myofibroblastic HSC proliferation.

C. G. Gillet, J. Manichanh, A. Habib, A. Mollat, J. Macleod, and S. Lohrengel, unpublished results.

**Acknowledgments.** We thank J. Hamoune and F. Pecker for permanent support, Y. Lapereche and U. Pavotche for critical reading of the manuscript, and E. Grandvaillers for expert secretarial assistance. We are greatly indebted to Anne Marie Proxay for the preparation of human HSC, Marie Korner for help in the initiation of this project, and M. Goodhardt for helpful discussions. We also acknowledge R. Weil (CNRs U49, Paris, France) for the gift of antibodies against I $\kappa$ B $\beta$  and against NF- $\kappa$ B p50 protein, St. Prescott University of Utah for the cDNA probe against human COX-2, and Dr. P. C. Isaksson (Sandoz) for SC-58125.

## REFERENCES

1. Friedman S L (1993) *N Engl J Med* **328**, 1828–1835.
2. Schmitt-Grohe, A., Kruger, S., Buchold, F., Gubiani, G., and Frank, H. (1991) *Am J Pathol* **138**, 1235–1242.
3. Mansueti, R., Beccarello, A. M., Benedetti, A., Proxay, A., Trizoni, F., and Delgado, F. (1992) *J Hepatol* **15**, 361–366.
4. Coetzee, A., Lacou, F. M., De Bleser, P., and Wessels, E. (1993) *Histochem J* **193**, 1292.
5. Mollat, A., Fouassier, L., Proxay, A. M., Serradell, Le Gal, C., Rautava, B., Rosabianchi, J., Dharmony, D., Jourd'heuil, C., Mollat, P., and Lohrengel, S. (1995) *J Clin Invest* **96**, 42–49.
6. Mollat, A., Proxay, A. M., Serradell, Le Gal, C., Rautava, B., Gamba, C., Brenner, D. A., Bradham, C., Macleod, J., Jourdeuil, V., Fouassier, L., Dharmony, D., Mollat, P., and Lohrengel, S. (1996) *J Clin Invest* **98**, 2771–2778.
7. Banerjee, P. A., and Baltimore, D. (1996) *Cell* **87**, 15–20.
8. Barnes, P. J., and Yuan, M. (1997) *N Engl J Med* **336**, 1666–1671.
9. Thomas, D., and Manolis, T. (1995) *Cell* **80**, 529–532.
10. Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdman, R., Bruggs, B., Touquet, P., and Gough, S. (1993) *Cell* **80**, 573–582.
11. Ismail, A. (1997) *Trends Genet* **13**, 303–305.
12. Smith, W. K., Garavito, R. M., and DeVore, D. E. (1996) *J Biol Chem* **271**, 3353–3359.
13. Yamamoto, K., Adachi, T., Ueda, N., and Yamamoto, S. (1995) *J Biol Chem* **270**, 4125–4129.
14. Rash, J., Zeng, W. X., and Gelinas, C. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 6526–6530.
15. Perkins, N. D., Frazier, J. K., Bell, J. C., Liang, R., Benfante, D. H., and Spector, G. A. (1997) *Science* **275**, 523–527.
16. Wu, H., and Kazanietz, A. (1993) *J Biol Chem* **268**, 20067–20073.
17. Wu, K. M., Charlotte, F., Mollat, A., Charreau, D., Martin, X., Mollat, P., Proxay, A. M., Dharmony, D., and Rosabianchi, J. (1993) *Hepatology* **18**, 147–151.
18. Duggan, J. D., Leshkevitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983) *Nucleic Acids Res* **11**, 1477–1489.
19. Wek, R., Lawrence, W., and Israel, A. (1997) *J Biol Chem* **272**, 9942–9949.
20. Creminon, C., Frébert, Y., Habib, A., Mollat, J., Prod'homme, P., and Gressin, I. (1995) *Biochim Biophys Acta* **1254**, 333–340.
21. Habib, A., Creminon, C., Frébert, Y., Gressin, I., Prod'homme, P., and Mollat, J. (1993) *J Biol Chem* **268**, 23148–23154.
22. Koster, M., Creminon, C., Thomas, P. J., and Yuan, M. J. (1994) *J Biol Chem* **269**, 22571–22580.
23. Pamboukian, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. I., and Manolis, T. (1991) *Cell* **78**, 773–783.
24. Trautman, E. B., Wilk, S., and Banerjee, P. A. (1994) *EMBO J* **13**, 5443–5449.
25. Kopp, E., and Ghosh, S. (1994) *Science* **265**, 956–959.
26. Mitchell, J. A., Akita, S., Ghosh, P., Thammavong, C., Flower, R. J., and Vigna, J. R. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11893–11897.
27. Bhatia, J. C. (1997) *Toxicol Pharmacol Sci* **18**, 30–34.
28. Saha, K., Zhang, Y., Gada, K., Hatanaka, S., Masuyama, J., Peckham, W., Ueda, K., and Isaksson, P. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12933–12937.
29. De Groot, K., Schmidt, M. L., Vanden Berghe, W., Planchet, S., Piers, W., and Baeghe, G. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13591–13599.
30. Matsuda, M., Pham, X. T., and Terakawa, H. (1989) *Hepatology* **9**, 71–78.
31. Lee, K. S., Buck, M., Hougham, K., and Chalkler, M. (1995) *J Clin Invest* **96**, 1461–1468.
32. Pan, Z. R., Zhai, B. L., Tang, C. F., Proxay, A. M., Borenstein, D. D., and Vignatelli, B. (1996) *J Clin Invest* **98**, 2042–2049.
33. Mollat, P., Lohrengel, S., Bellacane, N., Pan, Z. R., Proxay, A. M., Proxay, J., Van Obberghen-Schilling, E., Rossi, B., and Adlinger, P. (1994) *J Biol Chem* **269**, 5511–5517.
34. Li, J., and Byers, A. R. (1996) *Mol Endocrinol* **10**, 252–264.
35. Kojima, K., Pan, Z., Han, J., Herbert, J. M., Chalkler, R. J., and Vignatelli, B. (1995) *J Biol Chem* **270**, 14978–14984.
36. Borenstein, D. D., Pan, Z. K., Proxay, A. M., and Vignatelli, B. (1997) *J Biol Chem* **272**, 7995–8001.
37. Ohtsuka, J. A., Hayakawa, M., Godwin, D. M., Zhai, B., and Kahn, M. F. (1997) *Nature* **388**, 548–551.
38. Mollat, P., Zhu, H., Murray, B. W., Siewczynski, A., Brenner, B. L., Li, J., Young, D. B., Bhatia, M., Mann, M., Martin, X., and Rock, A. (1997) *Science* **278**, 860–866.
39. Li, J. A. (1994) *Nature* **368**, 49–50.
40. Watanabe, T. D., Chin, K. C., Rhee, M., and Ghosh, S. (1996) *Science* **278**, 866–869.
41. Kaplan, M. D., Chacko, J. A., and O'Connell, M. K. (1997) *J Biol Chem* **272**, 18334–18347.
42. Newton, R., Herbert, L. M., Bergmann, M., Adcock, I. M., and Bernini, P. F. (1993) *Respiratory Research* **2**, 177–181.
43. D'Amico, E., Lavigne, T., Bombola, E., Sarracini, L. D., Rossi, M., and Caporaso, R. (1996) *FASEB J* **10**, 117–128.
44. Isaksson, P. C., Isaksson, J. R., Ahrenfeldt, K., Chalkler, M., Mollat, J.

- and Mitchell T. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31396-31501.
43. Sheng G. C., Shao J., Sheng H., Houston E. B., Isakson P. C., Morrice, J. D., Coffey R. J., Jr., DuBois R. N., and Beutlichamp R. D. (1997) *Gastroenterology* **113**, 1883-1891.
  44. Martinez J., Sanchez J., and Morera J. J. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **773**, C166-C171.
  45. Borstoid K. E., Campbell J. S., Koyama H., August G. M., Eshe C. C., Ramos E. W., Krebs E. G., and Ross R. (1997) *J. Clin. Invest.* **100**, 873-883.
  46. DuBois, R. N., Shao J., Jang M., Sheng H., and Beutlichamp, R. D. (1996) *Cancer Res.* **56**, 711-727.
  47. Kato J. Y., Matsushita M., Poljak K., Masuguro J., and Sherr C. J. (1991) *Cell* **70**, 487-496.
  48. Saito, R. A., Abraham, N. G., and Lim J. O. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 2832-2837.
  49. Balayan A. S., Jr., Azizkhani J. C., Jemshidi, D. E., Beg, A. A., and Coody, J. R. (1991) *Mol. Cell. Biochem.* **11**, 4943-4951.
  50. Bellas, R. E., Liu, J. S., and Simon-Loriac, G. L. (1995) *J. Clin. Oncol.* **13**, 2521-2527.
  51. Iwano, K., Page, S., Riegler, G., Bartsch, A., Brädel, R., Kung'u, J. C., Page, M., Kahl-Schmid, C., Bacciaro, P. A., and Neumaier, D. (1996) *J. Clin. Oncol.* **14**, 1715-1722.
  52. Dickson, C. S., Perkins, N. D., Leung, K., Agostoni, A. B., and Nabel, G. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18836-18840.
  53. Marra, F., Choudhury, A. G., and Ashford, H. B. (1996) *J. Clin. Invest.* **98**, 1218-1230.
  54. Hellebrandt, Wang, S. C., Fukusawa, H., Brenner, D. A., and Rippe, R. A. (1995) *Hepatology* **24**, 639-644.
  55. Beno, D. W., Espinal, R., Edelman, B. M., and Davis, B. H. (1993) *Biotechnology* **11**, 707-714.
  56. Beno, D. W., Rupp, E. K., and Davis, B. H. (1991) *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 292-300.

## **DISCUSSION**

Dans cet article, nous avons montré que l'ET-1 et le TNF- $\alpha$ , deux facteurs inhibant la prolifération des CEF myofibroblastiques, stimulent la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau. De plus, l'activation de NF- $\kappa$ B par l'ET-1 et le TNF- $\alpha$  conduit à l'induction du gène de la COX-2 et à l'inhibition de la prolifération des CEF myofibroblastiques. Ces résultats mettent en évidence le rôle central de la COX-2, relayé par NF- $\kappa$ B, dans l'inhibition de la prolifération des CEFm.

### ***Activation et induction de la COX-2 en réponse à l'ET-1 et au TNF- $\alpha$ dans les CEFm***

Le rôle de la COX-2 dans la régulation positive ou négative de la prolifération cellulaire a fait l'objet de nombreuses études. De nombreuses publications montrent un rôle de la COX-2 dans les effets mitogènes (Martinez, Sanchez & Moreno, 1997; Sheng *et al.*, 1997). Cependant, la COX-2 pourrait être impliquée dans l'inhibition de la croissance des cellules (DuBois *et al.*, 1996). En effet, la surexpression de la COX-2 dans les cellules musculaires lisses humaines provoque l'arrêt de leur prolifération (Bornfeldt *et al.*, 1997). Dans les CEF myofibroblastiques humaines, le blocage de l'activité COX-2 par la dexaméthasone ou le SC-58125 bloque l'effet antiprolifératif de l'ET-1 et du TNF- $\alpha$  (figure 7). Ces résultats montrent que l'activation de la COX-2 par ces deux peptides est un évènement clé dans l'inhibition de la prolifération des CEF myofibroblastiques humaines. Nos résultats constituent la première mise en évidence de la présence constitutive des deux isoformes de COX dans les CEF myofibroblastiques humaines. Comme décrit le paragraphe « les cyclooxygénases », la COX-2 est une enzyme inductible qui n'est généralement pas exprimée constitutivement dans des cellules non stimulées. Cependant, nous avons observé que le prétraitement des CEF myofibroblastiques par de la dexaméthasone et le SC-58125, des inhibiteurs sélectifs de COX-2, ou avec l'ibuprofène un inhibiteur non sélectif de COX-1/COX-2 bloque totalement et avec la même efficacité la production de PGE2 (figure 6B). Ces résultats suggèrent que les PGE2 synthétisées dans les CEF myofibroblastiques humaines sont produites majoritairement, par la COX-2 constitutive. Nous avons précédemment montré que l'ET-1 inhibe la prolifération des CEFm en augmentant rapidement la production de PGE2. Cette production est assurée par la COX-2 constitutive. L'élévation du taux d'AMPc qui en résulte bloque l'activation de la voie de MAPK et

l'induction de c-Jun, deux évènements précoces dans la cascade mitogénique des CEFm. (Mallat *et al.*, 1996).

Nous démontrons également que la COX-2 est induite par l'ET-1 et le TNF- $\alpha$ . L'augmentation de l'ARNm de la COX-2 est observé après 45 minutes de traitement par les deux agents et l'expression de la protéine est augmentée après 3 heures. (figure 4). La Sarafotoxine S6c, un agoniste ETB, reproduit les effets de l'ET-1, suggérant que l'induction du gène de la COX-2 est relayée uniquement par les récepteurs ETB (figure 5A). L'induction de la COX-2 par l'ET-1 et le TNF- $\alpha$  est associée à une production tardive de prostaglandines, qui pourrait intervenir dans des évènements plus tardifs de la prolifération cellulaire, tels que la régulation des éléments du cycle cellulaire (blocage des cyclines et/ou induction de leurs inhibiteurs p21/p27) (Kato *et al.*, 1994) ou l'induction des récepteurs de l'ET-1 dans les CEFm (article 3).

### ***Mécanisme d'activation de la COX-2 par l'ET-1 et le TNF- $\alpha$ : rôle de NF- $\kappa$ B***

Nous nous sommes ensuite intéressé au mécanisme d'activation de la COX-2. Nous avons centré notre étude sur NF- $\kappa$ B, car la promoteur du gène de la COX-2 contient deux éléments de réponse de NF- $\kappa$ B, qui sont essentiels dans l'induction de la COX-2 par les cytokines (Yamamoto *et al.*, 1995). L'activation de NF- $\kappa$ B a été caractérisée par l'étude de la liaison à l'ADN par retard sur gel, ainsi que par la dégradation de I $\kappa$ B dans le cytosol. Nous avons observé que l'ET-1 et le TNF- $\alpha$  stimulent l'activation de la liaison d'un oligonucléotide consensus de l'élément de réponse de NF- $\kappa$ B aux protéines nucléaires de CEFm. Cette activation est rapide et transitoire. Elle corrèle avec la dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$  observée en réponse à la stimulation par l'ET-1 et le TNF- $\alpha$ . La sarafotoxine S6c, un agoniste des récepteurs ETB qui relaie les effets antiprolifératifs de l'ET-1, reproduit l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse à l'ET-1 (figure 1A). La caractérisation des complexes activés par l'ET-1 et le TNF- $\alpha$  par des expériences de supershift nous a permis d'identifier le dimère p50/p65 comme cible des deux facteurs (figure 1B).

Nos résultats montrent pour la première fois que l'ET-1 active NF- $\kappa$ B. Cette activation est observée dès 5 minutes, atteint un maximum après 15 minutes, et décroît à partir de 3 heures (figure 2).

L'activation de NF- $\kappa$ B nécessite la dégradation rapide et transitoire de I $\kappa$ B dans le cytosol après une stimulation par l'ET-1 et le TNF- $\alpha$ . Il existe 2 isoformes de I $\kappa$ B. Dans les CEF myofibroblastiques humaines, seule I $\kappa$ B- $\alpha$  est présente (figure 3). Nous avons observé que la dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$  corréle avec l'activation de NF- $\kappa$ B, suggérant que la dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$  initierait la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau en réponse à l'ET-1 et au TNF- $\alpha$ .

Les stimuli activant NF- $\kappa$ B dans les CEF myofibroblastiques sont encore mal connus. Cependant, une augmentation de la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN est observée au cours de l'activation des CEF de rat en réponse au stress oxydatif (Lee *et al.*, 1995). D'autre part, contrairement aux activateurs classiques de NF- $\kappa$ B tels que les cytokines, les virus ou encore le stress, la stimulation de NF- $\kappa$ B par des récepteurs couplés aux protéines G reste peu décrite (Browning *et al.*, 1997; Kravchenko *et al.*, 1995; Krymskaya *et al.*, 1999; Li & Brasier, 1996; Mari *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1996).

Bien qu'initialement décrit pour son rôle dans la stimulation de la croissance cellulaire, NF- $\kappa$ B a récemment été également impliqué dans l'arrêt de la prolifération (stoltz, pnas, 1996 ; baldwin, mcb, 1991 ; bella, jci, 1995 ; brand, jci, 1996 ; duckett, jbc, 1995 ; bash, mcb, 1997 ; perkins, science, 1997 ; wu, jbc, 1994). Ainsi, le promoteur de p53 contient un élément de réponse pour NF- $\kappa$ B et p65 interagit positivement avec p21, un inhibiteur de cyclines/Cdk (perkins, science, 1997 ; wu, jbc, 1994). De plus, lorsque c-Rel (un membre de la famille des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B) est surexprimé dans les cellules Hela, il conduit à l'inhibition de la prolifération consécutivement à une interaction avec p21WAF1 (bash, mcb, 1997). L'ensemble de nos résultats nous permet de postuler que dans les CEFm humaines l'activation de NF- $\kappa$ B nécessaire à l'induction de la COX-2 joue un rôle majeur dans l'inhibition de la prolifération par l'ET-1 et le TNF- $\alpha$ .

Le rôle de NF- $\kappa$ B dans l'induction de la COX-2 a été démontré à l'aide de deux inhibiteurs de NF- $\kappa$ B : le MG-132 et le salicylate. Le MG-132 est un inhibiteur du protéasome qui bloque la dégradation de I $\kappa$ B. Le salicylate est un anti-inflammatoire non stéroïdien qui n'a aucun effet sur l'activité de la COX mais bloque l'activation de NF- $\kappa$ B par des mécanismes qui ne sont pas clairement identifiés (pallombella, cell, 1994 ; traenckner, embo, 1994 ; kopp, science, 1994 ; mitchell, pnas, 1993). L'induction du gène de la COX-2 en réponse à l'ET-1 et le TNF- $\alpha$  est bloquée par ces inhibiteurs (figure 5). Ces résultats corèlent avec les études décrivant l'implication de NF- $\kappa$ B dans l'activation de la COX-2 par l'IL-1, le LPS ou le

TNF- $\alpha$  (yamamoto, jbc, 1995 ; newton,bbrc, 1997 ;D'acquisto, febs, 1997 ; roshak, jbc, 1996).

Les conséquences physiopathologiques de nos résultats dans le contexte de la fibrose restent à déterminer. En effet, l'élément de réponse à NF- $\kappa$ B est présent dans de nombreux gènes activés par le TNF- $\alpha$  qui sont impliqués dans les processus inflammatoires associé au développement de la fibrose. Par exemple, le « monocyte chemoattractique protein 1 » (MCP-1) ou « l'intracellular adhesion molecule 1 » (ICAM-1) peuvent être activé par NF- $\kappa$ B en réponse au TNF- $\alpha$  (marra, jci, 1996 ; hellerbrand, hepatology, 1996). Cependant, les PGE sont antifibrotiques *in vivo* et *in vitro* en inhibant la production de collagène de type I (beno, hepatology, 1993) et la prolifération des CEF chez le rat (beno, BBA, 1994). Ainsi, le fait que l'ET-1 et le TNF- $\alpha$  inhibent la prolifération des CEFm humaines consécutivement à l'induction du gène de la COX-2 par un mécanisme impliquant NF- $\kappa$ B pourrait être en faveur d'une régulation négative de la fibrose par ces facteurs.



**ARTICLE 2**

## **VI. La voie des sphingolipides**

Les sphingolipides ont longtemps été considérés comme des simples constituants des membranes des cellules eucaryotes. Cependant, en moins de dix ans, le céramide, la sphingosine et la sphingosine 1 phosphate (S1P) ont émergé comme les représentants d'une nouvelle classe de seconds messagers lipidiques régulant la prolifération, la différenciation ou l'apoptose, ceci en fonction du type cellulaire et de la nature du stimulus (Pour revue : Goetzl & An, 1998; Spiegel & Merrill, 1996; Spiegel & Milstien, 2000).

### **1. Synthèse des sphingolipides**

#### ***A. Les voies de synthèse***

Les voies de synthèse des sphingolipides sont bien caractérisées. L'étape initiale est la condensation d'une Palmitoyl-Coenzyme A et de sérine pour former le 3-ketosphinganine qui est converti en dihydrocéramide par la céramide synthase. L'ensemble de ces réactions est réalisé dans le réticulum endoplasmique. Le céramide ainsi produit est transformé en sphingomyéline par la sphingomyéline synthase qui est alors stocké dans les membranes. Lors de l'activation de la voie des sphingolipides par les cytokines ou les facteurs de croissance, la sphingomyéline stockée dans les membranes est convertie en céramide par la sphingomyélinase (Figure 12). Le céramide accumulé dans l'espace intracellulaire peut être alors desacylé par la céramidase, pour former la sphingosine. La sphingosine ainsi formée peut à son tour être phosphorylée par la sphingosine kinase pour former la sphingosine 1 phosphate (S1P) (Figure 12). Enfin, la S1P peut être inactivée par clivage en éthanolamine phosphate et en trans 2 hexadécanol par la S1P lyase.

#### ***B. Les enzymes clés***

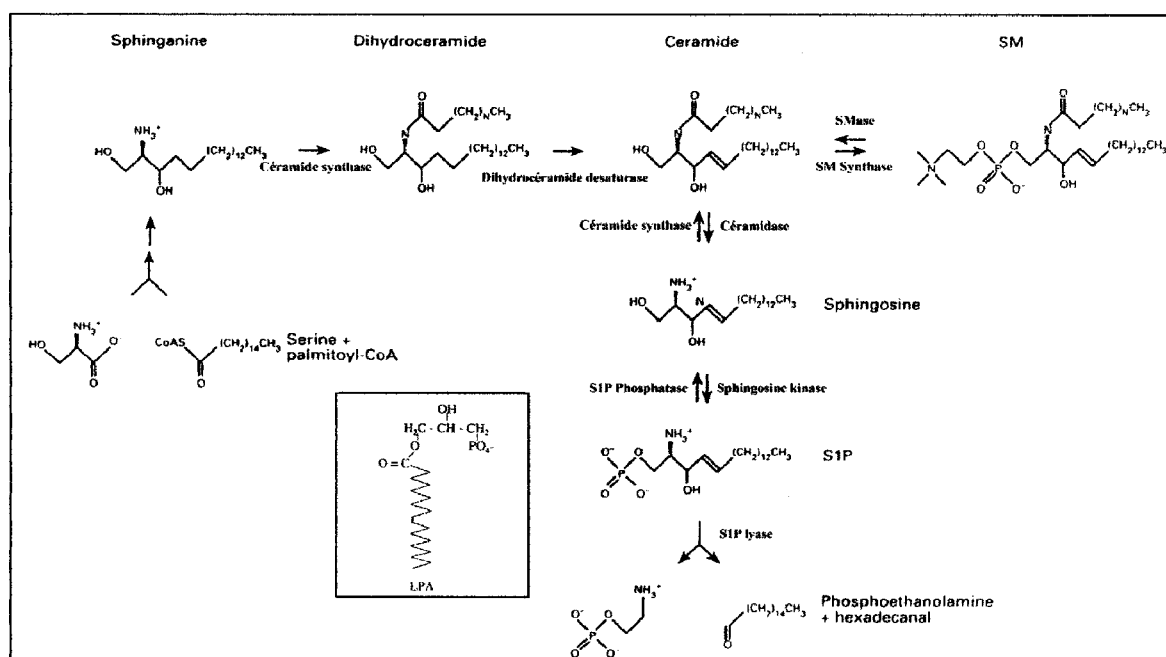
##### **a) Les SMases**

Il existe trois familles de sphingomyélinase (SMase) classées selon le pH optimum de l'activité de l'enzyme : SMase acide, SMase neutre et la SMase alcaline. La SMase acide est une enzyme lysosomale mais elle a été également détectée dans les caveolae, des microdomaines membranaires riches en sphingomyéline (Bilderback, Grigsby & Dobrowsky, 1997; Liu & Anderson, 1995). La SMase neutre  $Mg^{2+}$  dépendante est membranaire, alors que la SMase neutre  $Mg^{2+}$  indépendante est localisée dans le cytosol (Okazaki *et al.*, 1994;

Spence *et al.*, 1982). Enfin la SMase alcaline a été détectée uniquement dans la muqueuse intestinale et la bile, et serait impliquée dans la prolifération des cellules muqueuses (Duan *et al.*, 1996; Nyberg *et al.*, 1996). Les céramides ainsi formés peuvent donc être produits dans différents compartiments cellulaires selon l'isoforme de la SMase activée.

### b) Céramidase et sphingosine kinase

Peu de données existent sur la céramidase. Quant à la sphingosine kinase, son clonage récent par l'équipe de Sarah Spiegel, a permis de mettre en évidence plusieurs isoformes de cette enzyme : la sphingosine kinase 1a et la sphingosine kinase 1b (Kohama *et al.*, 1998).



**Figure 12 : Voie de synthèse des sphingolipides**

## **2. Sphingolipide : second messenger**

Les effets biologiques de chacun de ces second messagers sont différents. Si le céramide fait figure de médiateur dans l'arrêt de la croissance cellulaire et de l'apoptose, la sphingosine 1 Phosphate apparaît en revanche être un régulateur positif pour la prolifération de nombreuses lignées cellulaires de mammifères (Spiegel, Foster & Kolesnick, 1996; Spiegel & Merrill, 1996; Spiegel & Milstien, 2000).

### ***A. Effets des céramides***

Les céramides sont impliqués dans l'inhibition de la prolifération en réponse au TNF- $\alpha$  dans les cellules Jurkat (Dbaibo, Obeid & Hannun, 1993) ou en réponse à privation de sérum dans les cellules Molt-4 (Jayadev *et al.*, 1995). De même, l'accumulation de céramide conduit à la différenciation des HL-60 en réponse à la vitamine D3 (Okazaki *et al.*, 1994). Par ailleurs, le céramide est un important médiateur de l'apoptose induite par une kyrielle de stimuli tel que le TNF dans les cellules U937 (Obeid *et al.*, 1993) ou par l'anti-fas dans les cellules U937, les jurkat, Hut-78, EBV-LCL (Cifone *et al.*, 1994; Cifone *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 1994; Kolesnick & Kronke, 1998; Tepper *et al.*, 1995).

### ***B. Effets de la sphingosine***

La sphingosine exerce des effets positifs ou négatifs suivant le type cellulaire. Ces effets antiprolifératifs et proapoptotiques pourraient être dus à sa conversion en céramide alors que ses effets mitogéniques nécessiteraient sa phosphorylation en S1P (Zhang *et al.*, 1991).

## **3. La sphingosine-1-phosphate**

La S1P exerce ses effets biologiques soit en se liant à des récepteurs membranaires : les « endothelial differentiation genes » (EDG) ou en agissant en tant que second messenger intracellulaire (Tao *et al.*, 1999).

### ***A. Les récepteurs de la S1P : EDG***

Le premier récepteur de cette famille, EDG-1 a été cloné en 1990 (Hla & Maciag, 1990) et s'est révélé être le récepteur de la S1P en 1998 (Lee *et al.*, 1998b). Actuellement, cinq récepteurs spécifiques de la S1P ont été clonés EDG-1, EDG-3, EDG-5 et très récemment EDG-6, EDG-8 (Graler, Bernhardt & Lipp, 1998; Im *et al.*, 2000a; MacLennan *et al.*, 2000; Okazaki *et al.*, 1993; Spiegel, 2000; Yamazaki *et al.*, 2000). L'affinité de ces différents récepteurs pour la S1P varie d'environ 10 nM pour EDG-1 à 25 nM pour EDG-5 (Lee *et al.*, 1998b; Van Brocklyn *et al.*, 1998). De plus, trois autres membres de cette famille de récepteurs, EDG-2, EDG-4, et EDG-7 ont été identifiés. Ils lient sélectivement l'acide lysophosphatidique (LPA) qui présente une homologie structurale avec la S1P (Masana *et al.*, 1995; Bandoh *et al.*, 1999; Goetzl & An, 1998; Im *et al.*, 2000b) (Figure 12). L'ensemble de ces récepteurs appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires

couplés aux protéines G. Le type de protéine G associée à un récepteur donné dépend du récepteur et du type cellulaire (Im *et al.*, 2000a; Windh *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2000).

### ***B. La S1P, messenger intracellulaire***

La synthèse de S1P nécessite l'activation de la sphingosine kinase, l'enzyme qui phosphoryle la sphingosine en S1P. Différents facteurs activent la sphingosine kinase, notamment les cytokines, comme le TNF- $\alpha$  (Xia *et al.*, 1998), ou des facteurs de croissance et de différenciation, tels que le PDGF (Bornfeldt *et al.*, 1995; Olivera & Spiegel, 1993), le NGF et le FGF (Rius, Edsall & Spiegel, 1997). D'autre part, deux études récentes ont montré que des agonistes se lient à des récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs muscariniques (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998) et ceux du formyl peptide (Alemany *et al.*, 1999), utilisent la S1P comme second messenger.

Les effets de la S1P liés à l'activation de ses récepteurs, et ceux attribuables à ses actions intracellulaires restent difficiles à distinguer, en l'absence d'outils sélectifs, et en particulier en l'absence d'agonistes ou d'antagonistes sélectifs. Cependant, les effets intracellulaires de la S1P sont généralement observés à des concentrations micromolaires du sphingolipide et confirmés en microinjectant le sphingolipide. Les effets liés à l'activation des récepteurs de la S1P sont observés à des concentrations nanomolaires du lipide. Les effets intracellulaires de la S1P incluent la stimulation de la prolifération cellulaire, la régulation de l'apoptose, ou l'expression de molécules d'adhésion (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998; Olivera *et al.*, 1999; Pyne & Pyne, 2000). L'activation des récepteurs EDG provoque la stimulation des canaux potassiques, la rétraction des neurites, la stimulation de la prolifération et de la migration cellulaire (Bornfeldt *et al.*, 1995; Goodemote *et al.*, 1995; Himmel *et al.*, 2000; MacLennan *et al.*, 2000; Pyne & Pyne, 2000; Sadahira *et al.*, 1992).

Bien que la S1P soit mitogénique dans de nombreux types cellulaires, une augmentation du taux d'AMPC en réponse à ce sphingolipide a également été décrite. Ceci nous a conduit à étudier l'effet de la S1P sur la prolifération des CEFm humaines.

Dans l'article deux, nous avons mis en évidence un effet antiprolifératif du S1P relayé par la COX-2 dans les CEFm humaines. Par ailleurs, nous montrons pour la première fois que la S1P est un second messenger de l'ET-1.

## Antiproliferative Properties of Sphingosine 1-Phosphate in Human Hepatic Myofibroblasts

A CYCLOOXYGENASE-2 MEDIATED PATHWAY\*

Received for publication, July 18, 2000

Published, JBC Papers in Press, August 14, 2000, DOI 10.1074/jbc.M006393200

Julien Davaille‡, Cyrille Gallois‡, Aïda Habib§, Liying Li, Ariane Mallat, Jiangchuan Tao, Thierry Levade¶, and Sophie Lotersztajn||

From INSERM U99, Hôpital Henri Mondor, Créteil 94010, France, §INSERM U348, Hôpital Lariboisière, Paris 75010, France and ¶INSERM U466, CHU Rangueil, Toulouse 31403, France

Proliferation of hepatic myofibroblasts (hMF) is central for the development of fibrosis during liver injury, and factors that may limit their growth are potential antifibrotic agents. Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid with growth-regulating properties, either via Edg receptors or through intracellular actions. In this study, we examined the effects of S1P on the proliferation of human hMF. Human hMF expressed mRNAs for the S1P receptors Edg1, Edg3, and Edg5. These receptors were functional at nanomolar concentrations and coupled to pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins, as demonstrated in guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate binding assays. S1P potently inhibited hMF growth ( $IC_{50} = 1 \mu M$ ), in a pertussis toxin-insensitive manner. Analysis of the mechanisms involved in growth inhibition revealed that S1P rapidly increased prostaglandin  $E_2$  production and in turn cAMP, two growth inhibitory messengers for hMF;  $C_2$ -ceramide and sphingosine, which inhibited hMF proliferation, did not affect cAMP levels. Production of cAMP by S1P was abolished by NS-398, a selective inhibitor of COX-2. Also, S1P potently induced COX-2 protein expression. Blocking COX-2 by NS-398 blunted the antiproliferative effect of S1P. We conclude that S1P inhibits proliferation of hMF, probably via an intracellular mechanism, through early COX-2-dependent release of prostaglandin  $E_2$  and cAMP, and delayed COX-2 induction. Our results shed light on a novel role for S1P as a growth inhibitory mediator and point out its potential involvement in the negative regulation of liver fibrogenesis.

Evidence for heterogeneity in the liver myofibroblast population has been provided recently, and it has been described in rat that two populations of myofibroblasts with fibrogenic potential, hepatic stellate cells and hepatic myofibroblasts, accumulate during chronic liver injury (2, 3). Given their greatly enhanced mitogenic properties, identification of agents that may regulate the growth of these cells has been the topic of several recent studies. Accordingly, we have described the growth inhibitory properties of ET-1, TNF- $\alpha$ ,<sup>1</sup> and C-type natriuretic peptides (4–7) in human hepatic myofibroblasts (hMF). Moreover, we have recently shown that proliferation of hMF is tightly controlled by cyclooxygenases (4–6), the rate-limiting enzymes in the conversion of arachidonic acid into prostaglandins and thromboxane. Indeed, ET-1 and TNF- $\alpha$  markedly inhibit proliferation of hMF through a pathway that involves induction of cyclooxygenase-2 (COX-2) and production of prostaglandin  $E_2$  and prostaglandin  $I_2$  (4–6).

Recent lines of evidence suggest that sphingolipids, in addition to being structural constituents of cell membranes, play a key role as signaling molecules. In particular, metabolites of sphingolipids, including ceramide, sphingosine, and sphingosine 1-phosphate (S1P), have recently emerged as a new class of lipid messengers that regulate cell proliferation, differentiation, and survival (8–11). Ceramide can be generated following receptor-coupled activation of sphingomyelinase and has been linked to cell growth arrest and apoptosis (8). In contrast, S1P, a downstream metabolite of ceramide, produced by phosphorylation of sphingosine following activation of sphingosine kinase, is mitogenic and regulates apoptosis in diverse cell types (12). S1P modulates cell function by two distinct mechanisms, either as an intracellular second messenger or by activating the Edg (endothelial differentiation gene) receptors, a newly identified family of G protein-coupled receptors, (9, 10, 12). The S1P second messenger action has been suggested by the observations that sphingosine kinase activity is increased in response to various stimuli, such as oxidized low density lipoproteins (13), or to ligands that bind to various receptors, including tyrosine kinase receptors (12, 13), the TNF receptor (14), or G protein-coupled receptors (15, 16). Intracellular effects of S1P include cell proliferation, positive or negative regulation of apoptosis, expression of adhesion molecules, and cytoskeletal remodeling (12) and are mimicked by micromolar concentrations of the sphingolipid. On the other hand, extra-

Liver fibrosis is characterized by increased deposition and altered composition of extracellular matrix during chronic injury. This fibrogenic response is characterized by intense proliferation and accumulation of myofibroblasts that actively synthesize extracellular matrix and proinflammatory cytokines, as demonstrated in experimental models and culture studies (1).

\* This work was supported in part by INSERM, the Université Paris-Val-de-Marne, and by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (to S. L.) and the Ligue Départementale du Val d'Oise de la Recherche Contre le Cancer (to S. L.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche. Both authors contributed equally to this work.

¶ To whom correspondence should be addressed: Unité INSERM 99, Hôpital Henri Mondor, 94010 Créteil, France. Tel.: 33-1-49 81 35 34; Fax: 33-1-48 98 09 08; E mail: loterszt@im3.inserm.fr.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: TNF, tumor necrosis factor; RNTT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; PBS, phosphate-buffered saline; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; COX, cyclooxygenase; PTX, pertussis toxin; GTP $\gamma$ S, guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate; S1P, sphingosine 1-phosphate; hMF, hepatic myofibroblasts; bp, base pairs.

cellular actions of S1P are mediated by Edg receptors, which form a large family of at least eight members, five of them being high affinity receptors for S1P (Edg1, Edg3, Edg5, Edg6, and Edg8), and the others which are selective for lysophosphatidic acid (17). Activation of Edg receptors by S1P has been linked to stimulation of  $K^+$  channels in myocytes, neurite retraction, and cell rounding of neurons and stimulation of cell migration and of proliferation (10, 18, 19).

Although S1P is generally described as a mitogenic agent, a few studies recently showed that S1P also increases cAMP (20, 21), which has antiproliferative properties in many cell types, including hMF (4). This led us to investigate the role of S1P as a possible growth inhibitory factor for these cells. In this study, we report that human hMF express functional S1P receptors. S1P inhibits proliferation of hMF, probably via an intracellular mechanism involving early COX-2-dependent release of PGE<sub>2</sub> and cAMP and delayed COX-2 induction. Our results shed light on a novel role for S1P as a growth inhibitory mediator and point out its potential involvement in the negative regulation of liver fibrogenesis.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—Sphingosine 1-phosphate, sphingosine, C<sub>2</sub>-ceramide, dihydro-sphingosine 1-phosphate, and NS-398 were from Biomol (Tebu, France). Bacterial (*Streptomyces* sp.) sphingomyelinase was from Sigma (France). Stock solutions of S1P and dihydro-S1P were dissolved in methanol and stored at -80 °C. Freshly made dilutions were performed in 0.4% fatty acid-free bovine serum albumin, following evaporation of methanol, resuspension in 0.4% fatty acid-free bovine serum albumin, and sonication. Stock solutions of C<sub>2</sub>-ceramide and sphingosine were dissolved in Me<sub>2</sub>SO, and further dilutions were made in Waymouth medium. Fetal calf serum was from JBio Laboratories (France), and pooled human AB-positive serum were supplied by the National Transfusion Center. [*methyl*-<sup>3</sup>H]Thymidine (25 Ci/mmol) and [<sup>35</sup>S]GTPγS were from ICN (France). cAMP radioimmunoassay was from Immunotech (France). The protein assay kit was from Bio-Rad. All other chemicals were from Sigma (France). CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay was from Promega.

**Cell Isolation and Culture**—Human hMF were obtained by outgrowth of explants prepared from surgical specimens of normal liver, as described previously (22). This procedure was performed in accordance with ethical regulations imposed by the French legislation. Cells were used between the 3rd and 7th passage, and all experiments were performed on hMF made quiescent by a 3-day incubation in serum-free Waymouth medium, unless otherwise indicated.

The myofibroblastic nature of the cells was routinely evaluated by electron microscopy and positivity for smooth muscle  $\alpha$ -actin by immunohistochemistry, as described previously (22). The cultures were also found to express two markers of rat hepatic myofibroblasts, fibulin-2 and interleukin-6, and not the protease P100, a marker for rat hepatic stellate cells (2).

**Reverse Transcription and Amplification by Polymerase Chain Reaction for S1P Receptors**—Total RNA was extracted from confluent quiescent hMF, using RNeasy kit (Qiagen, Promega, France). RT-PCR was performed on 25 ng of RNA using the access RT-PCR System (Promega, WI) and two oligonucleotides, the 3' reverse transcription (RT) primer and the 5' PCR primer. Oligonucleotide primers are as follows: 5', 5'-GGC TGG AAC TCC ATC AGT GCG C-3' and 3', 5'-GAG CAG CGC CAC ATT CTC AGA GC-3' for Edg1; 5', 5'-GTG TTC ATC GCC TGC TGG TCC C-3' and 3', 5'-GCA GGC TGG ATG GGT GAG GC-3' for Edg3; 5', 5'-ATG GGC AGC TTG TAC TCG GAG TAC CTG-3' and 3', 5'-CAC TCG GCA ATG TAC CTG TTT C-3' for Edg5 and the predicted PCR products of 223, 242, and 496 bp, respectively. The RT-PCRs for Edg1, Edg3, and Edg5 were performed as follows: 45 min of reverse transcription at 48 °C, denaturation for 3 min at 94 °C, 5 cycles of "touchdown" (1 min at 94 °C, 1 min at 67 °C, 1 min at 72 °C), and varying cycles of PCR as shown in Fig. 1 (1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C, 1 min at 72 °C). PCR products were size-fractionated in a 2% agarose gel and blotted onto Hybond N+ membrane. After a prehybridization in Express Hyb buffer (CLONTECH) for 3 h at 37 °C, the membrane was hybridized in the same buffer overnight at 37 °C with 50 ng of oligonucleotides complementary to sequences within the cDNAs flanked by the PCR primers, labeled with T<sub>4</sub> polynucleotide kinase (Edg1 probe, 5'-CCA CGG TCT TCA CTC TGC TTC TG-3'; Edg3 probe, 5'-CAT TGA

TGT GGC CTG CAG GG-3'; Edg5 probe, 5'-CAC TCG GCA ATG TAC CTG TTT C-3'). After washing in 2× SSC, 0.1% SDS for 1 h at 37 °C and then for 1 h at 48 °C, membranes were subjected to PhosphorImager analysis (Molecular Dynamics, France).

**[<sup>35</sup>S]GTPγS Binding Assay**—Confluent hMF were made quiescent by incubation in Waymouth medium without serum for 48 h. Cells were then washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) medium, scraped in buffer A (20 mM Tris, pH 7.4, 500 μM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml aprotinin, 0.5 μg/ml pepstatin), and homogenized with a Polytron homogenizer. The homogenate was spun 5 min at 5,500 × g, and the pellet was discarded. The supernatant was centrifuged for 40 min at 43,000 × g, and the resulting pellet was resuspended in buffer A and frozen at -80 °C until use. Membranes (10 μg of protein/assay) were incubated for 45 min at 30 °C in buffer B (20 mM Tris, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 μM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml aprotinin, 0.5 μg/ml pepstatin) containing 3 μM GDP unless otherwise indicated, 50 pM [<sup>35</sup>S]GTPγS (0.5 μCi/assay), and varying concentrations of ligands. The samples were then rapidly filtered on GF/B glass microfiber filters (Whatman) presoaked in buffer C (20 mM Tris, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, and 1 mM β-mercaptoethanol). The filters were washed three times with 2 ml of buffer C and counted. Specific binding was calculated as the difference in bound radioactivity in the absence or presence of 10 μM unlabeled GTPγS and did not exceed 20% of the total binding.

**Pertussis Toxin Treatment of Human hMF**—Confluent hMF were made quiescent by incubation in Waymouth medium without serum for 48 h. Cells were then treated for 24 h with either 3 or 100 ng/ml PTX or vehicle, and DNA synthesis was measured as described below. Alternatively, membranes were prepared as described above and used in GTPγS binding assays.

**Cyclic AMP Assay**—Cells were seeded in 24-well plates, grown to confluence, and serum-deprived for 48 h in Waymouth medium. Following preincubation with 0.6 mM isobutylmethylxanthine for 15 min, hMF were stimulated with PBS containing effectors. When indicated, cells were preincubated for 60 min with either the cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 (5 μM) or vehicle (Me<sub>2</sub>SO). Samples were processed as described previously (4), and cyclic AMP was assayed by a commercial radioimmunoassay (Immunotech, France).

**Prostaglandin Release**—Confluent monolayers in 96-well plates were serum-deprived for 48 h, washed in PBS, and further incubated in Waymouth medium. Following pretreatment with 5 μM NS-398 or vehicle, cells were stimulated with the indicated effectors over various times. Release of PGE<sub>2</sub> was assayed by a specific enzyme immunoassay as described previously (23).

**DNA Synthesis and Cell Proliferation Assays**—DNA synthesis was measured in triplicate wells by incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine, as described previously (7). Confluent hMF were made quiescent by incubation in Waymouth medium without serum for 48 h. Cells were then stimulated for 30 h with human serum following pretreatment for 30 min with NS-398, dexamethasone, or vehicle. [<sup>3</sup>H]Thymidine (0.5 μCi/well) was added during the last 8 h of incubation.

Cell proliferation was assessed as described previously (7). Briefly, cells were seeded in 96-well plates at low density (5000/well) in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% human serum and 5% fetal calf serum (5:5), allowed to attach overnight, and made quiescent by a 48-h incubation in serum-free medium. Cells were then incubated for 3 days with 5% human serum in the absence or presence of 10 μM S1P that was renewed daily. The medium was changed for PBS, and CellTiter 96 AQueous One Solution reagent was added to each well, and absorbance was recorded at 490 nm.

**Western Blotting Analysis of COX Protein Expression**—Confluent hMF in 12-well plates were made quiescent in serum-free Waymouth medium over 3 days and were then incubated for various times with 10 μM S1P. Whole cell extracts were prepared, and Western blotting analysis was performed as described previously (6).

**Statistics**—Results are expressed as mean ± S.E. of *n* experiments. Results were analyzed by repeated measures analysis of variance or two-tailed Student's *t* test, as appropriate, with *p* < 0.05 considered significant.

#### RESULTS

**Characterization of Receptors for S1P in Human hMF**—Identification of the S1P receptor subtypes present in human hMF was performed by RT-PCR analysis, with varying PCR cycles. Bands of 223, 242, and 496 bp corresponding to the size of the Edg1, Edg3, and Edg5 products were identified and quantified.

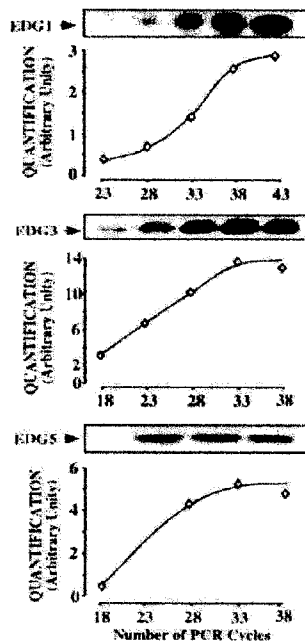


Fig. 1. Expression of Edg1, Edg3, and Edg5 mRNAs by human hMF. RT-PCR for Edg1, Edg3, and Edg5 were performed with varying PCR cycles. The PCR products were then size-fractionated and blotted, and the membranes were hybridized with a labeled oligonucleotide complementary to the respective S1P receptor sequences within the cDNA flanked by the PCR primers. Bands with 223, 242, and 496 bp corresponding to the size of the Edg1, Edg3, and Edg5 products were identified and quantified by PhosphorImager analysis.

The results presented in Fig. 1 indicate that transcripts for the three Edg receptors are present in human hMF (Fig. 1).

Coupling of S1P receptors to G proteins was evaluated in [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding assays, which measure GDP-GTP exchange on the  $\alpha$  subunit of the G protein and, therefore, the initial steps of G protein activation by a receptor ligand. Optimal conditions for S1P-induced stimulation of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding were defined, in particular with respect to time dependence and to GDP concentration, which is added to keep the G protein in the non-dissociated form. Binding was linear up to 45 min. GDP dose-dependently decreased basal [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding (Fig. 2, inset), and the concentration required for optimal activation by S1P was in the range of 1–10  $\mu$ M (not shown). As shown in Fig. 2, S1P dose-dependently increased binding of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S to G proteins in membranes of human hMF, with an  $EC_{50}$  of 5 nM, in agreement with the reported  $K_d$  of S1P for its receptors. Sphinganine 1-phosphate (dihydro-S1P), which binds and signals through all S1P receptors with a potency similar to that of S1P (24), was as efficient as S1P in enhancing GTP $\gamma$ S binding (Fig. 2A). We also investigated the coupling of S1P receptors to  $G_i/G_o$  proteins in human hMF by using pertussis toxin (PTX), which ADP-ribosylates and inactivates the  $\alpha$  subunit of  $G_i/G_o$ , thereby maintaining  $G_i/G_o$  in a non-dissociated form. Optimal GDP concentrations required to keep the G proteins in a non-dissociated form were lower in PTX-treated than in control membranes (Fig. 2, inset). This is probably due to the fact that PTX excludes  $G_i$  proteins from the pool of G proteins accessible to GDP. Under optimal conditions of GDP, treatment with PTX 3 ng/ml partially abolished the stimulatory effect of S1P on GTP $\gamma$ S binding (Fig. 2B).

These results demonstrate that human hMF express receptors for S1P that are functionally coupled to pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins.

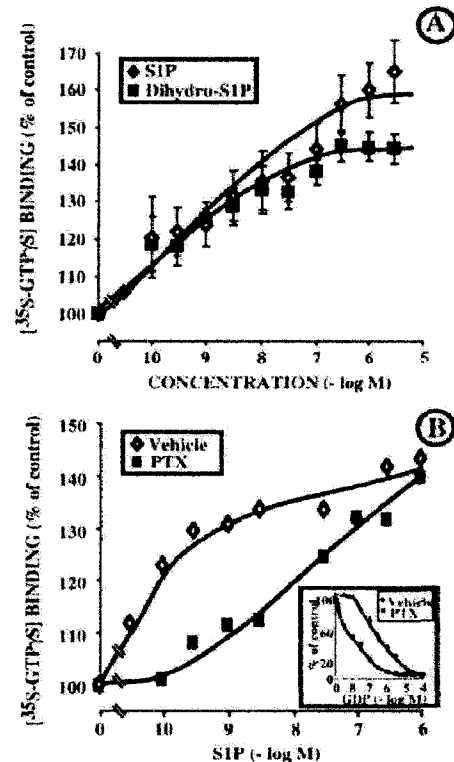
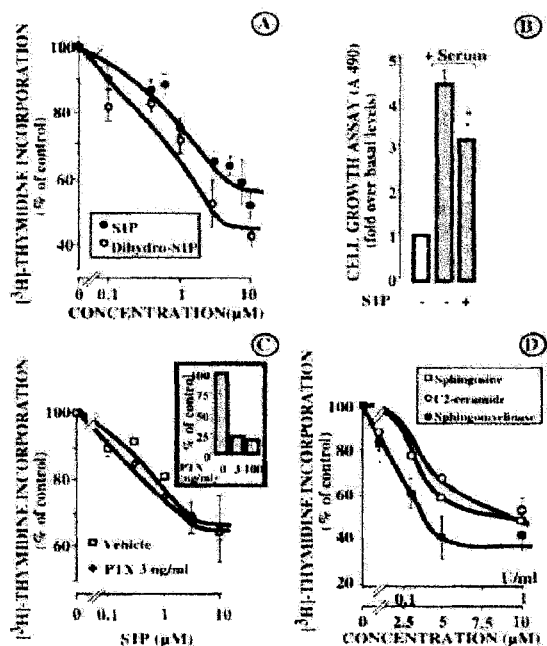


Fig. 2. S1P and dihydro-S1P enhance GTP $\gamma$ S binding in human hMF, via a pertussis toxin-sensitive and -insensitive pathway. A, membranes from human hMF were assayed for [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding assays as described under "Experimental Procedures," with varying concentrations of S1P and dihydro-S1P, in the presence of 3  $\mu$ M GDP. Results represent the mean  $\pm$  S.E. of six experiments and are expressed as percent of control.  $p < 0.05$  compared with control. B, effect of PTX treatment on GTP $\gamma$ S binding in response to S1P. Human hMF were treated with 3 ng/ml pertussis toxin or vehicle for 24 h, and membranes were prepared as described under "Experimental Procedures." GTP $\gamma$ S binding was assayed in the presence of 3  $\mu$ M GDP for vehicle membranes and 0.1  $\mu$ M GDP for pertussis toxin-treated membranes (see inset). Results are the mean of two experiments. Inset, inhibitory effect of GDP on GTP $\gamma$ S binding in pertussis toxin-treated and vehicle membranes. [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding was assayed in pertussis toxin-treated and vehicle membranes, with varying concentrations of GDP. Results represent the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

*Sphingosine 1-Phosphate Inhibits Proliferation of Human hMF in a Pertussis Toxin-insensitive Manner*—We investigated the effects of S1P and of other sphingolipid metabolites on the proliferation of human hMF. S1P had no mitogenic effects on human hMF (not shown) but dose-dependently reduced serum-stimulated DNA synthesis (Fig. 3A). A maximal 55% inhibition was observed at 10  $\mu$ M S1P, with an  $IC_{50}$  of 1  $\mu$ M. The inhibitory effect of S1P was fully reproduced by sphinganine 1-phosphate (dihydro-S1P) (Fig. 3A). However, the  $IC_{50}$  values of S1P and dihydro-S1P were 1 and 1.5  $\mu$ M, respectively, *i.e.* at least 200 times higher than their  $EC_{50}$  values to stimulate GTP $\gamma$ S binding (Fig. 2) and higher than the reported  $K_d$  value of S1P for its receptors (9, 10, 12). Direct assessment of cell growth confirmed the antiproliferative effect of S1P, with a 35% inhibition of cell growth being observed after 3 days (Fig. 3B). The growth inhibitory effects of S1P were insensitive to pertussis toxin (Fig. 3C), although pertussis toxin treatment was effective, since it reduced the mitogenic effect of serum. Moreover, pertussis toxin was maximally effective since DNA synthesis in response to serum was reduced to the same extent at 3 and 100 ng/ml of the toxin (Fig. 3C, inset). Finally, hMF DNA synthesis



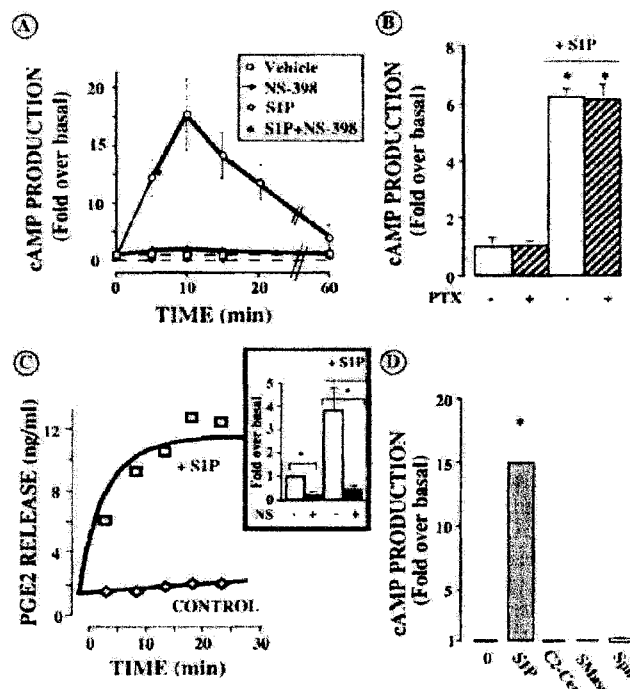


**FIG. 3. S1P and other sphingolipids inhibit the proliferation of human hMF.** *A*, effects of S1P or dihydro-S1P on DNA synthesis of human hMF. Confluent cells were made quiescent by incubation in serum-free medium over 3 days. Cells were stimulated for 30 h with varying concentrations of S1P or dihydro-S1P, in the presence of 5% human serum. [ $^3\text{H}$ ]Thymidine incorporation into DNA was measured as described under "Experimental Procedures." Results represent the mean  $\pm$  S.E. of six experiments and are expressed as percent of control.  $p < 0.05$  compared with control for concentrations over  $0.3 \mu\text{M}$ . *B*, effect of S1P on hMF growth. Cell growth was assayed at day 0 and day 3 as described under "Experimental Procedures," without or with 5% human serum in the absence or presence of  $10 \mu\text{M}$  S1P or vehicle, which was added every day. Results are the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.  $p < 0.05$  for S1P versus control. *C*, inhibition of DNA synthesis by S1P is pertussis toxin-insensitive. Confluent quiescent cells were pretreated for 24 h with 3 ng/ml pertussis toxin or vehicle. DNA synthesis was then measured as described in *A*. Results represent the mean  $\pm$  S.E. of three experiments. The inhibitory effect of S1P was not significantly different in hMF treated with PTX or vehicle. The inset shows the effects of 3 and 100 ng/ml pertussis toxin on DNA synthesis measured with 5% human serum. *D*, effects of other sphingolipids on DNA synthesis of hMF. DNA synthesis was assayed as described in *A* with varying concentrations of either  $\text{C}_2$ -ceramide, sphingomyelinase (in units/ml), or sphingosine. Results represent the mean  $\pm$  S.E. of six experiments and are expressed as percent of control.  $p < 0.05$  compared with control for concentrations over  $0.3 \mu\text{M}$  lipid or 0.1 units/ml sphingomyelinase.

was also inhibited by exogenous addition of other sphingolipids,  $\text{C}_2$ -ceramide, a permeant analog of ceramide, sphingosine, the immediate precursor/metabolite of S1P, and by bacterial sphingomyelinase, the enzyme that hydrolyzes sphingomyelin to ceramide (Fig. 3*D*). Concentrations higher than  $10 \mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -ceramide caused hMF death (not shown).

The next series of experiments were performed to analyze the signaling events that mediate inhibition of hMF proliferation by S1P.

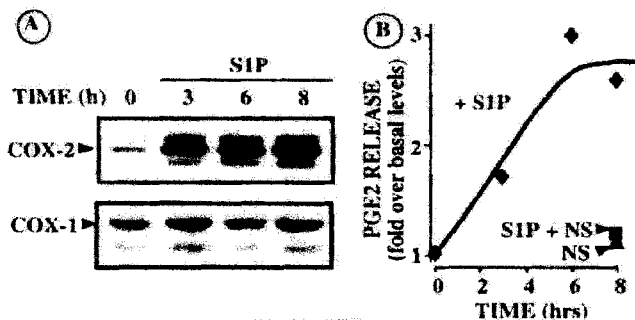
**COX-2 Mediates the Growth Inhibitory Effects of Sphingosine 1-Phosphate in Human hMF.**—We first examined the effects of S1P on  $\text{PGE}_2$  and cAMP levels, two growth inhibitory mediators for human hMF (4–6). Following addition of S1P, cAMP production rose within 5 min, maximally increased to 20-fold by 10 min, declined after 15 min, and returned to basal levels after 60 min (Fig. 4*A*). Stimulation of cAMP production by S1P was totally blocked by the selective COX-2 inhibitor NS-398 (Fig. 4*A*) and unaffected by PTX treatment (Fig. 4*B*). These



**FIG. 4. S1P enhances cyclic AMP production through prostaglandin synthesis in human hMF.** *A*, S1P stimulates cyclic AMP production via a COX-2-dependent pathway. Confluent quiescent cells were pretreated for 1 h with  $5 \mu\text{M}$  NS-398 or vehicle ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) and were further stimulated with  $10 \mu\text{M}$  S1P for the indicated times. Results are the mean  $\pm$  S.E. of three experiments and are expressed as fold over basal levels. NS-398, by lowering levels of endogenous prostaglandins, reduced basal cAMP levels from  $209 \pm 29$  to  $68 \pm 14 \text{ fmol/mg}$ ;  $p < 0.05$  for NS-398 effect. *B*, effect of pertussis toxin treatment on the elevation of cAMP by S1P. Confluent quiescent cells were pretreated for 24 h with 3 ng/ml pertussis toxin or vehicle and further stimulated with  $10 \mu\text{M}$  S1P. Results are the mean  $\pm$  S.E. of three experiments and are expressed as fold over basal levels.  $p < 0.05$  compared with vehicle for S1P and with PTX for S1P + PTX; values for S1P + PTX were not significantly different from values for S1P. *C*, S1P enhances release of  $\text{PGE}_2$ . Confluent quiescent cells were stimulated with  $10 \mu\text{M}$  S1P over various times.  $\text{PGE}_2$  release was assayed by enzyme immunoassay as described under "Experimental Procedures." Results show a typical experiment repeated twice. The inset shows the effects of  $5 \mu\text{M}$  NS-398 on  $\text{PGE}_2$  production. Results are the mean  $\pm$  S.E. of three experiments and are expressed as fold over basal levels.  $p < 0.05$  for NS-398 effect. *D*, effects of other sphingolipids on cAMP production. Confluent quiescent cells were exposed for 10 min to  $10 \mu\text{M}$  S1P,  $10 \mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -ceramide ( $\text{C}_2$ -Cer), 1 unit/ml sphingomyelinase ( $\text{SMase}$ ),  $10 \mu\text{M}$  sphingosine ( $\text{Sph}$ ), or the respective concentrations of vehicle ( $\text{Me}_2\text{SO}$  for  $\text{C}_2$ -Cer and  $\text{Sph}$ ). Cyclic AMP was extracted and measured as described under "Experimental Procedures." Results are the mean  $\pm$  S.E. of four experiments and are expressed as fold over basal levels.  $p < 0.05$  compared with control for S1P; values for all other sphingolipids were not significantly different from control.

data suggested that S1P raises cAMP following  $\text{PGE}_2$  production by COX-2. Accordingly, S1P caused a rapid 3–5-fold activation of  $\text{PGE}_2$  production, which correlated with the time course of cAMP production (Fig. 4*C*), and was blocked by NS-398 (Fig. 4*C*, inset). It should be noted that NS-398 decreased basal  $\text{PGE}_2$  production, in agreement with our previous data showing that COX-2 is constitutively expressed in hMF (see Fig. 5*A*) and accounts for basal  $\text{PGE}_2$  production in these cells (6). Therefore, these results demonstrate that S1P stimulates an early COX-2-dependent production of  $\text{PGE}_2$ , leading to cAMP synthesis.

The effects of other sphingolipids were assessed on cAMP levels. Sphingosine, which had no significant effect after 10



**FIG. 5. S1P induces COX-2 protein expression and activity in human hMF.** A, S1P induces COX-2 protein expression but has no significant effect on COX-1. Whole cell extracts obtained from quiescent hMF treated by 10  $\mu$ M S1P for various times were analyzed by Western blot of COX-2 or COX-1 proteins. Results show a typical experiment repeated three times. B, S1P stimulates PGE<sub>2</sub> release. Confluent quiescent cells were pretreated for 60 min with 5  $\mu$ M NS-398 or vehicle (Me<sub>2</sub>SO) and were further stimulated with 10  $\mu$ M S1P over various periods. PGE<sub>2</sub> release was assayed by enzyme immunoassay as described under "Experimental Procedures." Results show a typical experiment repeated twice.

min of incubation (Fig. 4D), caused only a 3-fold maximal increase in cAMP levels after 30 min (not shown); sphingomyelinase caused a maximal 1.7-fold cAMP elevation only after 60 min of incubation, whereas C<sub>2</sub>-ceramide did not affect cAMP production. Therefore, these late effects of sphingosine and sphingomyelinase, observed at delayed incubation time, are probably related to some conversion into S1P.

Since COX-2 is also an inducible enzyme, and given its central role in the inhibition of hMF proliferation (4, 6), we investigated the effect of S1P on COX-2 protein expression. As shown in Fig. 5A, S1P caused a strong induction of COX-2, which was maximal after 3 h and remained elevated for at least 8 h. In contrast, S1P did not significantly affect COX-1 expression. Induction of COX-2 was associated with a 3-fold increase in PGE<sub>2</sub> production, an effect totally blocked by the COX-2 inhibitor NS-398 (Fig. 5B).

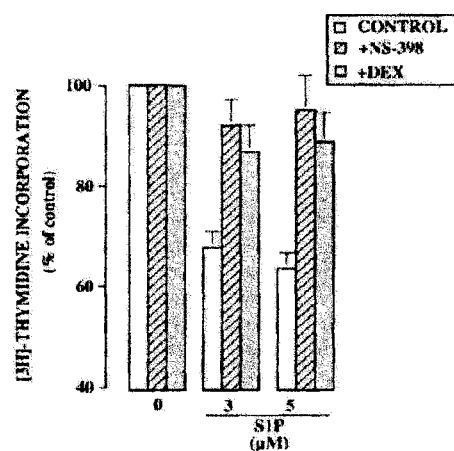
Finally, we used NS-398 and dexamethasone, which selectively inhibit COX-2 activity and transcription (6), respectively, in order to determine the role of COX-2 in the growth inhibitory effect of S1P. As shown in Fig. 6, both agents blunted the antiproliferative effect of S1P.

Taken together, these results suggest that S1P inhibits the growth of human hMF by a pathway involving both early PGE<sub>2</sub> and cAMP productions, as well as delayed COX-2 induction.

#### DISCUSSION

Proliferation of myofibroblasts is central for the development of liver fibrosis during chronic liver diseases. The present study shows that the growth of human hepatic myofibroblasts is inhibited by S1P and constitutes the first evidence for an antiproliferative effect of this sphingolipid. These data suggest that S1P may play a key role as a negative regulator of liver fibrogenesis.

Data concerning expression and function of Edg receptors in liver are scarce. Hepatic messenger RNAs for Edg1 and Edg3 have been detected (25, 26), but their cell distribution is unknown. Regarding hepatic actions of S1P, a receptor-mediated glycogenolytic effect was described in rat hepatocytes (27). We show here that human hMF express the mRNAs for the S1P receptors Edg1, Edg3, and Edg5. These receptors are functional and coupled to G proteins with an affinity of 5 nM, in keeping with the apparent affinity of S1P for its receptors. In addition, dihydro-S1P, which binds the three S1P receptors with equal affinity (9, 10, 12), also elicits G protein activation, with an



**FIG. 6. COX-2 mediates inhibition of hMF proliferation by S1P.** Confluent cells were made quiescent by incubation in serum-free medium over 3 days. hMF were pretreated for 60 min with 5  $\mu$ M NS-398 or 18 h with 0.1  $\mu$ M of dexamethasone (DEX) or their vehicles, Me<sub>2</sub>SO and ethanol, respectively, and were further stimulated with 5% human serum, together with 3 or 5  $\mu$ M S1P. [<sup>3</sup>H]Thymidine incorporation into DNA was measured as described under "Experimental Procedures." Results represent the mean  $\pm$  S.E. of four experiments and are expressed as percent of respective control (control, 11,654  $\pm$  4749 cpm; NS-398, 22,761  $\pm$  7629 cpm; dexamethasone, 27,358  $\pm$  2229 cpm).  $p < 0.05$  for NS-398 and dexamethasone effects.

affinity similar to that of S1P. Finally, the incomplete effect of pertussis toxin on [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding indicates that Edg receptors are coupled to both G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> proteins and to pertussis toxin-insensitive G proteins. These findings are in agreement with the reported exclusive coupling of Edg1 to G proteins of the G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> family and the association of Edg3 and Edg5 to G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> and also to G<sub>s</sub>, G<sub>12</sub>, and G<sub>13</sub> (9, 10, 12).

A major point of the present study is that S1P exhibits potent antiproliferative effects in human hMF, which contrasts with its mitogenic properties in many other cells. Whether this growth inhibitory effect of S1P is linked to an intracellular effect or to its plasma membrane receptors remains to be determined, although both effects are not mutually exclusive. The intracellular role of S1P has been generally evaluated by using micromolar concentrations of the sphingolipid exogenously applied to cell cultures and confirmed by microinjection of the sphingolipid. Because of its highly lipophilic nature, S1P is taken up by the intracellular compartments and acts as a second messenger, as described for its precursor ceramide. In contrast, the effects linked to activation of S1P receptors occur at nanomolar concentrations of the lipid (9, 10, 12). In human hMF, several lines of evidence argue for an intracellular mechanism for S1P action. First, growth inhibitory effects of S1P and dihydro-S1P are observed at micromolar concentrations, whereas G protein activation is observed at nanomolar concentrations. Second, in a separate study, we obtained evidence suggesting that ET-1 inhibits hMF growth via an intracellular increase of S1P. Indeed, ET-1 stimulates sphingosine kinase in human hMF (28). Moreover, the increase in cAMP elicited by ET-1 is blocked by selective inhibitors of sphingosine kinase, dimethyl sphingosine and *m*-threo-dihydrosphingosine, suggesting a second messenger role for S1P in ET-1 action in these cells (28).

Growth inhibitory properties of S1P on human hMF rely on a novel signaling pathway for the sphingolipid that involves both early and delayed production of PGE<sub>2</sub>. Rapid production of PGE<sub>2</sub> is ensured by constitutive COX-2, as shown by the dramatic reduction of basal PGE<sub>2</sub> production by the selective COX-2 inhibitor NS-398 (Fig. 4C). These data suggest that,

although COX-1 is constitutively expressed in human hMF (Fig. 5), the major part of PGE<sub>2</sub> levels found in basal conditions derives from constitutive COX-2. The rapid increase in PGE<sub>2</sub> production in turn leads to elevation of cAMP, a growth inhibitory mediator that blocks early events involved in hMF proliferation (4). Recent studies indicate that S1P generally decreases cAMP production (9, 10, 12), but S1P-induced cAMP elevation has also been reported in a few instances (20, 29, 30). Interestingly, in human vascular smooth muscle cells, S1P is devoid of mitogenic properties, and stimulates cAMP production (20). Moreover, in these cells, PGE<sub>2</sub> and cAMP show antiproliferative properties (31, 32), but whether S1P could provoke growth arrest was not investigated. Similarly, lysophosphatidic acid, which shares structural homology with S1P and binds to receptors of the Edg family, may also regulate cell growth positively or negatively. Although generally promitogenic (10), lysophosphatidic acid inhibits the growth of myelocytes via a cAMP-dependent pathway (33).

In human hMF, S1P also ensures delayed PGE<sub>2</sub> secretion, following COX-2 induction. These data constitute the first description of a regulation of COX-2 by S1P. Blocking COX-2 by either dexamethasone or NS-398 abrogates the antiproliferative effect of S1P, indicating that COX-2 mediates the growth inhibitory effect of S1P. Our recent studies indicated that activation of COX-2 is a key event in the inhibition of hMF proliferation. Indeed, we found that the antiproliferative effects of ET-1 and TNF- $\alpha$  involve COX-2 (6). We also showed that the mitogenic effects of PDGF-BB and thrombin result from a balance between a promitogenic and a COX-2-dependent growth inhibitory pathway (5). Therefore, the present data further support a central role of COX-2 in hMF growth inhibition. According to our previous data, early COX-2-dependent cAMP will block early steps involved in hMF proliferation, such as extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activations (4). The consequences of COX-2 induction by S1P remain to be determined but may involve regulation of more distal events, such as cell cycle components (34).

In summary, the present study brings out two major findings, (i) the presence of Edg receptors in human hMF and (ii) a novel role for S1P as a growth inhibitory bioactive sphingolipid, via COX-2 activation. At present, our data rather favor the hypothesis of an intracellular antiproliferative action of S1P. In this context, biological functions associated with the presence of Edg receptors in human hMF remain to be explored. Accumulation of hepatic myofibroblasts is central in the development of liver fibrosis, as shown in experimental models of liver injury and in human chronic liver diseases (35). Therefore, our results point to a key role of S1P in the control of liver fibrogenesis. An important issue would be to characterize the distribution of sphingosine kinase in the various liver cell types. Evidence for secretion of S1P by other cells and tissues is limited, probably due to its lipophilic nature and/or a high S1P degradative activity. Nevertheless, S1P release has been detected in activated platelets and in allergically stimulated mast cells, and S1P concentration in serum is around 0.5  $\mu$ M (36, 37). Whether hepatic production of S1P is altered during chronic liver diseases is under investigation.

**Acknowledgments**—We thank J Hanoune for permanent support and O. Cuvillier, F. Pecker, C. Pavoine, Y. Laperche, and G. Guellaen for

critical reading of the manuscript. We thank C. Feral for help in setting PCR experiments.

## REFERENCES

- Olaso, E., and Friedman, S. L. (1998) *J. Hepatol.* **29**, 636–647
- Knittel, T., Kobold, D., Saile, B., Grundmann, A., Neubauer, K., Piscaglia, F., and Ramadori, G. (1999) *Gastroenterology* **117**, 1295–1221
- Knittel, T., Kobold, D., Piscaglia, F., Saile, B., Neubauer, K., Mehde, M., Timpi, R., and Ramadori, G. (1999) *Histochem. Cell Biol.* **112**, 387–401
- Mallat, A., Preaux, A. M., Serradell-Le Gal, C., Kaufaste, D., Gallois, C., Breiner, D. A., Bradham, C., Maclouf, J., Iourgenko, V., Fouassier, L., Dhumeaux, D., Mavrier, P., and Lotersztajn, S. (1996) *J. Clin. Invest.* **98**, 2771–2778
- Mallat, A., Gallois, C., Tao, J., Habib, A., Maclouf, J., Mavrier, P., Preaux, A. M., and Lotersztajn, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27300–27305
- Gallois, C., Habib, A., Tao, J., Maulin, S., Maclouf, J., Mallat, A., and Lotersztajn, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 23183–23190
- Tao, J., Mallat, A., Gallois, C., Belmadani, S., Mery, P. F., Nhiw, J. T.-V., Pavoine, C., and Lotersztajn, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 23761–23769
- Hannun, Y. A. (1996) *Science* **274**, 1855–1859
- Hla, T., Lee, M. J., Ansell, N., Liu, C. H., Thangada, S., Thompson, B. D., and Kluk, M. (1999) *Biochem. Pharmacol.* **58**, 201–207
- Goetzl, E. J., and An, S. (1998) *FASEB J.* **12**, 1589–1598
- Spiegel, S., and Merrill, A. H., Jr. (1996) *FASEB J.* **10**, 1388–1397
- Spiegel, S., Cuvillier, O., Edsall, L. C., Kohama, T., Menzelev, R., Olah, Z., Olivera, A., Pirianov, G., Thomas, D. M., Tu, Z., Van Brocklyn, J. R., and Wang, F. (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **845**, 11–18
- Auge, N., Nikolova-Karakashian, M., Carpentier, S., Parthasarathy, S., Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Merrill, A. H., Jr., and Levade, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21533–21538
- Xia, P., Gamble, J. R., Rye, K. A., Wang, L., Hii, C. S., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A. G., Barter, P. J., and Vadas, M. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14196–14201
- Alemany, R., Meyer zu Heringdorf, D., van Koppen, C. J., and Jakobs, K. H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 3994–3999
- Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K. H., and van Koppen, C. J. (1998) *EMBO J.* **17**, 2830–2837
- Lynch, K. R., and Im, I. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 473–475
- Van Koppen, C., Meyer zu Heringdorf, M., Laser, K. T., Zhang, C., Jakobs, K. H., Bunemann, M., and Pott, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2082–2087
- Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L. C., Schmidt, R. R., and Spiegel, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 4626–4632
- Bornfeldt, K. E., Graves, L. M., Raines, E. W., Igarashi, Y., Wayman, G., Yamamura, S., Yatomi, Y., Sidhu, J. S., Krebs, E. G., Hakomori, S., and Ross, R. (1995) *J. Cell Biol.* **130**, 193–206
- Sato, K., Tamura, H., Igarashi, Y., Li, M., and Okajima, F. (1999) *Mol. Pharmacol.* **55**, 126–133
- Win, K. M., Charlotte, F., Mallat, A., Cherqui, D., Martin, N., Mavrier, P., Preaux, A. M., Dhumeaux, D., and Rosenbaum, J. (1993) *Hepatology* **18**, 137–145
- Pradellas, P., Grassi, J., and Maclouf, J. (1985) *Anal. Chem.* **57**, 1170–1173
- Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzelev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J., Thangada, S., Liu, C. H., Hla, T., and Spiegel, S. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 229–240
- Liu, C. H., and Hla, T. (1997) *Genomics* **43**, 15–24
- Yamaguchi, F., Tokuda, M., Hatase, O., and Brenner, S. (1996) *Biochem. Cell Biol.* **227**, 608–614
- Im, D. S., Fujioka, T., Katada, T., Kondo, Y., Ui, M., and Okajima, F. (1997) *Am. J. Physiol.* **272**, G1091–G1099
- Gallois, C., Davaille, J., Habib, A., Mallat, A., Tao, J., Levade, T., and Lotersztajn, S. (2000) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **905**, 311–314
- Kou, J., Sato, K., Watanabe, T., Tomura, H., Kawabara, A., Kimura, T., Tamama, K., Ishizuka, T., Murata, N., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohta, H., Ui, M., and Okajima, F. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 23940–23947
- Gonda, K., Okamoto, H., Takuwa, N., Yatomi, Y., Okazaki, H., Sakurai, T., Kimura, S., Sillard, R., Harii, K., and Takuwa, Y. (1999) *Biochem. J.* **337**, 67–75
- Graves, L. M., Bornfeldt, K. E., Raines, E. W., Potts, B. C., Macdonald, S. G., Ross, R., and Krebs, E. G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10300–10304
- Bornfeldt, K. E., Campbell, J. S., Koyama, H., Argast, G. M., Leslie, C. C., Raines, E. W., Krebs, E. G., and Ross, R. (1997) *J. Clin. Invest.* **100**, 875–885
- Tigyi, G., Dyer, D. L., and Milei, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 1908–1912
- Kato, J. Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J., and Sherr, C. J. (1994) *Cell* **79**, 487–496
- Friedman, S. L. (1993) *N. Engl. J. Med.* **328**, 1828–1835
- Prieschl, E. E., Csenga, R., Novotny, V., Kikuchi, G. E., and Baumruker, T. (1999) *J. Exp. Med.* **190**, 1–8
- Yatomi, Y., Ruan, F., Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1995) *Blood* **86**, 193–202

## **DISCUSSION**

Cette article constitue la première mise en évidence d'un effet antiprolifératif de la S1P et de son rôle de second messenger de l'ET-1.

### ***Les sphingolipides inhibent la croissance des CEFm humaines***

Les sphingolipides régulent la prolifération de nombreuses cellules (Spiegel & Merrill, 1996). Nous avons donc étudié l'effet d'une enzyme qui synthétise le céramide, la sphingomyelinase (1 U/ml), et ceux d'un analogue perméant du céramide, le C2-céramide (10  $\mu$ M), de la sphingosine (10  $\mu$ M) et de la S1P (10  $\mu$ M) sur l'incorporation de [ $^3$ H]-thymidine sur les CEFm. Comme cela avait été observé dans d'autres cellules (Jayadev *et al.*, 1995; Pushkareva *et al.*, 1995) lorsque la prolifération des CEFm est stimulée par 5% de sérum humain, la sphingomyelinase, le C2-céramide et la sphingosine inhibent l'incorporation de [ $^3$ H]-thymidine de plus de 50% (figure 3). D'autre part, la S1P inhibe également l'incorporation de [ $^3$ H]-thymidine de façon dose dépendante. Son effet maximal est observé à une concentration de 5  $\mu$ M, avec un IC<sub>50</sub> de 1  $\mu$ M. En revanche, elle n'a aucun effet sur l'incorporation de [ $^3$ H]-thymidine en l'absence de sérum. La réduction d'incorporation de [ $^3$ H]-thymidine par la S1P est associée à une inhibition de la croissance des CEFm (figure 3). Ces résultats indiquent que la S1P inhibe la prolifération des CEFm à des concentrations micromolaires, suggérant une action intracellulaire du sphingolipide.

Ces résultats constituent la première mise en évidence d'un effet antiprolifératif de la S1P. Jusqu'à présent, il avait seulement été observé que le LPA, qui possède une homologie de structure avec la S1P et se lie à des récepteurs de la famille Edg (Goetzl & An, 1998) inhibe la prolifération des myélocytes (Tigyi, Dyer & Miledi, 1994) en augmentant la concentration intracellulaire d'AMPc. En revanche, l'effet mitogénique de la S1P, comme celui du LPA, a été caractérisé dans de nombreuses cellules (Goetzl & An, 1998), notamment les cellules gliales (Sato *et al.*, 1999) ou les fibroblastes Swiss3T3 (Goodemote *et al.*, 1995). Cet effet implique une activation soit de la voie Ras/Raf/ERK, soit celle de la phospholipase C et de la protéine kinase C. L'effet mitogénique de la S1P peut être médié par des récepteurs Edg, notamment Edg-1 qui couplé à une protéine Gi/o, active la voie Ras/Raf/ERK (Wu, Spiegel & Sturgill, 1995). Il a également été attribué à une augmentation de S1P intracellulaire en réponse à des facteurs de croissances (Olivera & Spiegel, 1993).

### ***Voies de transduction activées par la S1P dans les CEFm humaines***

La voie PG/AMPC joue un rôle essentiel dans l'effet antiprolifératif, notamment de l'ET-1, sur les CEFm (Mallat *et al.*, 1996). Nous avons donc étudié l'effet de la S1P et des autres sphingolipides sur la production d'AMPC dans les CEFm (figure 4). La S1P active la production d'AMPC de 15 fois après 10 minutes d'incubation alors que la sphingomyelinase, le C2-céramide et la sphingosine n'ont aucun effet.

Certaines prostaglandines (PG) produites par la voie des COX (PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub>) ont pour second messager l'AMPC. Dans les CEFm, nous avons observé que l'augmentation d'AMPC activée par ET-1 est relayée par une production de PGE<sub>2</sub> et de PGI<sub>2</sub> (Mallat *et al.*, 1996). Nous avons donc étudié l'implication des PG dans l'augmentation d'AMPC stimulée par la S1P en utilisant deux inhibiteurs de COX. L'ibuprofène, un inhibiteur non sélectif COX-1/COX-2 qui bloque totalement le relargage de PGE<sub>2</sub> en réponse à l'ET-1 (Article 1), et le NS-398 qui inhibe sélectivement la COX-2 (Gierse *et al.*, 1995). Dans les CEFm prétraitées par l'ibuprofène ou le NS-398, la production d'AMPC en réponse au S1P est totalement inhibée (figure 4)

En accord avec la production rapide d'AMPC bloquée par les inhibiteurs de COX, la S1P augmente le relargage de PGE<sub>2</sub> dès 10 minutes (figure 4C). D'autre part, elle la stimule également après 8 heures d'incubation, suggérant l'induction de la COX-2 dans ces conditions. Effectivement, l'analyse par Western blotting montre que la S1P induit la COX-2 après 8 heures et 14 heures d'incubation (figure 5A).

Enfin, nous avons étudié le rôle de la COX-2 dans l'inhibition de croissance par la S1P, en utilisant le NS-398. L'effet antiprolifératif de la S1P est réduit en présence de NS-398.

Nos résultats mettent en évidence que l'inhibition de la prolifération des CEFm par la S1P implique d'une part une production rapide de PG par la voie COX-2, conduisant à une élévation du taux d'AMPC intracellulaire, et d'autre part une augmentation plus tardive de l'expression de la COX-2. Une production d'AMPC en réponse à la S1P a déjà été décrite dans des cellules CHO surexprimant le récepteur EDG-5 (Gonda *et al.*, 1999) ou dans les cellules musculaires lisses artérielles (Bornfeldt *et al.*, 1995). Cependant, la production d'AMPC n'avait jamais été reliée à une inhibition de croissance, bien que l'AMPC soit un second messager antiprolifératif dans de nombreuses cellules (Bornfeldt *et al.*, 1997; Crespo *et al.*, 1995). Il faut cependant noter que le LPA, qui possède une homologie de structure avec

la S1P, inhibe la prolifération des myelocytes (Tigyi *et al.*, 1994) en augmentant la production d'AMPc.

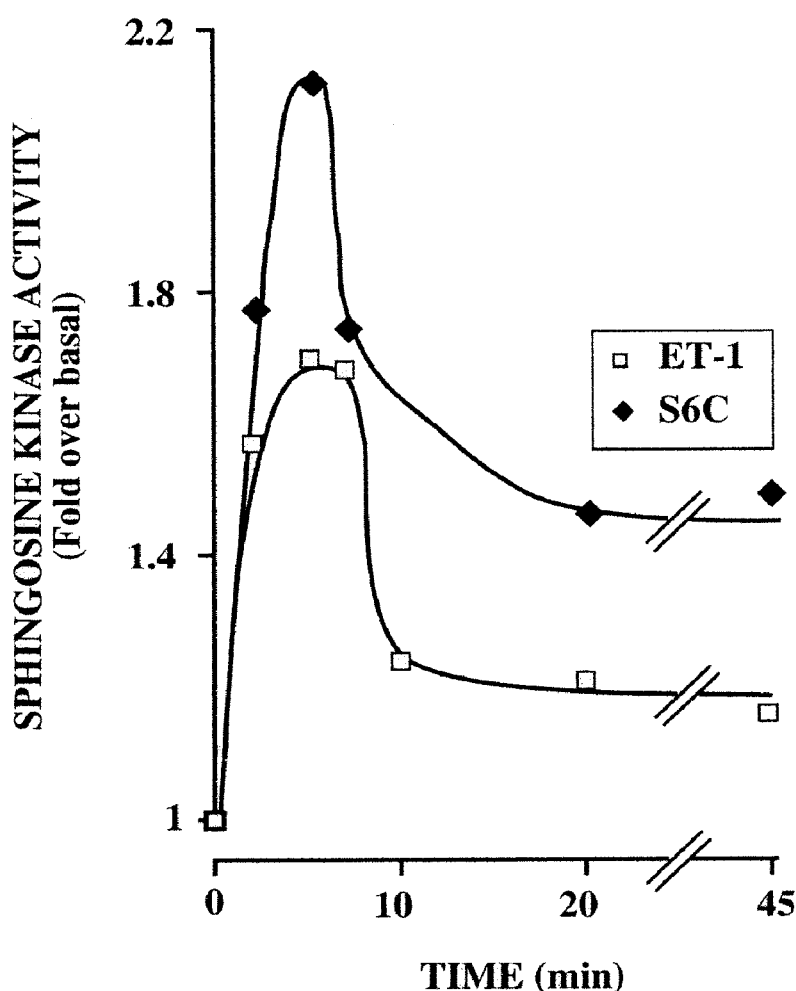
Nous avons démontré l'implication de la COX-2 dans l'inhibition de la croissance des CEFm. Ainsi, l'ET-1, le PDGF-BB ou la thrombine (Article 3) activent rapidement la production de PGE2. De plus, ces facteurs, ainsi que le TNF- $\alpha$  augmentent l'expression de cette enzyme (Article 1 et 3). La S1P est donc un nouveau facteur antiprolifératif agissant par l'intermédiaire de la COX-2. Ces résultats renforcent le rôle de la COX-2 dans la régulation négative de la prolifération des CEFm.

### ***La S1P est un second messenger de l'ET-1 dans les CEFm humaines***

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié si la S1P pouvait être le second messenger de l'ET-1 dans les CEFm humaines. Plusieurs arguments nous ont conduit à émettre cette hypothèse. Tout d'abord, la S1P emprunte les mêmes voies de signalisation que l'ET-1 pour inhiber la prolifération des CEFm. De plus, les effets antiprolifératifs de la S1P sur les CEFm nécessitent des concentrations micromolaires de S1P, incompatibles avec l'affinité nanomolaire des récepteurs EDG pour la S1P (Goetzl & An, 1998). Enfin, il a déjà été montré que l'ET-1 activait des enzymes de la voie des sphingolipides, puisqu'elle stimule l'activité SMase dans le cortex cérébral et l'activité céramidase dans le cervelet (Catalan *et al.*, 1996).

Nous avons utilisé deux inhibiteurs compétitifs de sphingosine kinase qui sont des analogues structuraux de la sphingosine, le substrat de cette enzyme. Ces inhibiteurs, la D-erythro-diméthylsphingosine (DMS) et la DL-threo-dihydrosphingosine (DLT) réduisent l'augmentation de PGE2 et d'AMPc stimulées par l'ET-1 ou la S6c, un agoniste des récepteurs ETB. En revanche, le DMS et le DLT ne modifient pas la production d'AMPc activée par la S1P, ce qui montre leur spécificité d'action (Figure 14).

### *L'ET-1 stimule la sphingosine kinase*



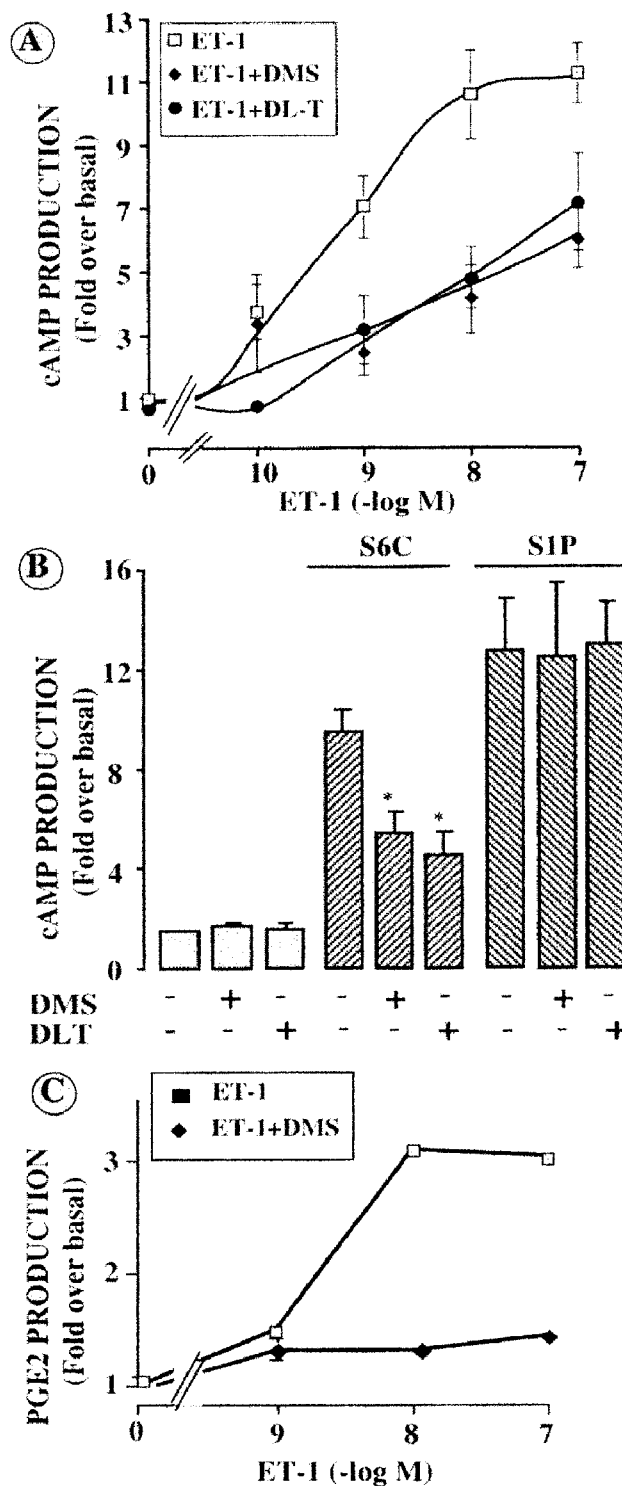
**Figure 13 : L'ET-1 et la Sarafotoxine S6c stimule l'activité sphingosine kinase des CEFm humaines**

(Des CEFm humaines confluentes sont mises en quiescence par déprivation de sérum durant trois jours. Les cellules sont ensuite stimulées avec 100 nM d'ET-1 (Carré) ou 100 nM de S6c (Losange) pendant le temps indiqué. Ces résultats représentent la moyenne de trois expériences.)

Nous avons également mesuré l'activité sphingosine kinase dans des lysats cellulaires stimulés pendant différents temps avec l'ET-1 ou la S6c. Nous avons observé que l'ET-1 stimule l'activité sphingosine kinase après 2 à 5 minutes d'incubation. Cette augmentation est transitoire et son amplitude comparable à celle décrite pour d'autres agonistes se liant soit à des récepteurs à activité tyrosine kinase, soit couplés aux protéines G. Par ailleurs, la sarafotoxine S6c, un agoniste des récepteurs antiprolifératifs ETB reproduit l'activation de la sphingosine kinase, montrant ainsi que le récepteur ETB est impliqué dans l'activation de la



sphingosine kinase (Figure 13). Il avait déjà été montré que l'ET-1 stimulait la SMase et



**Figure 14 : Les inhibiteurs de sphingosine kinase bloquent la production de PGE2 et d'AMPc stimulée par l'ET-1**

(Des CEFm humaines confluentes sont mises en quiescence par déprivation de sérum durant trois jours. Les cellules sont préincubées une heure avec 10  $\mu M$  de DMS ou 20  $\mu M$  de DLT. Les cellules sont ensuite stimulées avec de l'ET-1 aux concentrations indiquées ou 100nM de Sarafotoxine S6c ou 10  $\mu M$  de S1P pendant 10 minutes. Ces résultats représentent la moyenne de trois expériences.)

augmentait ainsi la production de céramide dans le cerveau de rat via les récepteurs ETB (Catalan *et al.*, 1996), mais les évènements en aval de la cascade n'avaient pas été étudiés.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'ET-1 via son récepteur ETB active la production de S1P. La S1P agirait comme second messenger antiprolifératif de l'ET-1 en augmentant la production de PG puis d'AMPc. Il s'agit donc d'une nouvelle mise en évidence du rôle de second messenger de la S1P pour un récepteur couplé aux protéines G. Ces données renforcent celles obtenues dans deux études récentes montrant que la S1P médie les effets biologiques d'agonistes se liant à des récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi, la mobilisation du calcium stimulée par le formyl peptide dans les HL-60 (Alemany *et al.*, 1999) ou par l'acétylcholine dans les cellules HEK-293, implique l'activation de la sphingosine kinase. Des résultats récents obtenus par notre groupe démontrent la présence de récepteurs pour la S1P dans les CEFm. Nous n'excluons donc pas que la S1P puisse également agir sur la prolifération des CEFm par l'intermédiaire de ses récepteurs, comme cela a été décrit pour son effet mitogénique dans d'autres cellules (Goodemote *et al.*, 1995).

La prolifération des CEFm étant l'un des évènements importants dans le développement de la fibrose hépatique, nos résultats suggèrent que la S1P pourrait réguler négativement la fibrose hépatique.

**ARTICLE 3**

## VII. Introduction

Le PDGF-BB et la thrombine sont mitogéniques pour les CEFm (Marra *et al.*, 1995; Pinzani *et al.*, 1991) et leur expression est fortement augmentée au cours de la cirrhose tant dans les modèles expérimentaux que chez l'homme (Pinzani *et al.*, 1996c Ostermann, Kirchhof & Pott, 1982). Les voies de transduction impliquées dans l'activation de la prolifération sont bien caractérisées pour le PDGF et incluent la stimulation de la voie Ras/Raf/ERK. Cependant, il a été décrit que le PDGF-BB pouvait également augmenter l'AMPc (Albrecht & Tidball, 1997; deBlaquiere *et al.*, 1994; Graves *et al.*, 1996; Rozengurt *et al.*, 1983; Throckmorton, Dickinson & Dransfield, 1996) un inhibiteur de la voie ERK (Mallat *et al.*, 1996).

La thrombine se lie à des récepteurs couplés aux protéines G et inhibe dans la plupart des cellules l'augmentation d'AMPc. Cependant, une stimulation de la production d'AMPc a été observée dans quelques études (Asselin & Fortier, 1996; Pouyssegur & Seuwen, 1992; Vittet *et al.*, 1992).

Dans l'article 3, nous montrons que la thrombine et le PDGF-BB stimulent la production rapide de PGE2 et d'AMPc ainsi qu'une augmentation tardive de PGE2 via la COX-2. En bloquant la voie COX antiproliférative, on augmente la stimulation de la prolifération en réponse à ces deux facteurs. Ces résultats suggèrent que l'effet du PDGF-BB et de la thrombine sur la prolifération des CEFm résulte d'une balance entre un effet mitogénique et un effet antiprolifératif impliquant la voie COX-2.

## Platelet-derived Growth Factor-BB and Thrombin Generate Positive and Negative Signals for Human Hepatic Stellate Cell Proliferation

ROLE OF A PROSTAGLANDIN/CYCLIC AMP PATHWAY AND CROSS-TALK WITH ENDOTHELIN RECEPTORS\*

(Received for publication, December 24, 1997, and in revised form, June 18, 1998)

Ariane Mallat‡, Cyrille Gallois, Jiangchuan Tao, Aïda Habib§, Jacques Maclouff§, Philippe Mavier, Anne-Marie Préaux, and Sophie Lotersztajn

From the *Unité INSERM 99, Hôpital Henri Mondor, 94010 Créteil, France and the §Unité INSERM 348, Institut Fédératif de Recherche Circulation Lariboisière, Hôpital Lariboisière, 75010 Paris, France*

**Proliferation of myofibroblastic hepatic stellate cells (HSC) in response to growth factors is essential for the development of liver fibrosis. We have reported that prostaglandins (PG) and cyclic AMP (cAMP) inhibit growth of human HSC. This PG/cAMP pathway transduces the endothelin (ET) B-mediated antiproliferative effect of endothelin-1 (ET-1) and up-regulates ETB receptors. Here, we show that platelet-derived growth factor (PDGF)-BB and thrombin, although mitogenic, generate growth inhibitory PGE<sub>2</sub> in myofibroblastic human HSC. The two peptides elicit early PGE<sub>2</sub> and cAMP synthesis, and also promote delayed induction of cyclooxygenase (COX)-2. Both early and delayed production of PGE<sub>2</sub> counteract the mitogenic effect of PDGF-BB and thrombin because: (i) pretreatment with the COX inhibitor ibuprofen markedly enhances the mitogenic effect of both peptides; (ii) blocking early synthesis of PGE<sub>2</sub> greatly enhances extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by both growth factors; (iii) enhancement of DNA synthesis by ibuprofen is only lost when the inhibitor is added after COX-2 induction has occurred. Finally, PDGF-BB and thrombin raise ETB receptors through the PG pathway. Thus, ibuprofen blunts growth factor-induced increase in ETB receptors. Up-regulation of the growth inhibitory ETB receptors by both mitogens may enhance the antiproliferative effect of ET-1 and thereby establish a negative feedback of their mitogenic effect. Our results shed light on novel growth inhibitory signals evoked by two mitogenic growth factors expressed during liver injury.**

(1, 2). In response to growth factors and cytokines expressed by neighboring cells, myofibroblastic HSC display enhanced mitogenicity and synthesize increased amounts of extracellular matrix (1). Experimental models of liver injury have shown that increased proliferation of myofibroblastic HSC results in accumulation of cells in the liver (3, 4). Among soluble factors that enhance HSC proliferation, PDGF-BB is the most potent mitogen for myofibroblastic HSC in culture and its effects have been extensively studied (5, 6). Expression of PDGF and of its tyrosine kinase receptors is induced during the process of activation, as shown in cirrhotic human liver, in experimental models of liver injury, and in cultured HSC (7–9). Thrombin is also mitogenic for these cells, and myofibroblastic HSC show increased expression of its receptor during liver injury (10, 11).

Given the highly proliferative capacity of myofibroblastic HSC, several studies have focused on factors that may limit their growth (12–15). We and others have recently shown that PGE<sub>2</sub> and cAMP inhibit proliferation of human myofibroblastic HSC (15, 16). We also found that binding of endothelin-1 (ET-1) to its ETB receptor stimulates production of prostaglandins that in turn elevate cAMP, resulting in a growth inhibitory effect of the peptide (13, 15). In addition, PG and cAMP up-regulate ETB receptors, which may amplify the antiproliferative effect of ET-1 (13, 15).

Although PDGF-BB stimulates cell proliferation by activating key effectors, including ras, raf, and the extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade (17), it has also been reported that the peptide may increase synthesis of cAMP (18–22). Thrombin inhibits adenylyl cyclase in most cells, but increases in cAMP production have also been reported in a few instances (23–25). In the present study, we have used a model of cultured human myofibroblastic HSC that displays the phenotypic and functional characteristics of HSC found *in situ* during hepatic fibrogenesis (26). We show that, in myofibroblastic HSC, thrombin and PDGF-BB evoke a growth inhibitory PG/cAMP signal that reduces their promitogenic effects by (i) counteracting the transduction pathway stimulated by mitogenic signals and (ii) increasing the density of growth inhibitory ETB receptors.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials.** ET-1 was from Novabiochem (France), PDGF-BB from Life Technology (United Kingdom), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) from Preprotech, and human thrombin from Sigma (France). Forskolin and ibuprofen were obtained from Sigma (France) and dissolved in dimethyl sulfoxide and ethanol, respectively. *l*-methyl-<sup>3</sup>H-thymidine (25 Ci/mmol), [<sup>32</sup>P]-ATP (5,000 Ci/mmol), and LM1 emulsion were from Amersham (France). Fetal calf serum was from JBio Laboratories (France). Pooled human AB positive serum was supplied by the National Transfusion Center (France).

**Cell Isolation and Culture.** Human HSC were obtained in their activated phenotype by outgrowth from explants of normal liver ob-

Hepatic stellate cells (HSC),<sup>1</sup> also known as lipocytes, fat-storing cells, or perisinusoidal cells, play a crucial role in the development of liver fibrosis (1). Following acute or chronic liver injury, HSC undergo transdifferentiation to an activated myofibroblastic phenotype with *de novo* functional properties

\* This work was supported by the INSERM, the Université Paris-Val-de-Marne, the Association pour la Recherche sur le Cancer, and the Ligue Départementale du Val de Marne de la Recherche contre le Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† This paper is dedicated to the memory of our esteemed friend and collaborator who died on July 14, 1998.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-49-81 35 30; Fax: 33-1-48-98 09 08; E-mail: mallat@im9.inserm.fr.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: HSC, hepatic stellate cells; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; COX, cyclooxygenase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; ET, endothelin; IGF-1, insulin growth factor-1; PDGF-BB, platelet-derived growth factor-BB; PG, prostaglandins; PBS, phosphate-buffered saline; ANOVA, analysis of variance.

tained following surgery of benign or malignant liver tumors. This procedure is in accordance with ethical regulations imposed by the French legislation. Explants were incubated, as described previously, in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% serum (5% fetal calf serum, 5% pooled human serum) (26). Exhaustive characterization of these cells has already been published (26). Cell isolates were routinely characterized by a positive staining for smooth muscle  $\alpha$ -actin, a marker of HSC in their myofibroblastic phenotype. Experiments were performed between passages 3 and 8 without any noticeable difference in results observed with cells obtained from various passages, or from various livers. All experiments were performed on confluent cells made quiescent in serum-free Waymouth medium over 3 days.

**cAMP Assay.**—Cells were seeded in 24-well plates, grown to confluence, and deprived of serum for 48 h in Waymouth medium. Following preincubation with 0.6 mM isobutylmethylxanthine for 15 min, HSC were stimulated in phosphate-buffered saline with effectors. When indicated, cells were preincubated for 30 min with the cyclooxygenase inhibitor ibuprofen (50  $\mu$ M) or vehicle (ethanol). Assays were performed in duplicate. cAMP was extracted in 95% ethanol for 2 h at 25 °C, and extracts were stored at -80 °C, pending assay (15). cAMP was assayed by a commercial radioimmunoassay (Immunotech, France).

**Prostaglandin Release.**—Confluent monolayers in 24-well plates were deprived of serum for 48 h, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), and further incubated in Waymouth medium. Following pretreatment with ibuprofen 50  $\mu$ M or vehicle, cells were stimulated with growth factors as indicated, over various periods of time. Release of PGE<sub>2</sub> was assayed by a specific enzyme immunoassay, as described previously (27).

**DNA Synthesis Assay.**—DNA synthesis was measured in triplicate wells by incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine, as described previously (14). Confluent HSC were made quiescent by incubation in Waymouth medium without serum for 48 h. Cells were then stimulated for 30 h with growth factors, following pretreatment for 30 min with ibuprofen (50  $\mu$ M) or vehicle. [<sup>3</sup>H]Thymidine (0.5  $\mu$ Ci/well) was added during the last 6 h of incubation.

Thymidine incorporation was also assessed by nuclear autoradiography (12). Briefly, confluent quiescent HSC in 35-mm plates were stimulated for 30 h with growth factors following treatment with ibuprofen or its vehicle. [<sup>3</sup>H]Thymidine (2  $\mu$ Ci/ml) was added during the last 6 h of incubation. Cultures were washed in PBS, fixed in 3% paraformaldehyde for 30 min, and dehydrated with 100% methanol. They were covered with LM1 emulsion (Amersham, France) and exposed for 3 days. Labeling was developed with Kodak Dektol developer and fixed with Kodak Unifix. Cells were counterstained in eosin and hemalun. Results were expressed as the ratio of nuclei with overlapping silver grains to the total number of nuclei. Data from 5 to 10 random low magnification fields per culture were averaged.

**ERK Assays.**—Confluent cells in 60-mm wells were deprived of serum for 48 h and further stimulated with growth factors following preincubation with ibuprofen (50  $\mu$ M, 30 min) or vehicle (ethanol). The reaction was terminated by washing the cell cultures twice with 6 ml of ice-chilled PBS. Cells were lysed for 30 min at 4 °C in 0.3 ml of 50 mM HEPES, pH 7.4, containing 1% Triton X-100, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 0.1 mM dithiothreitol, 1 mM EGTA, 5 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 50  $\mu$ g/ml pepstatin, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, and 10 mM paranitrophenylphosphate. Lysates were centrifuged at 1 °C for 15 min at 12,000  $\times$  g. The supernatants were either used directly, or frozen at -70 °C. Extracellular signal-regulated kinase activity was assayed *in situ* following electrophoresis of equal amounts of cell lysates (40  $\mu$ g of proteins), on a 10% SDS-polyacrylamide gel copolymerized with 0.5 mg/ml myelin basic protein, as described previously (13). Phosphorylated gels were exposed to x-ray films, and ERK activity was quantified by using a PhosphorImager (Molecular Dynamics, France).

**Western Blotting Analysis of COX Protein Expression.**—Confluent HSC in 12-well plates were made quiescent in serum-free Waymouth medium over 3 days. HSC were then incubated for various periods of time with either 20 ng/ml PDGF-BB, 5 units/ml thrombin, 200 ng/ml IGF-1, or vehicle. After a wash in ice-cold PBS, cells were lysed for 15 min at 4 °C in whole cell extraction buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, containing 0.5% Nonidet P-40, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 1 mM EGTA, pH 8, 10 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.1 mM dithiothreitol). Lysates were centrifuged at 20,000  $\times$  g for 10 min at 4 °C, and the supernatants (whole cell extract) were stored at -80 °C until use.

After electrophoresis on a denaturing SDS-gel, proteins (20  $\mu$ g/lane)

were electroblotted onto nitrocellulose membranes and blocked for 1 h at room temperature in 10 mM Tris, pH 8, containing 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 5% skimmed milk. Detection of COX-1 (28) and COX-2 (29) was performed after incubation for 2 h at room temperature with their specific antibody diluted 1:2000- and 1:5000-fold, respectively. After 1 h of incubation with 2000-fold diluted horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody and extensive washings, immunodetected proteins were visualized by using an enhanced chemiluminescence (ECL) assay kit (Amersham) according to the instructions of the manufacturer.

**Binding of [<sup>125</sup>I]-ET-1 to a Particulate Fraction of HSC.**—Confluent monolayers were deprived of serum for 48 h and subsequently stimulated with growth factors, following pretreatment with 50  $\mu$ M ibuprofen or vehicle (ethanol). A particulate fraction was obtained (13) and binding of [<sup>125</sup>I]-ET-1 was measured as described previously (30). Briefly, the HSC particulate fraction (5–10  $\mu$ g of proteins) was incubated for 90 min at 22 °C in 200  $\mu$ l of Krebs-Ringer medium containing 20 mM HEPES, pH 7.4, 1% (w/v) bovine serum albumin, 300  $\mu$ g/ml bacitracin, with either 50 pM [<sup>125</sup>I]-ET-1 and varying concentrations of cold ET-1, sarafloxacin S66 or BQ123 (competition experiments), or varying concentrations of [<sup>125</sup>I]-ET-1 (4.5–800 pM, saturation experiments). Nonspecific binding was determined by incubating with 0.1  $\mu$ M unlabeled ET-1. Data from saturation and competition experiments were analyzed using the nonlinear regression program LIGAND.

**Assay of Protein Concentration.**—Protein concentration was measured using a commercial reagent (Bio-Rad, France).

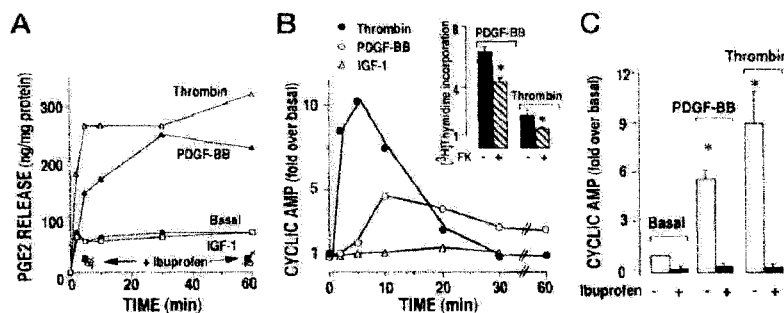
**Statistics.**—Results were analyzed by 2-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements, Wilcoxon's signed rank test, or unpaired Student's *t* test, as appropriate.

## RESULTS

**PDGF-BB and Thrombin Stimulate the Synthesis of the Growth Inhibitory Messengers PGE<sub>2</sub> and cAMP in Human Myofibroblastic HSC.**—Treatment of human myofibroblastic HSC with mitogenic concentrations of thrombin and PDGF-BB increased the production of PGE<sub>2</sub> (Fig. 1A). Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis increased within 2 min in the presence of thrombin and was maximally elevated by 4-fold over basal after 5 min. The time course of the effect of PDGF-BB on PGE<sub>2</sub> release was slightly delayed, rising after 5 min and reaching a maximal 4-fold increase over basal at 30 min. The COX inhibitor ibuprofen blunted the elevation of PGE<sub>2</sub> production elicited by PDGF-BB and thrombin. Both PDGF-BB and thrombin also stimulated cAMP production (Fig. 1B). In the presence of thrombin, cAMP concentration rose within 1 min, maximally increased to 7–10-fold by 2 min, and rapidly declined after 10 min. Following PDGF-BB treatment, cAMP increased by 5-fold within 10 min and decreased gradually thereafter. Thrombin and PDGF-BB increased cAMP through prostaglandin production because ibuprofen blunted the enhancement of cAMP production elicited by both peptides (Fig. 1C). Similar results were obtained when cells were stimulated with 5% human serum instead of purified growth factors (not shown). In contrast, IGF-1 at a concentration mitogenic for HSC (100 ng/ml) (Fig. 3), did not affect either PGE<sub>2</sub> or cAMP levels (Fig. 1, A and B). Ibuprofen also decreased basal cAMP levels from 330 to 60 fmol/mg protein by blocking endogenous synthesis of PG (Fig. 1C).

Taken together, these results indicate that PDGF-BB and thrombin, but not IGF-1, stimulate synthesis and secretion of PGE<sub>2</sub> (Fig. 1), a prostaglandin which increases cAMP production in an autocrine fashion (15). Inasmuch as PGE<sub>2</sub> and cAMP inhibit growth factor-stimulated proliferation of myofibroblastic HSC (Fig. 1B, *inset*; Ref. 15), our results indicate that both PDGF-BB and thrombin, although mitogenic for HSC, generate second messengers that are growth inhibitory for these cells.

**Stimulation of the PG/cAMP Pathway by PDGF-BB and Thrombin Down-regulates Their Mitogenic Effects.**—The following experiments were undertaken to assess the consequences of the stimulation of the PG/cAMP pathway on the mitogenic properties of PDGF-BB and thrombin. Therefore, DNA synthe-

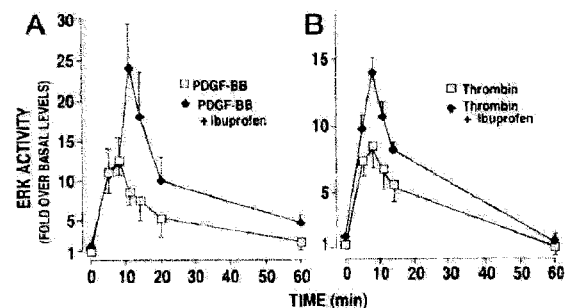


**FIG. 1. PDGF-BB and thrombin increase cAMP indirectly through prostaglandin synthesis, whereas cAMP inhibits their mitogenic effects.** *A*, time course of PGE<sub>2</sub> production in response to PDGF-BB, thrombin, and IGF-1. Confluent quiescent cells were pretreated with 50  $\mu$ M ibuprofen or vehicle for 30 min and subsequently (time 0) exposed to PDGF-BB (20 ng/ml), thrombin (5 units/ml), or IGF-1 (200 ng/ml) for various periods of time (2–60 min). PGE<sub>2</sub> release was assayed by enzyme immunoassay, as described under “Experimental Procedures.” Results show a typical experiment repeated twice. *B*, time course of cAMP production in response to PDGF-BB, thrombin, and IGF-1. Confluent quiescent HSC were exposed to PDGF-BB (20 ng/ml), thrombin (5 units/ml), or IGF-1 (100 ng/ml) for various periods of time. cAMP was extracted and measured as described under “Experimental Procedures.” Results are the mean of two independent experiments and are expressed as -fold over basal levels (220 fmol/mg protein). *Inset*, cAMP inhibits the mitogenic effect of PDGF-BB and thrombin. Confluent quiescent cells pretreated with 10  $\mu$ M forskolin or its vehicle were stimulated with PDGF-BB (20 ng/ml) or thrombin (5 units/ml) and pulsed with [<sup>3</sup>H]thymidine. [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation into DNA was measured as described under “Experimental Procedures.” Results (mean  $\pm$  S.E.,  $n = 3$ –4 experiments) are expressed as -fold over basal (630  $\pm$  210 cpm;  $p < 0.05$  for effect of forskolin). *C*, ibuprofen blunts the effect of PDGF-BB and thrombin on cAMP production. Confluent quiescent cells were pretreated for 30 min with 50  $\mu$ M ibuprofen or vehicle and were stimulated with PDGF-BB (20 ng/ml) or thrombin (5 units/ml) for 10 min (mean  $\pm$  S.E.;  $n = 3$ ;  $p < 0.05$  compared with untreated cells).

sis and ERK activation were assayed following blockade of this pathway by the COX inhibitor ibuprofen.

It is well established that activation of ERK by growth factors is an important early step preceding cell proliferation [17, 31]. PDGF-BB rapidly stimulated ERK, inducing a maximal activation within 5 to 10 min, followed by a decrease to a sustained level for at least 1 h (Fig. 2A). Stimulation of ERK by thrombin showed a peak at 5–10 min and returned to basal levels within 1 h (Fig. 2B). Pretreatment of cells with ibuprofen pretreatment markedly potentiated the activation profile of ERK by PDGF-BB or thrombin. In the presence of the COX inhibitor, peak activation of ERK by PDGF-BB was achieved after 10 min. The compound did not affect stimulation of ERK by PDGF-BB at early time points but synergistically enhanced ERK activation from 10 min onward (Fig. 2A). Activation of ERK by thrombin was also markedly potentiated by ibuprofen, although as early as 5 min (Fig. 2B). Finally, the COX inhibitor moderately enhanced basal ERK activity, by preventing endogenous release of PG. It should be noted that PDGF-BB has a delayed effect on PGE<sub>2</sub> and cAMP synthesis, as compared with thrombin (Fig. 1). This time frame is in keeping with the potentiating effect of ibuprofen on ERK activation by PDGF-BB and thrombin (Fig. 2).

Ibuprofen pretreatment synergistically enhanced the mitogenic effects of thrombin and PDGF-BB at all concentrations tested (Fig. 3, A and B). The COX inhibitor increased basal DNA synthesis by 2-fold. In contrast, ibuprofen pretreatment maximally increased DNA synthesis of PDGF-BB-treated cells by 10–11-fold, as compared with the 4-fold increase in cells exposed to PDGF-BB alone ( $p < 0.001$  by 2-way ANOVA). Thrombin alone caused a 2-fold increase of thymidine incorporation, which rose to 7-fold following ibuprofen pretreatment ( $p < 0.001$  by 2-way ANOVA). Similar results were obtained when cells were stimulated with 5% human serum instead of purified growth factors (not shown). As expected, the cyclooxygenase inhibitor did not potentiate the effect of IGF-1 on DNA synthesis (Fig. 3C). The synergistic effect of ibuprofen on PDGF-BB or thrombin-induced mitogenesis was confirmed by nuclear autoradiography experiments (Fig. 3D). Altogether, these data indicate that in myofibroblastic HSC, PDGF-BB and thrombin stimulate a PG/cAMP pathway that reduces activation of ERK and decreases their effects on cell proliferation.

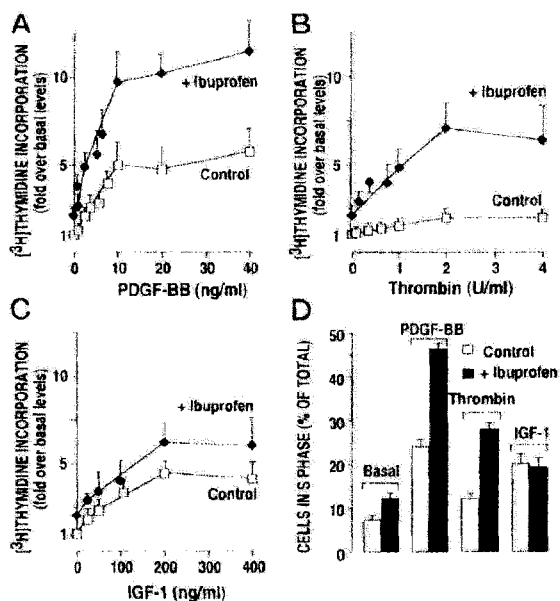


**FIG. 2. Ibuprofen potentiates activation of ERK by PDGF-BB and thrombin in human myofibroblastic HSC.** Confluent quiescent cells were pretreated for 30 min with 50  $\mu$ M ibuprofen or its vehicle and stimulated with 20 ng/ml PDGF-BB (*A*) or 5 units/ml thrombin (*B*) for various periods of time. ERK activity was measured as described under “Experimental Procedures” and quantified by phosphorimager analysis. Results are the mean  $\pm$  S.E. of three to four experiments.

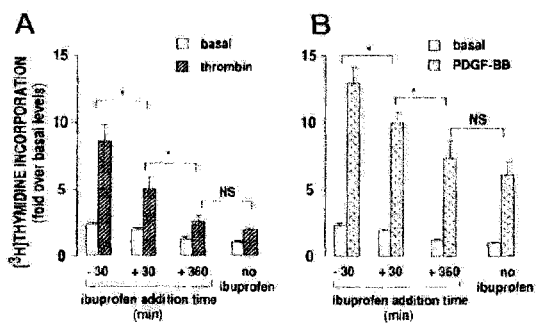
The role of the PG/cAMP pathway was further supported by experiments in which ibuprofen was added at various times before or after the introduction of growth factors. As shown above, introduction of ibuprofen 30 min before the addition of thrombin ( $t = 30$  min) maximally enhanced the mitogenic effect of the peptide (Fig. 4A). Addition of ibuprofen 30 min after that of thrombin ( $t + 30$  min) also synergistically enhanced its mitogenic effect although to a lower extent (5-fold at  $t + 30$  min, as compared with 9.5-fold at  $t - 30$  min,  $p < 0.001$  by 2-way ANOVA). The potentiating effect of ibuprofen was no longer observed when the compound was added 6 h after thrombin. Similar results were obtained when cells were stimulated with PDGF-BB instead of thrombin (Fig. 4B). These data indicate that growth factors stimulate early as well as late production of PGE<sub>2</sub>.

Late synthesis of PGE<sub>2</sub> could be demonstrated by studying the regulation of inducible type 2 cyclooxygenase (COX-2) expression. As shown in Fig. 5, a 6-h treatment with PDGF-BB and thrombin up-regulated COX-2 expression, whereas IGF-1 had no effect. In contrast, PDGF-BB and thrombin did not alter COX-1 protein expression (Fig. 5).

Altogether, these results show that both early and late pro-



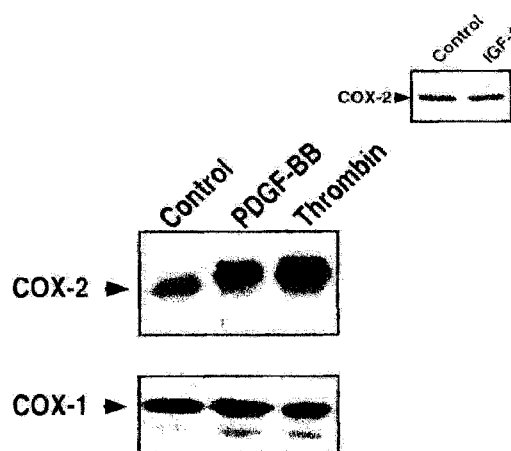
**FIG. 3. Ibuprofen synergistically enhances the mitogenic effect of PDGF-BB and thrombin but not that of IGF-1.** A-C, effect of ibuprofen on  $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation in response to PDGF-BB (A), thrombin (B), or IGF-1 (C). Confluent quiescent cells were pre-treated for 30 min with 50  $\mu\text{M}$  ibuprofen or its vehicle and stimulated with varying concentrations of PDGF-BB (A), thrombin (B), or IGF-1 (C).  $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation into DNA was assayed as described under "Experimental Procedures." Results are the mean  $\pm$  S.E. of five experiments and are expressed as fold over basal levels measured in the absence of ibuprofen. D, nuclear autoradiography. Confluent quiescent cells were treated in the same conditions as above, with 20 ng/ml PDGF-BB, 5 units/ml thrombin or 100 ng/ml IGF-1. The number of replicative cells was assessed as described under "Experimental Procedures." Shown is a typical experiment repeated twice.



**FIG. 4. Time course of the effect of ibuprofen on the mitogenic action of PDGF-BB and thrombin.** Confluent quiescent cells were stimulated with PDGF-BB (20 ng/ml) (A) or thrombin (5 units/ml) (B) at time 0. Ibuprofen (50  $\mu\text{M}$ ) was added to the plates either 30 min before or at various times after introduction of growth factors.  $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation into DNA was assayed at 30 h, as described under "Experimental Procedures." Results are the mean  $\pm$  S.E. of five experiments and are expressed as fold over basal levels measured in the absence of ibuprofen.  $^* p < 0.05$ .

duction of prostaglandins account for the negative regulation of the mitogenic effect of PDGF-BB and thrombin.

**PDGF-BB and Thrombin Up-regulate ET Receptors via a Prostaglandin/cAMP Pathway in Human Myofibroblastic HSC.** We have previously shown, that binding of ET-1 to its ETB receptors inhibits proliferation of human HSC, and that exogenously applied PGE<sub>2</sub> and/or cAMP up-regulate ETB receptors (Refs. 13 and 15; Fig. 7). Therefore, we investigated



**FIG. 5. PDGF-BB and thrombin, but not IGF-1, induce COX-2 protein expression.** Confluent serum-deprived HSC were stimulated for 6 h with PDGF-BB (20 ng/ml), thrombin (5 units/ml), or IGF-1 (200 ng/ml, inset). Cell lysates and Western blot analysis were performed as described under "Experimental Procedures" using a selective antibody directed either against COX-1 or COX-2 protein. A typical autoradiogram is shown, which was reproduced twice.

whether PDGF-BB and thrombin may increase the growth inhibitory ETB receptors via the PG/cAMP pathway.

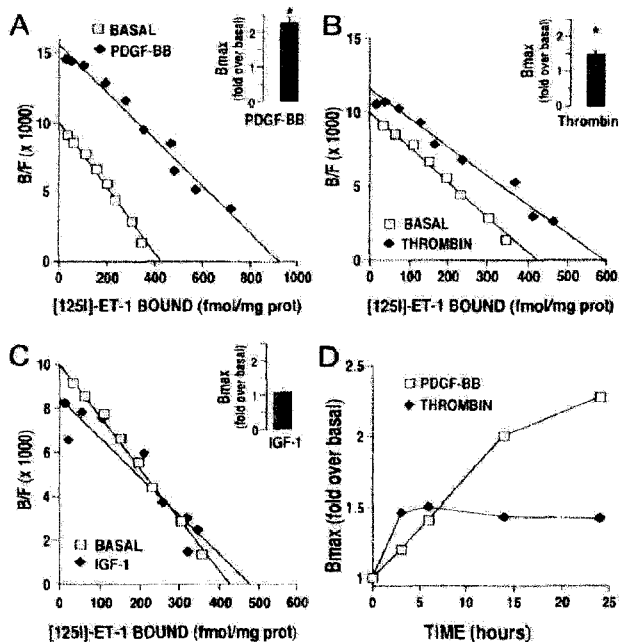
Treatment of HSC for 24 h with PDGF-BB (20 ng/ml) or thrombin (5 units/ml) increased ET-1 binding sites by 2.2- and 1.5-fold, respectively, whereas IGF-1 had no effect (Fig. 6). There was no significant change in the  $K_d$  with either peptide (not shown). The increase in ET receptors was time-dependent. In PDGF-BB-treated cells, the number of receptors rose by 2.2-fold within 14 h and remained elevated until 24 h (Fig. 6A). In thrombin-treated cells, a maximal 1.5-fold increase was found after 3 h, which was unchanged over 24 h (Fig. 6B). We also assessed the effect of PDGF-BB and thrombin on the distribution of ETA and ETB receptors. In control cells, ETA and ETB receptors were present in a proportion of 55:45. Growth factors did not modify the proportion of ET receptors (50:50), so that both ETA and ETB receptors were up-regulated by 2.2- and 1.5-fold in PDGF-BB and thrombin-treated cells, respectively (Fig. 7).

We next examined the role of the PG pathway in the regulation of ET receptors. In unstimulated cells, ibuprofen alone did not affect the number of ETA receptors (control: 211 fmol/mg protein; ibuprofen: 191 fmol/mg protein) but selectively down-regulated ETB receptors by 50% (from 180 fmol/mg protein in control cells to 90 fmol/mg protein in ibuprofen-pretreated cells) by preventing endogenous PG release. Up-regulation of ETA receptors by PDGF-BB and thrombin was not modified following ibuprofen pretreatment (2.0- and 1.5-fold, respectively) (Fig. 7). In contrast, ibuprofen totally down-regulated ETB receptors in PDGF-BB and thrombin-treated cells (Fig. 7). Collectively, these results indicate that PDGF-BB and thrombin increase both ETA and ETB receptors in myofibroblastic HSC. However, blockade of the PG/cAMP pathway specifically blunts the up-regulation of ETB receptors by both peptides.

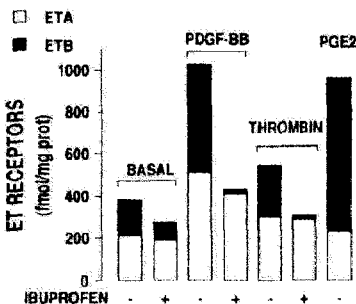
DISCUSSION

In the present study, we demonstrate that in human myofibroblastic HSC, PDGF-BB, and thrombin generate growth inhibitory signals by stimulating a PG/cAMP pathway. Activation of this signal counteracts their mitogenic effects by blocking the transduction pathway leading to HSC' prolifera-





**FIG. 6. PDGF-BB and thrombin up-regulate ET receptors.** Confluent serum-deprived cells were exposed either to medium alone or to 20 ng/ml PDGF-BB (A), 5 units/ml thrombin (B), or 100 ng/ml IGF-1 (C) for 24 h. Shown is a typical experiment. *Insets*, mean  $\pm$  S.E. of  $B_{max}$  ( $n = 4$ ) expressed as fold over basal (354  $\pm$  38 fmo/mg protein;  $p < 0.05$  as compared with basal). *D*, time-course of the effect of PDGF-BB and thrombin on ET binding sites. Results are the mean of two experiments. Binding of  $^{125}$ I-ET-1 was measured on a particulate fraction, as described under "Experimental Procedures." The total number of binding sites ( $B_{max}$ ) was determined at each time point by Scatchard analysis of saturation experiments.



**FIG. 7. PDGF-BB and thrombin up-regulate both ETA and ETB receptors and ibuprofen blunts up-regulation of ETB receptors.** ETA and ETB receptors were determined in competition experiments of  $^{125}$ I-ET-1 binding, using varying concentrations of the ETB agonist sarafloxin-S6C and the ETA antagonist BQ 123, as described under "Experimental Procedures." Results show a typical experiment repeated twice.

tion and by up-regulating ETB receptors for the growth inhibitory peptide ET-1 (13).

Binding of PDGF-BB to its tyrosine kinase receptor and of thrombin to its G protein-coupled receptor stimulate proliferation of a number of cells, including myofibroblastic HSC (17, 23). A striking point of the present study is that, although mitogenic, PDGF-BB and thrombin also generate growth inhibitory  $PGE_2$  in human myofibroblastic HSC (15). The two peptides elicit early  $PGE_2$  production by activating basal COX, resulting in cAMP accumulation (Fig. 1), and also promote delayed induction of COX-2. Both early and delayed production

of  $PGE_2$  negatively regulate the mitogenic effect of PDGF-BB and thrombin. The role of the early synthesis of  $PGE_2$  is demonstrated by two lines of evidence: (i) addition of ibuprofen after the occurrence of the early release of  $PGE_2$  ( $t = 30$  min, see Fig. 4) reduces the potentiating effect of the COX inhibitor on DNA synthesis; and (ii) ibuprofen pretreatment enhances ERK activation by both growth factors within minutes (Fig. 2). The growth inhibitory signal evoked by PDGF-BB and thrombin also involves delayed induction of COX-2 expression; thus, the potentiating effect of ibuprofen on DNA synthesis is suppressed only when the COX inhibitor is added after induction of COX-2 by both peptides has occurred (Fig. 4). In agreement with these data, we recently observed that induction of COX-2 is involved in the antiproliferative effect of ET-1 and TNF- $\alpha$  in human myofibroblastic HSC.<sup>2</sup> We conclude that the mitogenic effects of PDGF-BB and thrombin result from simultaneous stimulatory and inhibitory signals: a growth enhancing pathway, involving activation of ERK; and a growth inhibitory signal mediated by a PG/cAMP pathway, which reduces the mitogenic effect of both growth factors. It should be noted that activation of the PG/cAMP pathway is not a general feature of tyrosine kinase receptor activation. Thus, IGF-1 does not enhance early production of  $PGE_2$  and cAMP, either in human HSC (Fig. 1) or in human vascular smooth muscle cells (18); neither does IGF-1 affect COX-2 protein expression (Fig. 5).

In keeping with our results, recent studies provide evidence that growth factors may positively and negatively regulate cell proliferation, via PG and/or cAMP. In COS-7 cells, isoproterenol raises cAMP and ERK activity, and activation of ERK by isoproterenol is enhanced when blocking the cAMP pathway (32). In human vascular smooth muscle cells, PDGF-BB is mitogenic but also stimulates synthesis of growth inhibitory PG (18, 33). Finally, in human fetal lung fibroblasts, indomethacin suppresses the antiproliferative effect of TGF $\beta$  and restores its mitogenic effect (34). These observations, together with the results of the present study, strongly suggest that a PG and/or cAMP pathway negatively regulates the mitogenic effects of certain growth factors. Interestingly, in NIH3T3 fibroblasts, PDGF-BB activates SIRP $\alpha$ 1 proteins, which in turn counteract the mitogenic effect of the peptide (35). Whether PG and cAMP may activate SIRP $\alpha$ 1 proteins in human HSC remains to be determined.

We have previously shown that ET-1 inhibits proliferation of human myofibroblastic HSC via its ETB receptors. The present study demonstrates that the PG pathway activated by PDGF-BB and thrombin up-regulates ETB receptors. Thus, both growth factors raise the number of ETB binding sites, and ibuprofen blunts this increase. These results are in line with our previous finding that exogenously added  $PGE_2$  and  $PGL_2$  up-regulate ETB receptors in these cells (15). In contrast, IGF-1 does not affect COX-2 protein expression and prostaglandin production and has no effect on the number of ETB receptors. These results clearly establish that PG production plays a central role in the regulation of ETB receptors in human myofibroblastic HSC. Up-regulation of growth inhibitory receptors by mitogens is an important step in the negative control of cell proliferation (36). For instance, epidermal growth factor up-regulates somatostatin receptors and enhances the antiproliferative effect of somatostatin in pancreatic cancer cells (36). Also, transforming growth factor  $\beta$  inhibits proliferation of rat HSC and decreases PDGF receptors (37). Therefore, it may be suggested that up-regulation of ETB receptors by PDGF-BB and thrombin enhances the antiproliferative effect of ET-1 and

<sup>2</sup> Gallois, C., Habib, A., Tao, J., Macleod, J., Mallat, A., and Lereschtein, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 23183-23190.

thereby establishes a negative feedback of their promitogenic effect. Along this line, it should be noted that PDGF-BB and thrombin stimulate secretion of ET-1 in a number of cells, including human HSC, and that expression of ET-1 is markedly increased in the liver during chronic liver diseases (38).

Besides ETB receptors, human myofibroblastic HSC also express ETA receptors, which mediate the contractile effect of ET-1 (13, 39). PDGF-BB and thrombin increase ETA binding sites by a mechanism unrelated to PG production. Interestingly, thrombin enhances contractility of myofibroblastic HSC (40). In this respect, besides its direct contractile effect, the peptide may also indirectly increase HSC contraction by enhancing the effect of ET-1 following up-regulation of ETA receptors.

In experimental models of liver injury and in human chronic liver disease, myofibroblastic HSC proliferate and accumulate in response to cytokines and growth factors produced locally (1). Accordingly, PDGF expression is increased in infiltrating inflammatory cells and within fibrous septa and several lines of evidence suggest that thrombin is also generated in response to liver injury (8–10). Moreover, myofibroblastic HSC show increased levels of PDGF and thrombin receptors during liver injury, and expression of the PDGF receptor has been correlated to the activity of the fibroproliferative process (8–10). Several studies have focused on the molecular mechanisms responsible for the growth-enhancing effects of PDGF-BB and thrombin in human myofibroblastic HSC. Our findings shed light on novel growth inhibitory pathways evoked by these peptides. We show that, in fact, the mitogenic effect of PDGF-BB and thrombin arises from the combined effect of positive and negative signals, the latter transduced by PG and cAMP. The promitogenic signal is counteracted by two PG-dependent mechanisms: (i) a direct negative pathway that inhibits ERK activation and more delayed events involved in proliferation; and (ii) an indirect feedback that may amplify the antiproliferative effect of ET-1 by up-regulating ETB receptors. Our results may have implications for the comprehension of the physiopathology of liver fibrosis. They suggest that the final proliferative response depends on the balance of conflicting positive and negative signals elicited simultaneously by a single growth factor. Further studies are needed to better understand factors that may shift the balance toward growth inhibition and thereby limit proliferation of myofibroblastic HSC during chronic liver disease.

**Acknowledgments** We thank J. Hanoue for permanent support and R. Barouki and F. Pecker for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Friedman, S. L. (1993) *N. Engl. J. Med.* **328**, 1828–1835
- Schmitt-Graff, A., Krüger, S., Bächard, F., Gabbiani, G., and Denk, H. (1991) *Am. J. Pathol.* **138**, 1233–1242
- Greets, A., Lazon, J. M., De-Bloser, P., and Wisse, E. (1993) *Hepatology* **18**, 1193–1202
- Manenti, R., Jézéquel, A. M., Benedetti, A., Paduani, F., Trozzi, J., and Orlandi, F. (1992) *J. Hepatol.* **15**, 361–366
- Marra, F., Gentilini, A., Pinzani, M., Choudhury, G. G., Parola, M., Herbst, H., Dianzani, M. U., Laffi, G., Abboud, H. E., and Gentilini, P. (1997) *Gastroenterology* **112**, 1297–1306
- Failli, P., Ruocco, C., De Franco, R., Caligiuri, A., Gentilini, A., Gotti, A., Gentilini, P., and Pinzani, M. (1995) *Am. J. Physiol.* **269**, C1133–C1139
- Wong, L., Yamasaki, G., Johnson, R. J., and Friedman, S. L. (1994) *J. Clin. Invest.* **94**, 1563–1569
- Pinzani, M., Milani, S., Grappone, C., Weber, F. L., Jr., Gentilini, P., and Abboud, H. E. (1994) *Hepatology* **19**, 701–707
- Pinzani, M., Milani, S., Herbst, H., DeFranco, R., Grappone, C., Gentilini, A., Caligiuri, A., Pellegrini, G., Ngo, D. V., Romanelli, R. G., and Gentilini, P. (1996) *Am. J. Pathol.* **148**, 785–800
- Marra, F., DeFranco, R., Rappone, C., Milani, S., Pinzani, M., Pellegrini, G., Laffi, G., and Gentilini, P. (1998) *Hepatology* **27**, 462–471
- Marra, F., Grandaliamo, G., Valente, A. J., and Abboud, H. E. (1995) *Hepatology* **22**, 780–787
- Mallat, A., Preaux, A.-M., Blazejewski, S., Dhumeaux, D., Rosenbaum, J., and Mavrier, P. (1994) *Hepatology* **20**, 1589–1594
- Mallat, A., Fouassier, L., Preaux, A. M., Serradell-Le Gal, C., Raffaste, D., Rosenbaum, J., Dhumeaux, D., Jouanneau, C., Mavrier, P., and Lotersztajn, S. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 42–49
- Mallat, A., Preaux, A.-M., Blazejewski, S., Rosenbaum, J., Dhumeaux, D., and Mavrier, P. (1995) *Hepatology* **21**, 1003–1010
- Mallat, A., Preaux, A. M., Serradell-Le Gal, C., Raffaste, D., Gallois, C., Brenner, D. A., Bradham, C., Maclof, J., Bourgenko, V., Fouassier, L., Dhumeaux, D., Mavrier, P., and Lotersztajn, S. (1996) *J. Clin. Invest.* **98**, 2771–2778
- Houghum, K., Lee, K. S., and Chojkier, M. (1997) *J. Clin. Invest.* **99**, 1322–1328
- Malarkey, K., Bellam, C. M., Paul, A., Graham, A., McLeay, A., Scott, P. H., and Plevin, R. (1995) *Biochem. J.* **309**, 361–375
- Gravos, L. M., Bornfeldt, K. E., Sidhu, J. S., Argast, G. M., Rames, E. W., Ross, R., Leslie, C. C., and Krebs, E. G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 505–511
- Rozengurt, E., Stroobant, P., Waterfield, M. D., Deuel, T. F., and Keenan, M. (1986) *Cell* **34**, 265–272
- Throckmorton, D. C., Dickinson, M., and Dransfield, D. T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 692–696
- Albrecht, D. E., and Tidball, J. G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2236–2244
- deBlaquiere, J., Walker, F., Michelangeli, V. P., Fabri, L., and Burgess, A. W. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4812–4818
- Pouyssegur, J., and Schaefer, K. (1992) *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 195–210
- Vittek, B., Mathieu, M. N., Lannay, J. M., and Chevillard, C. (1992) *J. Cell. Physiol.* **150**, 65–75
- Asselin, E., and Fortier, M. A. (1996) *J. Cell. Physiol.* **168**, 600–607
- Win, K. M., Charlotte, F., Mallat, A., Cherqui, D., Martin, N., Mavrier, P., Preaux, A. M., Dhumeaux, D., and Rosenbaum, J. (1993) *Hepatology* **18**, 137–145
- Pradellas, P., Grassi, J., and Maclof, J. (1985) *Anal. Chem.* **57**, 1170–1173
- Cremmon, C., Frobert, Y., Habib, A., Maclof, J., Pradellas, P., and Grassi, J. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1254**, 333–340
- Habib, A., Cremmon, C., Frobert, Y., Grassi, J., Pradellas, P., and Maclof, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23438–23454
- Jouanneau, C., Mallat, A., Serradell-Le Gal, C., Goldsmith, P., Hanoue, J., and Lotersztajn, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1845–1851
- Cano, E., and Mahadevan, L. C. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 117–122
- Crespo, P., Cachero, T. G., Xu, N., and Gutkind, J. S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25259–25265
- Bornfeldt, K. E., Campbell, J. S., Koyama, H., Argast, G. M., Leslie, C. C., Rames, E. W., Krebs, E. G., and Ross, R. (1997) *J. Clin. Invest.* **100**, 875–885
- McAnulty, R., Hernandez-Rodriguez, N. A., Mutesaers, S. E., Coker, R. K., and Laurent, G. J. (1997) *Biochem. J.* **321**, 639–643
- Kharitonov, A., Chen, Z., Sures, I., Wang, H., Schilling, J., and Ullrich, A. (1997) *Nature* **386**, 181–186
- Vidal, C., Raulty, I., Zeggari, M., N., D., Esteve, J.-P., Saita-Laurent, N., Vayssie, N., and Susini, C. (1993) *Mol. Pharmacol.* **45**, 97–104
- Davis, B. H., Rapp, U. R., and Davidson, N. O. (1991) *Biochem. J.* **278**, 43–47
- Pinzani, M., Milani, S., De Franco, R., Grappone, C., Caligiuri, A., Gentilini, A., Tosti-Guerra, C., Maggia, M., Failli, P., Ruocco, C., and Gentilini, P. (1996) *Gastroenterology* **110**, 534–548
- Mallat, A., and Lotersztajn, S. (1996) *J. Hepatol.* **25**, 405–413
- Pinzani, M., Failli, P., Ruocco, C., Casini, A., Milani, S., Balbi, E., Gotti, A., and Gentilini, P. (1992) *J. Clin. Invest.* **90**, 642–646

## **DISCUSSION**

### ***La thrombine et le PDGF-BB, facteurs mitogènes et antiprolifératifs***

De façon surprenante, le PDGF-BB et la thrombine à des concentrations activant la prolifération des CEFm, stimulent en deux minutes la production de PGE2 et augmentent le taux d'AMPc (figure 1). Cette production est bloquée par l'ibuprofène, suggérant l'implication des COX. Par ailleurs, ces deux peptides induisent également l'expression du gène de la COX-2 et une production tardive de PGE2 (figure 5). Ces résultats suggèrent que bien que mitogéniques, le PDGF-BB et la thrombine stimulent une voie conduisant à l'inhibition de la prolifération des CEFm. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'ibuprofène sur la prolifération des CEFm stimulées par le PDGF-BB et la thrombine. Nous avons observé une potentialisation de l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine par ces deux mitogènes lorsqu'on bloque l'activité COX par l'ibuprofène (figure 3) et une augmentation de l'activation de ERK par les 2 peptides au bout d'une minute environ (figure 2). Ces résultats suggèrent que les deux facteurs mitogènes pour les CEFm, le PDGF-BB et la thrombine, génèrent des signaux antiprolifératifs en augmentant la voie PG/AMPc et en induisant la COX-2. Cependant, il est important de noter que cet effet double n'est pas généralisable à tous les facteurs mitogènes. En effet, l'IGF-1 ne stimule ni la production d'AMPc (fig 1) ni l'induction de l'expression de la COX-2 (figure 5).

Des études récentes ont également montré que certains facteurs de croissance peuvent réguler positivement et négativement la prolifération cellulaire via la production de PG et d'AMPc. Dans les cellules COS7, l'isoprotérenol augmente l'AMPc et l'activité ERK. L'activation de ERK par l'isoproterenol est potentialisée lorsqu'on bloque l'augmentation d'AMPc (Crespo *et al.*, 1995). Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, le PDGF-BB est mitogène mais active également la production de PG antiprolifératives (Graves *et al.*, 1996; Bornfeldt *et al.*, 1997). Enfin, dans les fibroblastes pulmonaires fœtaux humains, l'indométacine, un inhibiteur de l'activité COX, supprime l'effet antiprolifératif du TGF- $\beta$  et révèle un effet mitogène (McAnulty *et al.*, 1997).

### ***La production de PG par la thrombine et le PDGF-BB augmente le nombre des récepteurs ETB***

Nous avons observé que l'ET-1 inhibe la prolifération des CEFm en se liant à ses récepteurs ETB (Mallat *et al.*, 1995a). Au cours de ce travail, nous avons également démontré

que l'activation de la production de PG en réponse aux facteurs de croissance augmente le nombre de récepteurs ETB.

Le traitement des CEFm par le PDGF-BB et la thrombine conduit à une augmentation du nombre de récepteurs ETA et ETB de 2 à 3 fois. Le prétraitement des CEFm par l'ibuprofène réduit sélectivement l'augmentation du nombre de récepteurs ETB par le PDGF et la thrombine, sans modifier l'augmentation du nombre de récepteurs ETA. Nous avons précédemment montré que les PGE2 et les PGI2 augmentent le nombre de récepteurs ETB (Mallat *et al.*, 1996). L'ensemble de ces résultats démontrent que les PG jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression des récepteurs ETB dans les CEF myofibroblastiques humaines. L'interaction entre des récepteurs relayant des effets antiprolifératifs et des mitogènes est un processus important dans la régulation de la prolifération de nombreux types cellulaires (Vidal *et al.*, 1994). Ainsi, l'EGF augmente le nombre de récepteurs de la somatostatine et augmente l'effet antiprolifératif de ce peptide dans les cellules cancéreuses pancréatiques (Vidal *et al.*, 1994). De même, le TGF- $\beta$  qui inhibe la croissance des CEF de rat, décroît également le nombre de récepteurs du PDGF-BB (Davis, Rapp & Davidson, 1991). Ainsi, nos résultats suggèrent que le PDGF-BB et la thrombine, en augmentant le nombre de récepteurs ETB, potentialisent l'inhibition de la prolifération des CEFm par l'ET-1 et établissent ainsi un rétrocontrôle négatif à leurs effets promitogéniques.

Nous avons également observé une augmentation du nombre de récepteurs ETA en réponse au PDGF-BB et à la thrombine par un mécanisme indépendant de la production de PG. Les conséquences de cette régulation restent à explorer mais il faut noter que les récepteurs ETA relaient la contraction des CEFm en réponse à l'ET-1 (Mallat *et al.*, 1995a; Mallat & Lotersztajn, 1996). Or, la thrombine stimule la contraction des CEFm (Pinzani *et al.*, 1992). On peut donc émettre l'hypothèse que outre, son effet contractile direct, la thrombine peut également favoriser la contraction des CEFm indirectement en augmentant l'expression des récepteurs ETA.

### ***Implication dans un contexte physiopathologique***

Au cours des maladies chroniques du foie, les CEF prolifèrent en réponse à des cytokines et aux facteurs de croissances produits localement (Friedman, 1993). D'ailleurs, on observe une augmentation de l'expression du PDGF-BB par les cellules inflammatoires et dans les bandes de fibrose. De plus, l'expression de la thrombine, du PDGF-BB et de leurs récepteurs augmente au cours des maladies chroniques du foie (Pinzani *et al.*, 1996c ;

Gressner, 1996). Enfin, dans les CEFm, on observe une augmentation de l'expression des récepteurs du PDGF-BB et de la thrombine (Pinzani *et al.*, 1994; Pinzani *et al.*, 1996c ; Marra *et al.*, 1998). Les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets mitogéniques du PDGF-BB et de la thrombine ont été largement décrits et mettent en jeu l'activation de ERK et de la PI3Kinase (Marra *et al.*, 1997 ; Krymskaya *et al.*, 1999). Nos résultats mettent en évidence que l'effet mitogène du PDGF-BB et de la thrombine est la résultante de l'activation de deux voies de transduction exerçant des effets opposés, la voie négative mettant en jeu une production de PG et d'AMPc, et l'induction de la COX-2. L'effet mitogénique est contrebalancé par deux mécanismes dépendants des PG : i) un mécanisme direct impliquant l'inhibition de la voie ERK ; ii) une voie indirecte qui pourrait augmenter l'effet antiprolifératif de l'ET-1 en augmentant le nombre de ses récepteurs ETB. L'ensemble de nos résultats suggère donc que l'effet du PDGF-BB et de la thrombine sur la prolifération des CEFm résulte de la balance entre l'activation de voies promitogéniques et antiprolifératives.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La fibrose hépatique est la complication majeure de la plupart des maladies chroniques du foie. Elle est caractérisée par l'accumulation de la matrice extracellulaire dans l'espace de Disse, entraînant un blocage de la circulation sinusoidale et ainsi une dégénération hépatique. Il est maintenant bien établi que les CEF jouent un rôle important dans le développement de la fibrose. Au cours de ce processus, ces cellules acquièrent un phénotype myofibroblastique dans lequel elles prolifèrent et synthétisent les constituants de la fibrose (Blanc *et al.*, 1997 ; Olaso & Friedman, 1998). Le blocage de la croissance des CEFm constitue donc une stratégie antifibrosante potentielle.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence le rôle majeur de la COX-2 dans l'inhibition de la prolifération de ces cellules par l'ET-1 et son second messager, la S1P, ainsi que par le TNF- $\alpha$ . Cet enzyme est également activé par des facteurs de croissance ce qui limite leur effet mitogène. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la COX-2 nous a permis de démontrer le rôle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Les perspectives de ce travail sont doubles. D'autre part, nous poursuivons dans l'étude des effets de la S1P sur les CEFm et d'autre part, l'étude du rôle de la COX-2 dans la fibrogénèse et la carcinogénèse hépatiques.

### ***La S1P, un nouvel acteur dans la fibrose hépatique ?***

Nous poursuivons donc l'étude des fonctions de la S1P en tant que second messager et en tant que ligand des récepteurs Edg dans les CEF myofibroblastiques.

Il existe peu de données concernant le rôle de la S1P dans le foie. Nous poursuivrons donc l'étude des fonctions de la S1P en tant que second messager et ligand des récepteurs EDG. Dans un premier temps, nous approfondirons l'étude des voies antiprolifératives de la S1P notamment en caractérisant les mécanismes par lesquels la S1P augmente l'expression de COX-2. Nous déterminerons également si l'induction de la COX-2 fait intervenir NF- $\kappa$ B comme nous l'avons décrit dans l'article 1.

Par ailleurs, la S1P peut également exercer des effets par l'intermédiaire de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G : les récepteurs Edg. Nos résultats préliminaires montrent que ces récepteurs à la S1P sont présents à la surface des CEF myofibroblastiques. Cependant leurs rôles restent à déterminer. Nous étudierons en particulier l'effet de la S1P sur la contraction et la migration des CEFm. Enfin, nous déterminerons l'origine de la S1P se liant aux récepteurs Edg. Actuellement, les seules cellules connues pour



sécréter de la S1P sont les plaquettes (Yatomi *et al.*, 1995). Ces cellules sont activées et nombreuses lors de la fibrogénèse. Cependant, on ne peut exclure le fait que d'autres cellules hépatiques sécrètent de la S1P, qui agirait ainsi de façon autocrine ou paracrine sur les CEF myofibroblastiques.

### ***Rôle de la COX-2 dans le développement de la fibrose hépatique***

Ces trois articles nous ont permis de démontrer le rôle central de la COX-2 dans l'inhibition de la prolifération des CEF myofibroblastiques humaines. Notre hypothèse est que l'induction de la COX-2, en empêchant l'accumulation des CEFm, limiterait le développement de la fibrose hépatique. D'autres études montrent que les PGE2 sont antifibrosantes *in vivo* et *in vitro* en inhibant la production de collagène de type I (Beno *et al.*, 1993) et la prolifération des CEF chez le rat (Beno, Rapp & Davis, 1994). S'il est maintenant clair que la COX-2 joue un rôle majeur dans la régulation de la prolifération des CEF myofibroblastiques, de nombreux points restent encore obscurs. En particulier, les voies de signalisation impliquées dans l'activation de la COX-2 et les cibles activées par la COX-2 restent à déterminer. Par ailleurs, les prostaglandines ont-elles également des récepteurs nucléaires et quels sont leurs rôles ?

Enfin, dans de nombreuses cellules, les facteurs antiprolifératifs sont souvent des stimuli apoptotiques (Evan & Littlewood, 1998). Nous étudierons donc l'effet apoptotique des facteurs induisant la COX-2 ainsi que celui des prostaglandines se liant à des récepteurs membranaires des prostaglandines ou aux récepteurs nucléaires. Nous caractériserons également les conséquences du blocage pharmacologique de COX-2 sur l'apoptose de ces cellules. Cette étude sera poursuivie par la définition des cibles de la COX-2 impliquées.

### **Les études *in vivo***

L'ensemble des études précédentes étant réalisé *in vitro*, il est indispensable, d'évaluer les effets de l'expression de la COX-2 *in vivo* afin de confirmer nos hypothèses. Dans deux modèles de fibrose expérimentale, la ligature du cholédoque ou l'administration prolongée de tétrachlorure de carbone, nous examinerons l'effet de l'administration prolongée d'inhibiteurs de COX-2 (NS-398 ou SC-58125) sur l'expression du collagène I et également par analyse histologique afin d'examiner le rôle de la COX-2 dans la fibrose hépatique.

### ***Rôle de la COX-2 dans le développement des carcinomes hépatocellulaires***

Il n'existe que très peu de données concernant le rôle des COX et particulièrement de la COX-2 dans le développement des cancers primitifs du foie. Nous nous proposons d'étudier le rôle de la COX-2 dans la carcinogenèse hépatique. Notre hypothèse est que comme cela a été décrit *in vivo* et *in vitro* dans le cancer colorectal ou dans les cellules cancéreuses coliques, la COX-2 serait impliquée dans la carcinogenèse hépatique.



- Akishita, M., Ouchi, Y., Miyoshi, H., Orimo, A., Kozaki, K., Eto, M., Ishikawa, M., Kim, S., Toba, K. & Orimo, H. (1996). Estrogen inhibits endothelin-1 production and c-fos gene expression in rat aorta. *Atherosclerosis* **125**, 27-38.
- Albrecht, D. E. & Tidball, J. G. (1997). Platelet-derived growth factor-stimulated secretion of basement membrane proteins by skeletal muscle occurs by tyrosine kinase- dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* **272**, 2236-44.
- Aleman, R., Meyer zu Heringdorf, D., van Koppen, C. J. & Jakobs, K. H. (1999). Formyl peptide receptor signaling in HL-60 cells through sphingosine kinase. *J Biol Chem* **274**, 3994-9.
- Alexandrov, A., Keffel, S., Goepel, M. & Michel, M. C. (1998). Stimulation of alpha1A-adrenoceptors in Rat-1 cells inhibits extracellular signal-regulated kinase by activating p38 mitogen- activated protein kinase. *Mol Pharmacol* **54**, 755-60.
- Ankoma-Sey, V., Matli, M., Chang, K. B., Lalazar, A., Donner, D. B., Wong, L., Warren, R. S. & Friedman, S. L. (1998). Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* **17**, 115-21.
- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor [see comments]. *Nature* **348**, 730-2.
- Aramori, I. & Nakanishi, S. (1992). Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **267**, 12468-74.
- Aramori, I., Nirei, H., Shoubo, M., Sogabe, K., Nakamura, K., Kojo, H., Notsu, Y., Ono, T. & Nakanishi, S. (1993). Subtype selectivity of a novel endothelin antagonist, FR139317, for the two endothelin receptors in transfected Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* **43**, 127-31.
- Arenson, D. M., Friedman, S. L. & Bissell, D. M. (1988). Formation of extracellular matrix in normal rat liver: lipocytes as a major source of proteoglycan. *Gastroenterology* **95**, 441-7.
- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R. T., Virelizier, J. L. & Dargemont, C. (1997). Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF- kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* **110**, 369-78.
- Arinami, T., Ishikawa, M., Inoue, A., Yanagisawa, M., Masaki, T., Yoshida, M. C. & Hamaguchi, H. (1991). Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet* **48**, 990-6.
- Asselin, E. & Fortier, M. A. (1996). Influence of thrombin on proliferation and prostaglandin production in cultured bovine endometrial cells. *J Cell Physiol* **168**, 600-7.
- Bachem, M. G., Riess, U. & Gressner, A. M. (1989). Liver fat storing cell proliferation is stimulated by epidermal growth factor/transforming growth factor alpha and inhibited by transforming growth factor beta. *Biochem Biophys Res Commun* **162**, 708-14.
- Baeuerle, P. A. & Baltimore, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**, 13-20.
- Bagnato, A., Tecce, R., Di Castro, V. & Catt, K. J. (1997). Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **57**, 1306-11.

- Baird, A., Mormede, P. & Bohlen, P. (1985). Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **126**, 358-64.
- Baldwin, A. S., Jr., Azizkhan, J. C., Jensen, D. E., Beg, A. A. & Coodly, L. R. (1991). Induction of NF-kappa B DNA-binding activity during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* **11**, 4943-51.
- Ballardini, G., Groff, P., Badiali de Giorgi, L., Schuppan, D. & Bianchi, F. B. (1994). Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver. *Hepatology* **19**, 440-6.
- Bandoh, K., Aoki, J., Hosono, H., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tsujimoto, M., Arai, H. & Inoue, K. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **274**, 27776-85.
- Barnes, K. & Turner, A. J. (1997). The endothelin system and endothelin-converting enzyme in the brain: molecular and cellular studies. *Neurochem Res* **22**, 1033-40.
- Barnes, P. J. (1997). Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 867-70.
- Barnett, R. L., Ruffini, L., Hart, D., Mancuso, P. & Nord, E. P. (1994). Mechanism of endothelin activation of phospholipase A2 in rat renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol* **266**, F46-56.
- Bataller, R., Nicolas, J. M., Gines, P., Esteve, A., Nieves Gorbis, M., Garcia-Ramallo, E., Pinzani, M., Ros, J., Jimenez, W., Thomas, A. P., Arroyo, V. & Rodes, J. (1997). Arginine vasopressin induces contraction and stimulates growth of cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **113**, 615-24.
- Bauer, M., Zhang, J. X., Bauer, I. & Clemens, M. G. (1994). Endothelin-1 as a regulator of hepatic microcirculation: sublobular distribution of effects and impact on hepatocellular secretory function. *Shock* **1**, 457-65.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S. & Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* **376**, 167-70.
- Beno, D. W., Espinal, R., Edelstein, B. M. & Davis, B. H. (1993). Administration of prostaglandin E1 analog reduces rat hepatic and Ito cell collagen gene expression and collagen accumulation after bile duct ligation injury. *Hepatology* **17**, 707-14.
- Beno, D. W., Rapp, U. R. & Davis, B. H. (1994). Prostaglandin E suppression of platelet-derived-growth-factor-induced Ito cell mitogenesis occurs independent of raf perinuclear translocation and nuclear proto-oncogene expression. *Biochim Biophys Acta* **1222**, 292-300.
- Benyon, R. C., Iredale, J. P., Goddard, S., Winwood, P. J. & Arthur, M. J. (1996). Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* **110**, 821-31.
- Bhullar, I. S., Li, Y. S., Miao, H., Zandi, E., Kim, M., Shyy, J. Y. & Chien, S. (1998). Fluid shear stress activation of IkappaB kinase is integrin-dependent. *J Biol Chem* **273**, 30544-9.
- Bilderback, T. R., Grigsby, R. J. & Dobrowsky, R. T. (1997). Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *J Biol Chem* **272**, 10922-7.
- Bissell, D. M., Arenson, D. M., Maher, J. J. & Roll, F. J. (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest* **79**, 801-12.

- Bissell, D. M., Wang, S. S., Jarnagin, W. R. & Roll, F. J. (1995). Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* **96**, 447-55.
- Blanc, J. F., Bioulac-Sage, P. & Rosenbaum, J. (1997). [Stellate cells of the liver and hepatic fibrogenesis]. *Gastroenterol Clin Biol* **21**, 869-79.
- Bloch, K. D., Eddy, R. L., Shows, T. B. & Quertermous, T. (1989a). cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3. *J Biol Chem* **264**, 18156-61.
- Bloch, K. D., Friedrich, S. P., Lee, M. E., Eddy, R. L., Shows, T. B. & Quertermous, T. (1989b). Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J Biol Chem* **264**, 10851-7.
- Bornfeldt, K. E., Campbell, J. S., Koyama, H., Argast, G. M., Leslie, C. C., Raines, E. W., Krebs, E. G. & Ross, R. (1997). The mitogen-activated protein kinase pathway can mediate growth inhibition and proliferation in smooth muscle cells. Dependence on the availability of downstream targets. *J Clin Invest* **100**, 875-85.
- Bornfeldt, K. E., Graves, L. M., Raines, E. W., Igarashi, Y., Wayman, G., Yamamura, S., Yatomi, Y., Sidhu, J. S., Krebs, E. G., Hakomori, S. & et al. (1995). Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction. *J Cell Biol* **130**, 193-206.
- Bosch-Marce, M., Claria, J., Titos, E., Masferrer, J. L., Altuna, R., Poo, J. L., Jimenez, W., Arroyo, V., Rivera, F. & Rodes, J. (1999). Selective inhibition of cyclooxygenase 2 spares renal function and prostaglandin synthesis in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* **116**, 1167-75.
- Brannon, T. S., North, A. J., Wells, L. B. & Shaul, P. W. (1994). Prostacyclin synthesis in ovine pulmonary artery is developmentally regulated by changes in cyclooxygenase-1 gene expression. *J Clin Invest* **93**, 2230-5.
- Breder, C. D., Dewitt, D. & Kraig, R. P. (1995). Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* **355**, 296-315.
- Breder, C. D. & Saper, C. B. (1996). Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res* **713**, 64-9.
- Browning, D. D., Pan, Z. K., Prossnitz, E. R. & Ye, R. D. (1997). Cell type- and developmental stage-specific activation of NF-kappaB by fMet-Leu-Phe in myeloid cells. *J Biol Chem* **272**, 7995-8001.
- Buniatian, G., Hamprecht, B. & Gebhardt, R. (1996). Glial fibrillary acidic protein as a marker of perisinusoidal stellate cells that can distinguish between the normal and myofibroblast-like phenotypes. *Biol Cell* **87**, 65-73.
- Bursch, W., Taper, H. S., Somer, M. P., Meyer, S., Putz, B. & Schulte-Hermann, R. (1989). Histochemical and biochemical studies on the effect of the prostacyclin derivative iloprost on CCl4-induced lipid peroxidation in rat liver and its significance for hepatoprotection. *Hepatology* **9**, 830-8.
- Cales, P. (1998). Apoptosis and liver fibrosis: antifibrotic strategies. *Biomed Pharmacother* **52**, 259-63.
- Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K. & Watanabe, Y. (1996). Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res* **733**, 263-72.

- Carloni, V., Romanelli, R. G., Pinzani, M., Laffi, G. & Gentilini, P. (1997). Focal adhesion kinase and phospholipase C gamma involvement in adhesion and migration of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **112**, 522-31.
- Casini, A., Cunningham, M., Rojkind, M. & Lieber, C. S. (1991). Acetaldehyde increases procollagen type I and fibronectin gene transcription in cultured rat fat-storing cells through a protein synthesis-dependent mechanism. *Hepatology* **13**, 758-65.
- Casini, A., Galli, G., Salzano, R., Ceni, E., Franceschelli, F., Rotella, C. M. & Surrenti, C. (1994). Acetaldehyde induces c-fos and c-jun proto-oncogenes in fat-storing cell cultures through protein kinase C activation. *Alcohol Alcohol* **29**, 303-14.
- Casini, A., Pinzani, M., Milani, S., Grappone, C., Galli, G., Jezequel, A. M., Schuppan, D., Rotella, C. M. & Surrenti, C. (1993). Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor beta 1 in human fat-storing cells. *Gastroenterology* **105**, 245-53.
- Cassiman, D., van Pelt, J., De Vos, R., Van Lommel, F., Desmet, V., Yap, S. H. & Roskams, T. (1999). Synaptophysin: A novel marker for human and rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol* **155**, 1831-9.
- Catalan, R. E., Aragonés, M. D., Martínez, A. M. & Fernández, I. (1996). Involvement of sphingolipids in the endothelin-1 signal transduction mechanism in rat brain. *Neurosci Lett* **220**, 121-4.
- Chen, A. & Davis, B. H. (1999). UV irradiation activates JNK and increases alpha1(I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* **274**, 158-64.
- Chen, H. C. & Guan, J. L. (1994). Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10148-52.
- Cho, J. J., Hocher, B., Herbst, H., Jia, J. D., Ruehl, M., Hahn, E. G., Riecken, E. O. & Schuppan, D. (2000). An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis [see comments]. *Gastroenterology* **118**, 1169-78.
- Chu, Z. L., DiDonato, J. A., Hawiger, J. & Ballard, D. W. (1998). The tax oncoprotein of human T-cell leukemia virus type 1 associates with and persistently activates IkkappaB kinases containing IKKalpha and IKKbeta. *J Biol Chem* **273**, 15891-4.
- Chua, C. C., Hamdy, R. C. & Chua, B. H. (1996). Regulation of endothelin-1 production by a thromboxane A2 mimetic in rat heart smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **1313**, 1-5.
- Cifone, M. G., De Maria, R., Roncaioli, P., Ripponi, M. R., Azuma, M., Lanier, L. L., Santoni, A. & Testi, R. (1994). Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* **180**, 1547-52.
- Cifone, M. G., Roncaioli, P., De Maria, R., Camarda, G., Santoni, A., Ruberti, G. & Testi, R. (1995). Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *Embo J* **14**, 5859-68.
- Clement, B., Rissel, M., Peyrol, S., Mazurier, Y., Grimaud, J. A. & Guillouzo, A. (1985). A procedure for light and electron microscopic intracellular immunolocalization of collagen and fibronectin in rat liver. *J Histochem Cytochem* **33**, 407-14.

- Clerk, A., Michael, A. & Sugden, P. H. (1998). Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol* **142**, 523-35.
- Clouthier, D. E., Hosoda, K., Richardson, J. A., Williams, S. C., Yanagisawa, H., Kuwaki, T., Kumada, M., Hammer, R. E. & Yanagisawa, M. (1998). Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* **125**, 813-24.
- Cohen, L., Henzel, W. J. & Baeuerle, P. A. (1998). IKAP is a scaffold protein of the I $\kappa$ B kinase complex [see comments]. *Nature* **395**, 292-6.
- Cohn, S. M., Schloemann, S., Tessner, T., Seibert, K. & Stenson, W. F. (1997). Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. *J Clin Invest* **99**, 1367-79.
- Conte, G., Cianciaruso, B., De Nicola, L., Sepe, V., Romano, G., Domenico, R., Caglioti, A., Fuiano, G. & Dal Canton, A. (1992). Inhibition of urea tubular reabsorption by PGE1 infusion in man. *Nephron* **60**, 42-8.
- Corradi, A. & Arendshorst, W. J. (1985). Rat renal hemodynamics during venous compression: roles of nerves and prostaglandins. *Am J Physiol* **248**, F810-20.
- Couraud, P. O., Durieu-Trautmann, O., Nguyen, D. L., Marin, P., Glibert, F. & Strosberg, A. D. (1991). Functional endothelin-1 receptors in rat astrocytoma C6. *Eur J Pharmacol* **206**, 191-8.
- Cramer, H., Muller-Esterl, W. & Schroeder, C. (1997). Subtype-specific desensitization of human endothelin ETA and ETB receptors reflects differential receptor phosphorylation. *Biochemistry* **36**, 13325-32.
- Cramer, H., Muller-Esterl, W. & Schroeder, C. (1998). Subtype-specific endothelin-A and endothelin-B receptor desensitization correlates with differential receptor phosphorylation. *J Cardiovasc Pharmacol* **31**, S203-6.
- Crampton, J. R., Gibbons, L. C. & Rees, W. (1987). Effects of sucralfate on gastroduodenal bicarbonate secretion and prostaglandin E2 metabolism. *Am J Med* **83**, 14-8.
- Crespo, P., Cachero, T. G., Xu, N. & Gutkind, J. S. (1995). Dual effect of beta-adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. Evidence for a beta gamma-dependent activation and a G alpha s-cAMP-mediated inhibition. *J Biol Chem* **270**, 25259-65.
- Davenport, A. P., Kuc, R. E., Hoskins, S. L., Karet, F. E. & Fitzgerald, F. (1994). [125I]-PD151242: a selective ligand for endothelin ETA receptors in human kidney which localizes to renal vasculature. *Br J Pharmacol* **113**, 1303-10.
- Davis, B. H., Chen, A. & Beno, D. W. (1996). Raf and mitogen-activated protein kinase regulate stellate cell collagen gene expression. *J Biol Chem* **271**, 11039-42.
- Davis, B. H., Rapp, U. R. & Davidson, N. O. (1991). Retinoic acid and transforming growth factor beta differentially inhibit platelet-derived-growth-factor-induced Ito-cell activation. *Biochem J* **278**, 43-7.
- Dbaibo, G. S., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. (1993). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) signal transduction through ceramide. Dissociation of growth inhibitory effects of TNF-alpha from activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* **268**, 17762-6.
- deBlaquiere, J., Walker, F., Michelangeli, V. P., Fabri, L. & Burgess, A. W. (1994). Platelet-derived growth factor stimulates the release of protein kinase A from the cell membrane. *J Biol Chem* **269**, 4812-8.



- Dejardin, E., Bonizzi, G., Bellahcene, A., Castronovo, V., Merville, M. P. & Bours, V. (1995). Highly-expressed p100/p52 (NFkB2) sequesters other NF-kappa B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene* **11**, 1835-41.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y. & Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation [see comments]. *Science* **284**, 309-13.
- Denault, J. B., Claing, A., D'Orleans-Juste, P., Sawamura, T., Kido, T., Masaki, T. & Leduc, R. (1995). Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett* **362**, 276-80.
- Denda, A., Endoh, T., Kitayama, W., Tang, Q., Noguchi, O., Kobayashi, Y., Akai, H., Okajima, E., Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., Nakae, D. & Konishi, Y. (1997). Inhibition by piroxicam of oxidative DNA damage, liver cirrhosis and development of enzyme-altered nodules caused by a choline-deficient, L- amino acid-defined diet in rats. *Carcinogenesis* **18**, 1921-30.
- Devesly, P., Phillips, P. E., Johns, A., Rubanyi, G. & Parker-Botelho, L. H. (1990). Receptor kinetics differ for endothelin-1 and endothelin-2 binding to Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **172**, 126-34.
- DeWitt, D. L. & Smith, W. L. (1988). Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1988 Jul;85(14):5056]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1412-6.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E. & Karin, M. (1997). A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB [see comments]. *Nature* **388**, 548-54.
- Dinchuk, J. E., Car, B. D., Focht, R. J., Johnston, J. J., Jaffee, B. D., Covington, M. B., Contel, N. R., Eng, V. M., Collins, R. J., Czerniak, P. M. & et al. (1995). Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* **378**, 406-9.
- Doi, T. S., Marino, M. W., Takahashi, T., Yoshida, T., Sakakura, T., Old, L. J. & Obata, Y. (1999). Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2994-9.
- Douglas, S. A., Gellai, M., Ezekiel, M. & Ohlstein, E. H. (1994a). BQ-123, a selective endothelin subtype A-receptor antagonist, lowers blood pressure in different rat models of hypertension. *J Hypertens* **12**, 561-7.
- Douglas, S. A., Meek, T. D. & Ohlstein, E. H. (1994b). Novel receptor antagonists welcome a new era in endothelin biology. *Trends Pharmacol Sci* **15**, 313-6.
- Duan, R. D., Hertervig, E., Nyberg, L., Hauge, T., Sternby, B., Lillienau, J., Farooqi, A. & Nilsson, A. (1996). Distribution of alkaline sphingomyelinase activity in human beings and animals. Tissue and species differences. *Dig Dis Sci* **41**, 1801-6.
- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B. & Lipsky, P. E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease [see comments]. *Faseb J* **12**, 1063-73.
- DuBois, R. N., Shao, J., Tsujii, M., Sheng, H. & Beauchamp, R. D. (1996). G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res* **56**, 733-7.

- DuBois, R. N., Tsujii, M., Bishop, P., Awad, J. A., Makita, K. & Lanahan, A. (1994). Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* **266**, G822-7.
- Eakes, A. T., Howard, K. M., Miller, J. E. & Olson, M. S. (1997). Endothelin-1 production by hepatic endothelial cells: characterization and augmentation by endotoxin exposure. *Am J Physiol* **272**, G605-11.
- Eakes, A. T. & Olson, M. S. (1998). Regulation of endothelin synthesis in hepatic endothelial cells. *Am J Physiol* **274**, G1068-76.
- Ebata, M., Fukuda, Y., Nakano, I., Katano, Y., Fujimoto, N. & Hayakawa, T. (1997). Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and of precursor form of matrix metalloproteinase-2 in patients with liver disease. *Liver* **17**, 293-9.
- Eguchi, S., Hirata, Y., Imai, T. & Marumo, F. (1993a). Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* **132**, 524-9.
- Eguchi, S., Hirata, Y. & Marumo, F. (1993b). Endothelin subtype B receptors are coupled to adenylate cyclase via inhibitory G protein in cultured bovine endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **22**, S161-3.
- el-Mowafy, A. M. & Abdel-Latif, A. A. (1994). Characterization of iris sphincter smooth muscle endothelin receptor subtypes which are coupled to cyclic AMP formation and polyphosphoinositide hydrolysis. *J Pharmacol Exp Ther* **268**, 1343-51.
- Elmqvist, J. K., Breder, C. D., Sherin, J. E., Scammell, T. E., Hickey, W. F., Dewitt, D. & Saper, C. B. (1997). Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol* **381**, 119-29.
- Emori, T., Hirata, Y., Imai, T., Eguchi, S., Kanno, K. & Marumo, F. (1993). Cellular mechanism of natriuretic peptides-induced inhibition of endothelin-1 biosynthesis in rat endothelial cells. *Endocrinology* **133**, 2474-80.
- Emori, T., Hirata, Y., Imai, T., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S. & Marumo, F. (1992). Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol* **44**, 2409-11.
- Emoto, N. & Yanagisawa, M. (1995). Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* **270**, 15262-8.
- Endoh, T., Tang, Q., Denda, A., Noguchi, O., Kobayashi, E., Tamura, K., Horiguchi, K., Ogasawara, H., Tsujiuchi, T., Nakae, D., Sugimura, M. & Konishi, Y. (1996). Inhibition by acetylsalicylic acid, a cyclooxygenase inhibitor, and p- bromophenacylbromide, a phospholipase A2 inhibitor, of both cirrhosis and enzyme-altered nodules caused by a choline-deficient, L-amino acid- defined diet in rats. *Carcinogenesis* **17**, 467-75.
- Enzan, H., Himeno, H., Iwamura, S., Onishi, S., Saibara, T., Yamamoto, Y. & Hara, H. (1994). Alpha-smooth muscle actin-positive perisinusoidal stromal cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **19**, 895-903.
- Essani, N. A., McGuire, G. M., Manning, A. M. & Jaeschke, H. (1996). Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor kappa B and expression of E-selectin messenger RNA in hepatocytes, Kupffer cells, and endothelial cells in vivo. *J Immunol* **156**, 2956-63.

- Evan, G. & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* **281**, 1317-22.
- Failli, P., Ruocco, C., De Franco, R., Caligiuri, A., Gentilini, A., Giotti, A., Gentilini, P. & Pinzani, M. (1995). The mitogenic effect of platelet-derived growth factor in human hepatic stellate cells requires calcium influx. *Am J Physiol* **269**, C1133-9.
- Faouzi, S., Le Bail, B., Neaud, V., Boussarie, L., Saric, J., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C. & Rosenbaum, J. (1999). Myofibroblasts are responsible for collagen synthesis in the stroma of human hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. *J Hepatol* **30**, 275-84.
- Ferreira, S. H. (1972). Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol* **240**, 200-3.
- Ferreira, S. H. & Lorenzetti, B. B. (1996). Intrathecal administration of prostaglandin E2 causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. *Inflamm Res* **45**, 499-502.
- Ferri, C., Desideri, G., Baldoncini, R., Bellini, C., Valenti, M., Santucci, A. & De Mattia, G. (1999). Angiotensin II increases the release of endothelin-1 from human cultured endothelial cells but does not regulate its circulating levels. *Clin Sci (Colch)* **96**, 261-70.
- Filep, J. G., Battistini, B., Cote, Y. P., Beaudoin, A. R. & Sirois, P. (1991). Endothelin-1 induces prostacyclin release from bovine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **177**, 171-6.
- Filep, J. G., Battistini, B. & Sirois, P. (1993). Induction by endothelin-1 of epithelium-dependent relaxation of guinea-pig trachea in vitro: role for nitric oxide. *Br J Pharmacol* **109**, 637-44.
- FitzGerald, M. J., Webber, E. M., Donovan, J. R. & Fausto, N. (1995). Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ* **6**, 417-27.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M. & Evans, R. M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803-12.
- Foschi, M., Chari, S., Dunn, M. J. & Sorokin, A. (1997). Biphasic activation of p21ras by endothelin-1 sequentially activates the ERK cascade and phosphatidylinositol 3-kinase. *Embo J* **16**, 6439-51.
- Freedman, A. R., Sharma, R. J., Nabel, G. J., Emerson, S. G. & Griffin, G. E. (1992). Cellular distribution of nuclear factor kappa B binding activity in rat liver. *Biochem J* **287**, 645-9.
- Friedman, S. L. (1993). Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* **328**, 1828-35.
- Friedman, S. L., Roll, F. J., Boyles, J., Arenson, D. M. & Bissell, D. M. (1989). Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J Biol Chem* **264**, 10756-62.
- Friedman, S. L., Roll, F. J., Boyles, J. & Bissell, D. M. (1985). Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8681-5.
- Fujimoto, T. & Singer, S. J. (1986). Immunocytochemical studies of endothelial cells in vivo. I. The presence of desmin only, or of desmin plus vimentin, or vimentin only, in the endothelial cells of different capillaries of the adult chicken. *J Cell Biol* **103**, 2775-86.
- Fujisaki, H., Ito, H., Hirata, Y., Tanaka, M., Hata, M., Lin, M., Adachi, S., Akimoto, H., Marumo, F. & Hiroe, M. (1995). Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest* **96**, 1059-65.

- Fukunaga, M., Ochi, S., Takama, T., Yokoyama, K., Fujiwara, Y., Orita, Y. & Kamada, T. (1991). Endothelin-1 stimulates prostaglandin E2 production in an extracellular calcium-independent manner in cultured rat mesangial cells. *Am J Hypertens* **4**, 137-43.
- Furst, D. E. (1997). Meloxicam: selective COX-2 inhibition in clinical practice. *Semin Arthritis Rheum* **26**, 21-7.
- Gandhi, C. R., Kang, Y., De Wolf, A., Madariaga, J., Aggarwal, S., Scott, V. & Fung, J. (1996a). Altered endothelin homeostasis in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl Surg* **2**, 362-9.
- Gandhi, C. R., Nemoto, E. M., Watkins, S. C. & Subbotin, V. M. (1998). An endothelin receptor antagonist TAK-044 ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury and portal hypertension in rats. *Liver* **18**, 39-48.
- Gandhi, C. R., Sproat, L. A. & Subbotin, V. M. (1996b). Increased hepatic endothelin-1 levels and endothelin receptor density in cirrhotic rats. *Life Sci* **58**, 55-62.
- Gandhi, C. R., Stephenson, K. & Olson, M. S. (1990). Endothelin, a potent peptide agonist in the liver. *J Biol Chem* **265**, 17432-5.
- Garcia-Trevijano, E. R., Iraburu, M. J., Fontana, L., Dominguez-Rosales, J. A., Auster, A., Covarrubias-Pinedo, A. & Rojkind, M. (1999). Transforming growth factor beta1 induces the expression of alpha1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPbeta-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **29**, 960-70.
- Garipey, C. E., Cass, D. T. & Yanagisawa, M. (1996). Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 867-72.
- Geerts, A., Eliasson, C., Niki, T., Wielant, A., Vaeyens, F. & Pekny, M. (2001). Formation of normal desmin intermediate filaments in mouse hepatic stellate cells requires vimentin [In Process Citation]. *Hepatology* **33**, 177-88.
- Geerts, A., Niki, T., Hellemans, K., De Craemer, D., Van Den Berg, K., Lazou, J. M., Stange, G., Van De Winkel, M. & De Bleser, P. (1998). Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting. *Hepatology* **27**, 590-8.
- Gerbes, A. L., Moller, S., Gulberg, V. & Henriksen, J. H. (1995). Endothelin-1 and -3 plasma concentrations in patients with cirrhosis: role of splanchnic and renal passage and liver function. *Hepatology* **21**, 735-9.
- Ghyselinck, N. B., Bavik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnier, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C. B., Hakansson, H., Sauvant, P., Azais-Braesco, V., Frasson, M., Picaud, S. & Chambon, P. (1999). Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *Embo J* **18**, 4903-14.
- Gierse, J. K., Hauser, S. D., Creely, D. P., Koboldt, C., Rangwala, S. H., Isakson, P. C. & Seibert, K. (1995). Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochem J* **305**, 479-84.
- Gill, B. M., Nishikata, H., Chan, G., Delovitch, T. L. & Ochi, A. (1994). Fas antigen and sphingomyelin-ceramide turnover-mediated signaling: role in life and death of T lymphocytes. *Immunol Rev* **142**, 113-25.
- Goetzl, E. J. & An, S. (1998). Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Faseb J* **12**, 1589-98.

- Gonda, K., Okamoto, H., Takuwa, N., Yatomi, Y., Okazaki, H., Sakurai, T., Kimura, S., Sillard, R., Harii, K. & Takuwa, Y. (1999). The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways. *Biochem J* **337**, 67-75.
- Gondo, K., Ueno, T., Sakamoto, M., Sakisaka, S., Sata, M. & Tanikawa, K. (1993). The endothelin-1 binding site in rat liver tissue: light- and electron- microscopic autoradiographic studies. *Gastroenterology* **104**, 1745-9.
- Goodemote, K. A., Mattie, M. E., Berger, A. & Spiegel, S. (1995). Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein in the mitogenic signaling pathways of sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* **270**, 10272-7.
- Goss, J. A., Mangino, M. J., Callery, M. P. & Flye, M. W. (1993). Prostaglandin E2 downregulates Kupffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration. *Am J Physiol* **264**, G601-8.
- Goto, K., Kasuya, Y., Matsuki, N., Takuwa, Y., Kurihara, H., Ishikawa, T., Kimura, S., Yanagisawa, M. & Masaki, T. (1989). Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3915-8.
- Goto, M., Takei, Y., Kawano, S., Nagano, K., Tsuji, S., Masuda, E., Nishimura, Y., Okumura, S., Kashiwagi, T., Fusamoto, H. & et al. (1994). Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. *Hepatology* **19**, 675-81.
- Graler, M. H., Bernhardt, G. & Lipp, M. (1998). EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* **53**, 164-9.
- Graves, L. M., Bornfeldt, K. E., Sidhu, J. S., Argast, G. M., Raines, E. W., Ross, R., Leslie, C. C. & Krebs, E. G. (1996). Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase A through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* **271**, 505-11.
- Gressner, A. M. (1994). Activation of proteoglycan synthesis in injured liver--a brief review of molecular and cellular aspects. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **32**, 225-37.
- Gressner, A. M. (1996). Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* **54**, S39-45.
- Gressner, A. M. (1998). The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* **292**, 447-52.
- Gressner, A. M., Brenzel, A. & Vossmeier, T. (1993). Hepatocyte-conditioned medium potentiates insulin-like growth factor (IGF) 1 and 2 stimulated DNA synthesis of cultured fat storing cells. *Liver* **13**, 86-94.
- Griendling, K. K., Tsuda, T. & Alexander, R. W. (1989). Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **264**, 8237-40.
- Grimm, S., Bauer, M. K., Baeuerle, P. A. & Schulze-Osthoff, K. (1996). Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J Cell Biol* **134**, 13-23.
- Guarner, F., Boughton-Smith, N. K., Blackwell, G. J. & Moncada, S. (1988). Reduction by prostacyclin of acetaminophen-induced liver toxicity in the mouse. *Hepatology* **8**, 248-53.
- Han, Y. & Brasier, A. R. (1997). Mechanism for biphasic rel A. NF-kappaB1 nuclear translocation in tumor necrosis factor alpha-stimulated hepatocytes. *J Biol Chem* **272**, 9825-32.

- Harris, R. C., McKanna, J. A., Akai, Y., Jacobson, H. R., Dubois, R. N. & Breyer, M. D. (1994). Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* **94**, 2504-10.
- Hartleb, M., Moreau, R., Cailmail, S., Gaudin, C. & Lebrec, D. (1994). Vascular hyporesponsiveness to endothelin 1 in rats with cirrhosis [see comments]. *Gastroenterology* **107**, 1085-93.
- Hasegawa, H., Hiki, K., Sawamura, T., Aoyama, T., Okamoto, Y., Miwa, S., Shimohama, S., Kimura, J. & Masaki, T. (1998). Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* **428**, 304-8.
- Hashimoto, N., Watanabe, T., Ikeda, Y., Yamada, H., Taniguchi, S., Mitsui, H. & Kurokawa, K. (1997). Prostaglandins induce proliferation of rat hepatocytes through a prostaglandin E2 receptor EP3 subtype. *Am J Physiol* **272**, G597-604.
- Hautekeete, M. L. & Geerts, A. (1997). The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Arch* **430**, 195-207.
- Hellerbrand, C., Jobin, C., Iimuro, Y., Licato, L., Sartor, R. B. & Brenner, D. A. (1998a). Inhibition of NFkappaB in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IkappaB super-repressor [see comments]. *Hepatology* **27**, 1285-95.
- Hellerbrand, C., Jobin, C., Licato, L. L., Sartor, R. B. & Brenner, D. A. (1998b). Cytokines induce NF-kappaB in activated but not in quiescent rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol* **275**, G269-78.
- Herbst, H., Wege, T., Milani, S., Pellegrini, G., Orzechowski, H. D., Bechstein, W. O., Neuhaus, P., Gressner, A. M. & Schuppan, D. (1997). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* **150**, 1647-59.
- Hernandez-Munoz, I., de la Torre, P., Sanchez-Alcazar, J. A., Garcia, I., Santiago, E., Munoz-Yague, M. T. & Solis-Herruzo, J. A. (1997). Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen alpha 1(I) gene expression in rat hepatic stellate cells through a G protein. *Gastroenterology* **113**, 625-40.
- Hilal-Dandan, R., Merck, D. T., Lujan, J. P. & Brunton, L. L. (1994). Coupling of the type A endothelin receptor to multiple responses in adult rat cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* **45**, 1183-90.
- Hilal-Dandan, R., Villegas, S., Gonzalez, A. & Brunton, L. L. (1997). The quasi-irreversible nature of endothelin binding and G protein-linked signaling in cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **281**, 267-73.
- Himmel, H. M., Meyer Zu Heringdorf, D., Graf, E., Dobrev, D., Kortner, A., Schuler, S., Jakobs, K. H. & Ravens, U. (2000). Evidence for Edg-3 receptor-mediated activation of I(K.ACh) by sphingosine-1-phosphate in human atrial cardiomyocytes. *Mol Pharmacol* **58**, 449-54.
- Hirai, Y., Takebe, K., Takashina, M., Kobayashi, S. & Takeichi, M. (1992). Epimorphin: a mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis [see comments]. *Cell* **69**, 471-81.
- Hirose, M., Watanabe, S., Oide, H., Kitamura, T., Miyazaki, A. & Sato, N. (1996). A new function of Ito cells in liver morphogenesis: evidence using a novel morphogenic protein, epimorphin, in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 155-60.
- Hla, T. & Maciag, T. (1990). An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **265**, 9308-13.

- Hla, T. & Maciag, T. (1991). Cyclooxygenase gene expression is down-regulated by heparin-binding (acidic fibroblast) growth factor-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem* **266**, 24059-63.
- Hori, S., Komatsu, Y., Shigemoto, R., Mizuno, N. & Nakanishi, S. (1992). Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology* **130**, 1885-95.
- Horstmeyer, A., Cramer, H., Sauer, T., Muller-Esterl, W. & Schroeder, C. (1996). Palmitoylation of endothelin receptor A. Differential modulation of signal transduction activity by post-translational modification. *J Biol Chem* **271**, 20811-9.
- Hosoda, K., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Baynash, A. G., Cheung, J. C., Giaid, A. & Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* **79**, 1267-76.
- Houghlum, K., Lee, K. S. & Chojkier, M. (1997). Proliferation of hepatic stellate cells is inhibited by phosphorylation of CREB on serine 133. *J Clin Invest* **99**, 1322-8.
- Housset, C., Carayon, A., Housset, B., Legendre, C., Hannoun, L. & Poupon, R. (1993a). Endothelin-1 secretion by human gallbladder epithelial cells in primary culture. *Lab Invest* **69**, 750-5.
- Housset, C., Rockey, D. C. & Bissell, D. M. (1993b). Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9266-70.
- Ihara, M., Fukuroda, T., Saeki, T., Nishikibe, M., Kojiri, K., Suda, H. & Yano, M. (1991). An endothelin receptor (ETA) antagonist isolated from *Streptomyces misakiensis*. *Biochem Biophys Res Commun* **178**, 132-7.
- Ikeda, K., Wakahara, T., Wang, Y. Q., Kadoya, H., Kawada, N. & Kaneda, K. (1999). In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* **29**, 1760-7.
- Im, D. S., Heise, C. E., Ancellin, N., O'Dowd, B. F., Shei, G. J., Heavens, R. P., Rigby, M. R., Hla, T., Mandala, S., McAllister, G., George, S. R. & Lynch, K. R. (2000a). Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem* **275**, 14281-6.
- Im, D. S., Heise, C. E., Harding, M. A., George, S. R., O'Dowd, B. F., Theodorescu, D. & Lynch, K. R. (2000b). Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Mol Pharmacol* **57**, 753-9.
- Imai, T., Hirata, Y., Emori, T. & Marumo, F. (1993). Heparin has an inhibitory effect on endothelin-1 synthesis and release by endothelial cells. *Hypertension* **21**, 353-8.
- Imai, T., Hirata, Y., Emori, T., Yanagisawa, M., Masaki, T. & Marumo, F. (1992). Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* **19**, 753-7.
- Imokawa, G., Yada, Y. & Kimura, M. (1996). Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem J* **314**, 305-12.
- Inagaki, Y., Truter, S., Greenwel, P., Rojkind, M., Unoura, M., Kobayashi, K. & Ramirez, F. (1995). Regulation of the alpha 2(I) collagen gene transcription in fat-storing cells derived from a cirrhotic liver. *Hepatology* **22**, 573-9.

- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. & Masaki, T. (1989a). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 2863-7.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M. & Masaki, T. (1989b). The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* **264**, 14954-9.
- Iredale, J. P., Benyon, R. C., Pickering, J., McCullen, M., Northrop, M., Pawley, S., Hovell, C. & Arthur, M. J. (1998). Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* **102**, 538-49.
- Isales, C. M., Nathanson, M. H. & Bruck, R. (1993). Endothelin-1 induces cholestasis which is mediated by an increase in portal pressure. *Biochem Biophys Res Commun* **191**, 1244-51.
- Ishikawa, K., Fukami, T., Nagase, T., Fujita, K., Hayama, T., Niiyama, K., Mase, T., Ihara, M. & Yano, M. (1992). Cyclic pentapeptide endothelin antagonists with high ETA selectivity. Potency- and solubility-enhancing modifications. *J Med Chem* **35**, 2139-42.
- Jackman, H. L., Morris, P. W., Rabito, S. F., Johansson, G. B., Skidgel, R. A. & Erdos, E. G. (1993). Inactivation of endothelin-1 by an enzyme of the vascular endothelial cells. *Hypertension* **21**, 925-8.
- Jarnagin, W. R., Rockey, D. C., Koteliensky, V. E., Wang, S. S. & Bissell, D. M. (1994). Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol* **127**, 2037-48.
- Jaszewski, R., Graham, D. Y. & Stromatt, S. C. (1992). Treatment of nonsteroidal antiinflammatory drug-induced gastric ulcers with misoprostol. A double-blind multicenter study. *Dig Dis Sci* **37**, 1820-4.
- Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A. E., Lee, J. Y., Nazaire, F., Pushkareva, M., Obeid, L. M. & Hanmun, Y. A. (1995). Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem* **270**, 2047-52.
- Johnson, G. D., Stevenson, T. & Ahn, K. (1999). Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. *J Biol Chem* **274**, 4053-8.
- Jones, D. A., Carlton, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. & Prescott, S. M. (1993). Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* **268**, 9049-54.
- Jouneaux, C., Mallat, A., Serradeil-Le Gal, C., Goldsmith, P., Hanoune, J. & Lotersztajn, S. (1994). Coupling of endothelin B receptors to the calcium pump and phospholipase C via Gs and Gq in rat liver. *J Biol Chem* **269**, 1845-51.
- Kamimura, Y., Sawada, N., Aoki, M. & Mori, M. (1993). Endothelin-1 induces contraction of bile canaliculi in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **191**, 817-22.
- Kang, H. Y., Kang, W. H. & Lee, C. (1998). Endothelin-B receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in human melanocytes. *Pflugers Arch* **435**, 350-6.
- Kargman, S., Charleson, S., Cartwright, M., Frank, J., Riendeau, D., Mancini, J., Evans, J. & O'Neill, G. (1996). Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* **111**, 445-54.



- Karne, S., Jayawickreme, C. K. & Lerner, M. R. (1993). Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* **268**, 19126-33.
- Kasuya, Y., Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K. & Masaki, T. (1989a). Mechanism of contraction to endothelin in isolated porcine coronary artery. *Am J Physiol* **257**, H1828-35.
- Kasuya, Y., Takuwa, Y., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K. & Masaki, T. (1989b). Endothelin-1 induces vasoconstriction through two functionally distinct pathways in porcine coronary artery: contribution of phosphoinositide turnover. *Biochem Biophys Res Commun* **161**, 1049-55.
- Kato, J. Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J. & Sherr, C. J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* **79**, 487-96.
- Kawada, N., Klein, H. & Decker, K. (1992). Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. *Biochem J* **285**, 367-71.
- Kawada, N., Kuroki, T., Kobayashi, K., Inoue, M. & Kaneda, K. (1996). Inhibition of myofibroblastic transformation of cultured rat hepatic stellate cells by methylxanthines and dibutyryl cAMP. *Dig Dis Sci* **41**, 1022-9.
- Kawada, N., Tran-Thi, T. A., Klein, H. & Decker, K. (1993). The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* **213**, 815-23.
- Kawamura, E., Yamanaka, N., Okamoto, E., Tomoda, F. & Furukawa, K. (1995). Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* **21**, 1138-43.
- Kester, M., Simonson, M. S., McDermott, R. G., Baldi, E. & Dunn, M. J. (1992). Endothelin stimulates phosphatidic acid formation in cultured rat mesangial cells: role of a protein kinase C-regulated phospholipase D. *J Cell Physiol* **150**, 578-85.
- Khac, L. D., Naze, S. & Harbon, S. (1994). Endothelin receptor type A signals both the accumulation of inositol phosphates and the inhibition of cyclic AMP generation in rat myometrium: stimulation and desensitization. *Mol Pharmacol* **46**, 485-94.
- Kitayama, Y., Yamanaka, N., Kawamura, E., Kuroda, N. & Okamoto, E. (1997). Hepatoprotective effect of the endothelin receptor antagonist TAK-044 against ischemia-reperfusion injury in the canine liver. *Hepatology* **25**, 938-42.
- Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C. & Lehmann, J. M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813-9.
- Knittel, T., Aurisch, S., Neubauer, K., Eichhorst, S. & Ramadori, G. (1996a). Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. *Am J Pathol* **149**, 449-62.
- Knittel, T., Fellmer, P., Neubauer, K., Kawakami, M., Grundmann, A. & Ramadori, G. (1997). The complement-activating protease P100 is expressed by hepatocytes and is induced by IL-6 in vitro and during the acute phase reaction in vivo. *Lab Invest* **77**, 221-30.
- Knittel, T., Fellmer, P. & Ramadori, G. (1996b). Gene expression and regulation of plasminogen activator inhibitor type I in hepatic stellate cells of rat liver. *Gastroenterology* **111**, 745-54.

- Knittel, T., Janneck, T., Muller, L., Fellmer, P. & Ramadori, G. (1996c). Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. *Hepatology* **24**, 352-60.
- Knittel, T., Kobold, D., Saile, B., Grundmann, A., Neubauer, K., Piscaglia, F. & Ramadori, G. (1999a). Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential [see comments]. *Gastroenterology* **117**, 1205-21.
- Knittel, T., Mehde, M., Kobold, D., Saile, B., Dinter, C. & Ramadori, G. (1999b). Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* **30**, 48-60.
- Koga, H., Sakisaka, S., Ohishi, M., Kawaguchi, T., Taniguchi, E., Sasatomi, K., Harada, M., Kusaba, T., Tanaka, M., Kimura, R., Nakashima, Y., Nakashima, O., Kojiro, M., Kurohiji, T. & Sata, M. (1999). Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* **29**, 688-96.
- Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. & Spiegel, S. (1998). Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* **273**, 23722-8.
- Kohan, D. E. (1993). Endothelins in the kidney: physiology and pathophysiology. *Am J Kidney Dis* **22**, 493-510.
- Kohan, D. E. & Hughes, A. K. (1993). Autocrine role of endothelin in rat IMCD: inhibition of AVP-induced cAMP accumulation. *Am J Physiol* **265**, F126-9.
- Kolesnick, R. N. & Kronke, M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* **60**, 643-65.
- Kourembanas, S., McQuillan, L. P., Leung, G. K. & Faller, D. V. (1993). Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest* **92**, 99-104.
- Kraemer, S. A., Meade, E. A. & DeWitt, D. L. (1992). Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* **293**, 391-400.
- Kravchenko, V. V., Pan, Z., Han, J., Herbert, J. M., Ulevitch, R. J. & Ye, R. D. (1995). Platelet-activating factor induces NF-kappa B activation through a G protein-coupled pathway. *J Biol Chem* **270**, 14928-34.
- Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G. & Wahli, W. (1997). Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* **11**, 779-91.
- Kruger, H., Carr, S., Brennand, J. C. & McLean, J. S. (1995). Activation of phospholipase A2 by the human endothelin receptor in Chinese hamster ovary cells involves Gi protein-mediated calcium influx. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 52-8.
- Krymskaya, V. P., Penn, R. B., Orsini, M. J., Scott, P. H., Plevin, R. J., Walker, T. R., Eszterhas, A. J., Amrani, Y., Chilvers, E. R. & Panettieri, R. A., Jr. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase mediates mitogen-induced human airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol* **277**, L65-78.
- Kujubu, D. A., Fletcher, B. S., Varnum, B. C., Lim, R. W. & Herschman, H. R. (1991). TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* **266**, 12866-72.

- Kujubu, D. A. & Herschman, H. R. (1992). Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *J Biol Chem* **267**, 7991-4.
- Kujubu, D. A., Reddy, S. T., Fletcher, B. S. & Herschman, H. R. (1993). Expression of the protein product of the prostaglandin synthase-2/TIS10 gene in mitogen-stimulated Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* **268**, 5425-30.
- Kurihara, H., Yoshizumi, M., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T., Hamaoki, M., Kato, H. & Yazaki, Y. (1989). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **159**, 1435-40.
- Kurihara, Y., Kurihara, H., Maemura, K., Kuwaki, T., Kumada, M. & Yazaki, Y. (1995a). Impaired development of the thyroid and thymus in endothelin-1 knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol* **26**, S13-6.
- Kurihara, Y., Kurihara, H., Oda, H., Maemura, K., Nagai, R., Ishikawa, T. & Yazaki, Y. (1995b). Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1 [see comments]. *J Clin Invest* **96**, 293-300.
- Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H., Kodama, T., Maemura, K., Nagai, R., Oda, H., Kuwaki, T., Cao, W. H., Kamada, N. & et al. (1994). Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1 [see comments]. *Nature* **368**, 703-10.
- Ladoux, A. & Frelin, C. (1991). Endothelins inhibit adenylate cyclase in brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **180**, 169-73.
- Laffi, G., La Villa, G., Pinzani, M., Marra, F. & Gentilini, P. (1997). Arachidonic acid derivatives and renal function in liver cirrhosis. *Semin Nephrol* **17**, 530-48.
- Lalazar, A., Wong, L., Yamasaki, G. & Friedman, S. L. (1997). Early genes induced in hepatic stellate cells during wound healing. *Gene* **195**, 235-43.
- Langenbach, R., Morham, S. G., Tiano, H. F., Loftin, C. D., Ghanayem, B. I., Chulada, P. C., Mahler, J. F., Lee, C. A., Goulding, E. H., Kluckman, K. D. & et al. (1995). Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* **83**, 483-92.
- Lazarini, F., Strosberg, A. D., Couraud, P. O. & Cazaubon, S. M. (1996). Coupling of ETB endothelin receptor to mitogen-activated protein kinase stimulation and DNA synthesis in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurochem* **66**, 459-65.
- Lee, F. S., Hagler, J., Chen, Z. J. & Maniatis, T. (1997). Activation of the IkappaB kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* **88**, 213-22.
- Lee, F. S., Peters, R. T., Dang, L. C. & Maniatis, T. (1998a). MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9319-24.
- Lee, K. S., Buck, M., Houghlum, K. & Chojkier, M. (1995). Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* **96**, 2461-8.
- Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S. & Hla, T. (1998b). Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* **279**, 1552-5.

- Leivas, A., Jimenez, W., Bruix, J., Boix, L., Bosch, J., Arroyo, V., Rivera, F. & Rodes, J. (1998). Gene expression of endothelin-1 and ET(A) and ET(B) receptors in human cirrhosis: relationship with hepatic hemodynamics. *J Vasc Res* **35**, 186-93.
- Leivas, A., Jimenez, W., Lamas, S., Bosch-Marce, M., Oriola, J., Claria, J., Arroyo, V., Rivera, F. & Rodes, J. (1995). Endothelin 1 does not play a major role in the homeostasis of arterial pressure in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* **108**, 1842-8.
- Levy, M. T., McCaughan, G. W., Abbott, C. A., Park, J. E., Cunningham, A. M., Muller, E., Rettig, W. J. & Gorrell, M. D. (1999). Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology* **29**, 1768-78.
- Li, J. & Brasier, A. R. (1996). Angiotensinogen gene activation by angiotensin II is mediated by the rel A (nuclear factor-kappaB p65) transcription factor: one mechanism for the renin angiotensin system positive feedback loop in hepatocytes. *Mol Endocrinol* **10**, 252-64.
- Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K. F. & Verma, I. M. (1999). Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene [see comments]. *Science* **284**, 321-5.
- Lin, K. I., Lee, S. H., Narayanan, R., Baraban, J. M., Hardwick, J. M. & Ratan, R. R. (1995). Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Cell Biol* **131**, 1149-61.
- Liu, P. & Anderson, R. G. (1995). Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J Biol Chem* **270**, 27179-85.
- Loreal, O., Levavasseur, F., Rescan, P. Y., Yamada, Y., Guillouzo, A. & Clement, B. (1991). Differential expression of laminin chains in hepatic lipocytes. *FEBS Lett* **290**, 9-12.
- MacCumber, M. W., Ross, C. A. & Snyder, S. H. (1990). Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 2359-63.
- MacLennan, A. J., Devlin, B. K., Marks, L., Gaskin, A. A., Neitzel, K. L. & Lee, N. (2000). Antisense studies in PC12 cells suggest a role for H218, a sphingosine 1-phosphate receptor, in growth-factor-induced cell-cell interaction and neurite outgrowth. *Dev Neurosci* **22**, 283-95.
- MacNulty, E. E., Plevin, R. & Wakelam, M. J. (1990). Stimulation of the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylcholine by endothelin, a complete mitogen for Rat-1 fibroblasts. *Biochem J* **272**, 761-6.
- Maher, J. J., Bissell, D. M., Friedman, S. L. & Roll, F. J. (1988). Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer. *J Clin Invest* **82**, 450-9.
- Malek, A. & Izumo, S. (1992). Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol* **263**, C389-96.
- Malek, A. M., Zhang, J., Jiang, J., Alper, S. L. & Izumo, S. (1999). Endothelin-1 gene suppression by shear stress: pharmacological evaluation of the role of tyrosine kinase, intracellular calcium, cytoskeleton, and mechanosensitive channels. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 387-99.
- Mallat, A. (1998). Hepatic stellate cells and intrahepatic modulation of portal pressure. *Digestion* **59**, 416-9.

- Mallat, A., Fouassier, L., Preaux, A. M., Gal, C. S., Raufaste, D., Rosenbaum, J., Dhumeaux, D., Jouneaux, C., Mavier, P. & Lotersztajn, S. (1995a). Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway. *J Clin Invest* **96**, 42-9.
- Mallat, A. & Lotersztajn, S. (1996). Multiple hepatic functions of endothelin-1: physiopathological relevance. *J Hepatol* **25**, 405-13.
- Mallat, A., Preaux, A. M., Blazejewski, S., Rosenbaum, J., Dhumeaux, D. & Mavier, P. (1995b). Interferon alfa and gamma inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture. *Hepatology* **21**, 1003-10.
- Mallat, A., Preaux, A. M., Serradeil-Le Gal, C., Raufaste, D., Gallois, C., Brenner, D. A., Bradham, C., Maclouf, J., Iourgenko, V., Fouassier, L., Dhumeaux, D., Mavier, P. & Lotersztajn, S. (1996). Growth inhibitory properties of endothelin-1 in activated human hepatic stellate cells: a cyclic adenosine monophosphate-mediated pathway. Inhibition of both extracellular signal-regulated kinase and c-Jun kinase and upregulation of endothelin B receptors. *J Clin Invest* **98**, 2771-8.
- Malmberg, A. B. & Yaksh, T. L. (1992). Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* **257**, 1276-9.
- Mari, B., Imbert, V., Belhacene, N., Far, D. F., Peyron, J. F., Pouyssegur, J., Van Obberghen-Schilling, E., Rossi, B. & Auburger, P. (1994). Thrombin and thrombin receptor agonist peptide induce early events of T cell activation and synergize with TCR cross-linking for CD69 expression and interleukin 2 production. *J Biol Chem* **269**, 8517-23.
- Marra, F., Choudhury, G. G., Pinzani, M. & Abboud, H. E. (1994). Regulation of platelet-derived growth factor secretion and gene expression in human liver fat-storing cells. *Gastroenterology* **107**, 1110-7.
- Marra, F., DeFranco, R., Grappone, C., Milani, S., Pinzani, M., Pellegrini, G., Laffi, G. & Gentilini, P. (1998). Expression of the thrombin receptor in human liver: up-regulation during acute and chronic injury. *Hepatology* **27**, 462-71.
- Marra, F., DeFranco, R., Grappone, C., Parola, M., Milani, S., Leonarduzzi, G., Pastacaldi, S., Wenzel, U. O., Pinzani, M., Dianzani, M. U., Laffi, G. & Gentilini, P. (1999a). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 precedes monocyte recruitment in a rat model of acute liver injury, and is modulated by vitamin E. *J Invest Med* **47**, 66-75.
- Marra, F., Gentilini, A., Pinzani, M., Choudhury, G. G., Parola, M., Herbst, H., Dianzani, M. U., Laffi, G., Abboud, H. E. & Gentilini, P. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for platelet-derived growth factor's actions on hepatic stellate cells [see comments]. *Gastroenterology* **112**, 1297-306.
- Marra, F., Grandaliano, G., Valente, A. J. & Abboud, H. E. (1995). Thrombin stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression of monocyte chemoattractant protein-1: potential role in liver injury. *Hepatology* **22**, 780-7.
- Marra, F., Romanelli, R. G., Giannini, C., Failli, P., Pastacaldi, S., Arrighi, M. C., Pinzani, M., Laffi, G., Montalto, P. & Gentilini, P. (1999b). Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* **29**, 140-8.
- Marra, F., Valente, A. J., Pinzani, M. & Abboud, H. E. (1993). Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemoattractant protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* **92**, 1674-80.

- Marsden, P. A. & Brenner, B. M. (1992). Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol* **262**, C854-61.
- Marsden, P. A., Dorfman, D. M., Collins, T., Brenner, B. M., Orkin, S. H. & Ballermann, B. J. (1991). Regulated expression of endothelin 1 in glomerular capillary endothelial cells. *Am J Physiol* **261**, F117-25.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-85.
- Martin, M., Neumann, D., Hoff, T., Resch, K., DeWitt, D. L. & Goppelt-Struebe, M. (1994). Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney Int* **45**, 150-8.
- Martinez, J., Sanchez, T. & Moreno, J. J. (1997). Role of prostaglandin H synthase-2-mediated conversion of arachidonic acid in controlling 3T6 fibroblast growth. *Am J Physiol* **273**, C1466-71.
- Masana, M. I., Brown, R. C., Pu, H., Gurney, M. E. & Dubocovich, M. L. (1995). Cloning and characterization of a new member of the G-protein coupled receptor EDG family. *Receptors Channels* **3**, 255-62.
- Mashiba, S., Mochida, S., Ishikawa, K., Inao, M., Matsui, A., Ohno, A., Ikeda, H., Nagoshi, S., Shibuya, M. & Fujiwara, K. (1999). Inhibition of hepatic stellate cell contraction during activation in vitro by vascular endothelial growth factor in association with upregulation of FLT tyrosine kinase receptor family, FLT-1. *Biochem Biophys Res Commun* **258**, 674-8.
- Matsumoto, S., Yorio, T., Magnino, P. E., DeSantis, L. & Pang, I. H. (1996). Endothelin-induced changes of second messengers in cultured human ciliary muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 1058-66.
- Matsuoka, M., Pham, N. T. & Tsukamoto, H. (1989). Differential effects of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor beta 1 on cell proliferation and collagen formation by cultured fat-storing cells. *Liver* **9**, 71-8.
- Matsuura, T., Hasumura, S., Nagamori, S. & Murakami, K. (1999). Retinol esterification activity contributes to retinol transport in stellate cells. *Cell Struct Funct* **24**, 111-6.
- McAnulty, R. J., Hernandez-Rodriguez, N. A., Mutsaers, S. E., Coker, R. K. & Laurent, G. J. (1997). Indomethacin suppresses the anti-proliferative effects of transforming growth factor-beta isoforms on fibroblast cell cultures. *Biochem J* **321**, 639-43.
- McGeer, P. L., Schulzer, M. & McGeer, E. G. (1996). Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies [see comments]. *Neurology* **47**, 425-32.
- McGuire, R. F., Bissell, D. M., Boyles, J. & Roll, F. J. (1992). Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology* **15**, 989-97.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. & Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation [see comments]. *Science* **278**, 860-6.
- Merlie, J. P., Fagan, D., Mudd, J. & Needleman, P. (1988). Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem* **263**, 3550-3.

- Meyer, D. H., Bachem, M. G. & Gressner, A. M. (1990). Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type beta 1 and type alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **171**, 1122-9.
- Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K. H. & van Koppen, C. J. (1998). Sphingosine kinase-mediated Ca<sup>2+</sup> signalling by G-protein-coupled receptors. *Embo J* **17**, 2830-7.
- Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Riecken, E. O. & Stein, H. (1989). Cellular localization of laminin gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* **134**, 1175-82.
- Mizuno, H., Sakamoto, C., Matsuda, K., Wada, K., Uchida, T., Noguchi, H., Akamatsu, T. & Kasuga, M. (1997). Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice [see comments]. *Gastroenterology* **112**, 387-97.
- Moore, K., Wendon, J., Frazer, M., Karani, J., Williams, R. & Badr, K. (1992). Plasma endothelin immunoreactivity in liver disease and the hepatorenal syndrome [see comments]. *N Engl J Med* **327**, 1774-8.
- Morham, S. G., Langenbach, R., Loftin, C. D., Tian, H. F., Vouloumanos, N., Jennette, J. C., Mahler, J. F., Kluckman, K. D., Ledford, A., Lee, C. A. & et al. (1995). Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* **83**, 473-82.
- Moriarty, K. J., O'Grady, J., Rolston, D. D., Kelly, M. J. & Clark, M. L. (1986). Effect of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) on water and solute transport in the human jejunum. *Gut* **27**, 158-63.
- Morita, I., Schindler, M., Regier, M. K., Otto, J. C., Hori, T., DeWitt, D. L. & Smith, W. L. (1995). Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* **270**, 10902-8.
- Mustafa, S. B., Gandhi, C. R., Harvey, S. A. & Olson, M. S. (1995). Endothelin stimulates platelet-activating factor synthesis by cultured rat Kupffer cells. *Hepatology* **21**, 545-53.
- Nadler, S. P., Zimpelmann, J. A. & Hebert, R. L. (1992). Endothelin inhibits vasopressin-stimulated water permeability in rat terminal inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* **90**, 1458-66.
- Nagy, P., Schaff, Z. & Lapis, K. (1991). Immunohistochemical detection of transforming growth factor-beta 1 in fibrotic liver diseases. *Hepatology* **14**, 269-73.
- Naik, R. D., McNeill, J. R., Wilson, T. W. & Gopalakrishnan, V. (1998). Nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling to endothelin-1 in rat aortic smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **31**, S199-202.
- Nakatani, K., Seki, S., Kawada, N., Kobayashi, K. & Kaneda, K. (1996). Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in perisinusoidal stellate cells of the human liver. *Cell Tissue Res* **283**, 159-65.
- Nakatsukasa, H., Evarts, R. P., Hsia, C. C. & Thorgeirsson, S. S. (1990a). Transforming growth factor-beta 1 and type I procollagen transcripts during regeneration and early fibrosis of rat liver. *Lab Invest* **63**, 171-80.
- Nakatsukasa, H., Nagy, P., Evarts, R. P., Hsia, C. C., Marsden, E. & Thorgeirsson, S. S. (1990b). Cellular distribution of transforming growth factor-beta 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* **85**, 1833-43.

- Nanji, A. A., Miao, L., Thomas, P., Rahemtulla, A., Khwaja, S., Zhao, S., Peters, D., Tahan, S. R. & Dannenberg, A. J. (1997). Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat [see comments]. *Gastroenterology* **112**, 943-51.
- Neaud, V., Faouzi, S., Guirouilh, J., Le Bail, B., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P. & Rosenbaum, J. (1997). Human hepatic myofibroblasts increase invasiveness of hepatocellular carcinoma cells: evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Hepatology* **26**, 1458-66.
- Neubauer, K., Knittel, T., Aurisch, S., Fellmer, P. & Ramadori, G. (1996). Glial fibrillary acidic protein--a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol* **24**, 719-30.
- Niki, T., De Bleser, P. J., Xu, G., Van Den Berg, K., Wisse, E. & Geerts, A. (1996). Comparison of glial fibrillary acidic protein and desmin staining in normal and CCl<sub>4</sub>-induced fibrotic rat livers. *Hepatology* **23**, 1538-45.
- Niki, T., Pekny, M., Hellemans, K., Bleser, P. D., Berg, K. V., Vaeyens, F., Quartier, E., Schuit, F. & Geerts, A. (1999). Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells [see comments]. *Hepatology* **29**, 520-7.
- Ninomiya, H., Inui, T. & Masaki, T. (1998). Paracrine endothelin signaling in the control of basal cell proliferation in guinea pig tracheal epithelium. *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 469-80.
- Nishihara, I., Minami, T., Uda, R., Ito, S., Hyodo, M. & Hayaishi, O. (1995). Effect of NMDA receptor antagonists on prostaglandin E<sub>2</sub>-induced hyperalgesia in conscious mice. *Brain Res* **677**, 138-44.
- Nyberg, L., Duan, R. D., Axelson, J. & Nilsson, A. (1996). Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile. *Biochim Biophys Acta* **1300**, 42-8.
- Obeid, L. M., Linaud, C. M., Karolak, L. A. & Hannun, Y. A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-71.
- Oda, K., Fujitani, Y., Watakabe, T., Inui, T., Okada, T., Urade, Y., Okuda-Ashitaka, E. & Ito, S. (1992). Endothelin stimulates both cAMP formation and phosphatidylinositol hydrolysis in cultured embryonic bovine tracheal cells. *FEBS Lett* **299**, 187-91.
- Ohnaka, K., Takayanagi, R., Nishikawa, M., Haji, M. & Nawata, H. (1993). Purification and characterization of a phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzyme in porcine aortic endothelium. *J Biol Chem* **268**, 26759-66.
- Okazaki, H., Ishizaka, N., Sakurai, T., Kurokawa, K., Goto, K., Kumada, M. & Takuwa, Y. (1993). Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor expressed in the cardiovascular system. *Biochem Biophys Res Commun* **190**, 1104-9.
- Okazaki, T., Bielawska, A., Domae, N., Bell, R. M. & Hannun, Y. A. (1994). Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced HL-60 cell differentiation [published erratum appears in *J Biol Chem* 1994 Jun 10;269(23):16518]. *J Biol Chem* **269**, 4070-7.
- Okazawa, M., Shiraki, T., Ninomiya, H., Kobayashi, S. & Masaki, T. (1998). Endothelin-induced apoptosis of A375 human melanoma cells. *J Biol Chem* **273**, 12584-92.



- Okumura, S., Takei, Y., Kawano, S., Nagano, K., Masuda, E., Goto, M., Tsuji, S., Michida, T., Chen, S. S., Kashiwagi, T. & et al. (1994). Vasoactive effect of endothelin-1 on rat liver in vivo. *Hepatology* **19**, 155-61.
- Olaso, E. & Friedman, S. L. (1998). Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* **29**, 836-47.
- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S. & Spiegel, S. (1999). Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* **147**, 545-58.
- Olivera, A. & Spiegel, S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* **365**, 557-60.
- O'Neill, G. P. & Ford-Hutchinson, A. W. (1993). Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* **330**, 156-60.
- O'Neill, L. A. & Kaltschmidt, C. (1997). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function [see comments]. *Trends Neurosci* **20**, 252-8.
- Ostermann, H., Kirchhof, B. & Pott, G. (1982). Prothrombin determination in plasma and in liver biopsies in chronic liver diseases. *Res Exp Med* **180**, 271-6.
- O'Sullivan, M. G., Huggins, E. M., Jr., Meade, E. A., DeWitt, D. L. & McCall, C. E. (1992). Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 1123-7.
- Otto, J. C. & Smith, W. L. (1994). The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **269**, 19868-75.
- Pan, Z. K., Zuraw, B. L., Lung, C. C., Prossnitz, E. R., Browning, D. D. & Ye, R. D. (1996). Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1beta gene expression in cultured human fibroblasts. *J Clin Invest* **98**, 2042-9.
- Pang, D. C., Johns, A., Patterson, K., Botelho, L. H. & Rubanyi, G. M. (1989). Endothelin-1 stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and calcium uptake in isolated canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* **13**, S75-9; discussion S84.
- Pannen, B. H., Al-Adili, F., Bauer, M., Clemens, M. G. & Geiger, K. K. (1998). Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* **27**, 755-64.
- Paradis, V., Kollinger, M., Fabre, M., Holstege, A., Poynard, T. & Bedossa, P. (1997). In situ detection of lipid peroxidation by-products in chronic liver diseases. *Hepatology* **26**, 135-42.
- Park, Y. N., Yang, C. P., Cubukcu, O., Thung, S. N. & Theise, N. D. (1997). Hepatic stellate cell activation in dysplastic nodules: evidence for an alternate hypothesis concerning human hepatocarcinogenesis. *Liver* **17**, 271-4.
- Parola, M., Pinzani, M., Casini, A., Albano, E., Poli, G., Gentilini, A., Gentilini, P. & Dianzani, M. U. (1993). Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Commun* **194**, 1044-50.
- Parola, M., Robino, G., Marra, F., Pinzani, M., Bellomo, G., Leonarduzzi, G., Chiarugi, P., Camandola, S., Poli, G., Waeg, G., Gentilini, P. & Dianzani, M. U. (1998). HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J Clin Invest* **102**, 1942-50.

- Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Rogers, R. S., Rogier, D. J., Yu, S. S., Anderson Gd, Burton, E. G., Cogburn, J. N., Gregory, S. A., Koboldt, C. M., Perkins, W. E., Seibert, K., Veenhuizen, A. W., Zhang, Y. Y. & Isakson, P. C. (1997). Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzene sulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* **40**, 1347-65.
- Perkins, N. D. (2000). The Rel/NF-kappaB family: friend and foe [In Process Citation]. *Trends Biochem Sci* **25**, 434-40.
- Pernow, J., Hemsén, A., Hallén, A. & Lundberg, J. M. (1990). Release of endothelin-like immunoreactivity in relation to neuropeptide Y and catecholamines during endotoxin shock and asphyxia in the pig. *Acta Physiol Scand* **140**, 311-22.
- Pinzani, M., Abboud, H. E. & Aron, D. C. (1990). Secretion of insulin-like growth factor-I and binding proteins by rat liver fat-storing cells: regulatory role of platelet-derived growth factor. *Endocrinology* **127**, 2343-9.
- Pinzani, M., Failli, P., Ruocco, C., Casini, A., Milani, S., Baldi, E., Giotti, A. & Gentilini, P. (1992). Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest* **90**, 642-6.
- Pinzani, M., Gentilini, A., Caligiuri, A., De Franco, R., Pellegrini, G., Milani, S., Marra, F. & Gentilini, P. (1995). Transforming growth factor-beta 1 regulates platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human liver fat-storing cells. *Hepatology* **21**, 232-9.
- Pinzani, M., Gesualdo, L., Sabbah, G. M. & Abboud, H. E. (1989). Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* **84**, 1786-93.
- Pinzani, M., Knauss, T. C., Pierce, G. F., Hsieh, P., Kenney, W., Dubyak, G. R. & Abboud, H. E. (1991). Mitogenic signals for platelet-derived growth factor isoforms in liver fat-storing cells. *Am J Physiol* **260**, C485-91.
- Pinzani, M., Marra, F., Caligiuri, A., DeFranco, R., Gentilini, A., Failli, P. & Gentilini, P. (1996a). Inhibition by pentoxifylline of extracellular signal-regulated kinase activation by platelet-derived growth factor in hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* **119**, 1117-24.
- Pinzani, M., Milani, S., De Franco, R., Grappone, C., Caligiuri, A., Gentilini, A., Tosti-Guerra, C., Maggi, M., Failli, P., Ruocco, C. & Gentilini, P. (1996b). Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **110**, 534-48.
- Pinzani, M., Milani, S., Grappone, C., Weber, F. L., Jr., Gentilini, P. & Abboud, H. E. (1994). Expression of platelet-derived growth factor in a model of acute liver injury. *Hepatology* **19**, 701-7.
- Pinzani, M., Milani, S., Herbst, H., DeFranco, R., Grappone, C., Gentilini, A., Caligiuri, A., Pellegrini, G., Ngo, D. V., Romanelli, R. G. & Gentilini, P. (1996c). Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol* **148**, 785-800.

- Poo, J. L., Jimenez, W., Maria Munoz, R., Bosch-Marce, M., Bordas, N., Morales-Ruiz, M., Perez, M., Deulofeu, R., Sole, M., Arroyo, V. & Rodes, J. (1999). Chronic blockade of endothelin receptors in cirrhotic rats: hepatic and hemodynamic effects. *Gastroenterology* **116**, 161-7.
- Pouyssegur, J. & Seuwen, K. (1992). Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Annu Rev Physiol* **54**, 195-210.
- Prescott, S. M. & Fitzpatrick, F. A. (2000). Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1470**, M69-78.
- Pushkareva, M., Chao, R., Bielawska, A., Merrill, A. H., Jr., Crane, H. M., Lagu, B., Liotta, D. & Hannun, Y. A. (1995). Stereoselectivity of induction of the retinoblastoma gene product (pRb) dephosphorylation by D-erythro-sphingosine supports a role for pRb in growth suppression by sphingosine. *Biochemistry* **34**, 1885-92.
- Pyne, S. & Pyne, N. J. (2000). Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* **349**, 385-402.
- Ramm, G. A., Britton, R. S., O'Neill, R., Blaner, W. S. & Bacon, B. R. (1995). Vitamin A-poor lipocytes: a novel desmin-negative lipocyte subpopulation, which can be activated to myofibroblasts. *Am J Physiol* **269**, G532-41.
- Rankin, S. & Rozengurt, E. (1994). Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Bell-shaped dose response and cross-talk with bombesin. *J Biol Chem* **269**, 704-10.
- Razandi, M., Pedram, A., Rubin, T. & Levin, E. R. (1996). PGE2 and PGI2 inhibit ET-1 secretion from endothelial cells by stimulating particulate guanylate cyclase. *Am J Physiol* **270**, H1342-9.
- Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z. & Rothe, M. (1997). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* **90**, 373-83.
- Renard, P., Percherancier, Y., Kroll, M., Thomas, D., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F. & Bachelier, F. (2000). Inducible NF-kappaB activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear IkappaBalpha. *J Biol Chem* **275**, 15193-9.
- Resink, T. J., Scott-Burden, T. & Buhler, F. R. (1989). Activation of phospholipase A2 by endothelin in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **158**, 279-86.
- Rieder, H., Armbrust, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Ramadori, G. (1993). Contribution of sinusoidal endothelial liver cells to liver fibrosis: expression of transforming growth factor-beta 1 receptors and modulation of plasmin-generating enzymes by transforming growth factor- beta 1. *Hepatology* **18**, 937-44.
- Rieder, H., Ramadori, G. & Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1991). Sinusoidal endothelial liver cells in vitro release endothelin-- augmentation by transforming growth factor beta and Kupffer cell- conditioned media. *Klin Wochenschr* **69**, 387-91.
- Rippe, R. A., Almounajed, G. & Brenner, D. A. (1995). Sp1 binding activity increases in activated Ito cells. *Hepatology* **22**, 241-51.
- Rius, R. A., Edsall, L. C. & Spiegel, S. (1997). Activation of sphingosine kinase in pheochromocytoma PC12 neuronal cells in response to trophic factors. *FEBS Lett* **417**, 173-6.

- Rockey, D. C., Fouassier, L., Chung, J. J., Carayon, A., Vallee, P., Rey, C. & Housset, C. (1998). Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology* **27**, 472-80.
- Rockey, D. C. & Weisiger, R. A. (1996). Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* **24**, 233-40.
- Rozengurt, E., Stroobant, P., Waterfield, M. D., Deuel, T. F. & Keehan, M. (1983). Platelet-derived growth factor elicits cyclic AMP accumulation in Swiss 3T3 cells: role of prostaglandin production. *Cell* **34**, 265-72.
- Russell, F. D. & Davenport, A. P. (1999). Evidence for intracellular endothelin-converting enzyme-2 expression in cultured human vascular endothelial cells. *Circ Res* **84**, 891-6.
- Russell, R. I. (1986). Protective effects of the prostaglandins on the gastric mucosa. *Am J Med* **81**, 2-4.
- Sadahira, Y., Ruan, F., Hakomori, S. & Igarashi, Y. (1992). Sphingosine 1-phosphate, a specific endogenous signaling molecule controlling cell motility and tumor cell invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9686-90.
- Saile, B., Matthes, N., Knittel, T. & Ramadori, G. (1999). Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **30**, 196-202.
- Sakamoto, A., Yanagisawa, M., Sawamura, T., Enoki, T., Ohtani, T., Sakurai, T., Nakao, K., Toyooka, T. & Masaki, T. (1993). Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelinA-selective antagonist and endothelinB-selective agonists. *J Biol Chem* **268**, 8547-53.
- Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K. & Masaki, T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor [see comments]. *Nature* **348**, 732-5.
- Sato, K., Tomura, H., Igarashi, Y., Ui, M. & Okajima, F. (1999). Possible involvement of cell surface receptors in sphingosine 1-phosphate-induced activation of extracellular signal-regulated kinase in C6 glioma cells. *Mol Pharmacol* **55**, 126-33.
- Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D. & Parsons, J. T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* **130**, 1181-7.
- Schmidt, M., Kroger, B., Jacob, E., Seulberger, H., Subkowski, T., Otter, R., Meyer, T., Schmalzing, G. & Hillen, H. (1994). Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett* **356**, 238-43.
- Schmitt-Graff, A., Kruger, S., Bochar, F., Gabbiani, G. & Denk, H. (1991). Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol* **138**, 1233-42.
- Senoo, H., Stang, E., Nilsson, A., Kindberg, G. M., Berg, T., Roos, N., Norum, K. R. & Blomhoff, R. (1990). Internalization of retinol-binding protein in parenchymal and stellate cells of rat liver. *J Lipid Res* **31**, 1229-39.

- Serradeil-Le Gal, C., Jouneaux, C., Sanchez-Bueno, A., Raufaste, D., Roche, B., Preaux, A. M., Maffrand, J. P., Cobbold, P. H., Hanoune, J. & Lotersztajn, S. (1991). Endothelin action in rat liver. Receptors, free Ca<sup>2+</sup> oscillations, and activation of glycogenolysis. *J Clin Invest* **87**, 133-8.
- Shamim, A., Pelzer, T., Grohe, C. & Neyses, L. (1999). Induction of Egr-1 mRNA and protein by endothelin 1, angiotensin II and norepinephrine in neonatal cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* **195**, 11-7.
- Shao, R., Yan, W. & Rockey, D. C. (1999). Regulation of endothelin-1 synthesis by endothelin-converting enzyme-1 during wound healing. *J Biol Chem* **274**, 3228-34.
- Shapiro, P. S., Evans, J. N., Davis, R. J. & Posada, J. A. (1996). The seven-transmembrane-spanning receptors for endothelin and thrombin cause proliferation of airway smooth muscle cells and activation of the extracellular regulated kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase groups of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **271**, 5750-4.
- Sheng, G. G., Shao, J., Sheng, H., Hooton, E. B., Isakson, P. C., Morrow, J. D., Coffey, R. J., Jr., DuBois, R. N. & Beauchamp, R. D. (1997). A selective cyclooxygenase 2 inhibitor suppresses the growth of H-ras-transformed rat intestinal epithelial cells [see comments]. *Gastroenterology* **113**, 1883-91.
- Shiba, R., Sakurai, T., Yamada, G., Morimoto, H., Saito, A., Masaki, T. & Goto, K. (1992). Cloning and expression of rat preproendothelin-3 cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 588-94.
- Shichiri, M., Marumo, F. & Hirata, Y. (1998a). Endothelin-B receptor-mediated suppression of endothelial apoptosis. *J Cardiovasc Pharmacol* **31**, S138-41.
- Shichiri, M., Sedivy, J. M., Marumo, F. & Hirata, Y. (1998b). Endothelin-1 is a potent survival factor for c-Myc-dependent apoptosis. *Mol Endocrinol* **12**, 172-80.
- Shigematsu, K., Nakatani, A., Kawai, K., Moriuchi, R., Katamine, S., Miyamoto, T. & Niwa, M. (1996). Two subtypes of endothelin receptors and endothelin peptides are expressed in differential cell types of the rat placenta: in vitro receptor autoradiographic and in situ hybridization studies. *Endocrinology* **137**, 738-48.
- Shigematsu, T., Miura, S., Hirokawa, M., Hokari, R., Higuchi, H., Watanabe, N., Tsuzuki, Y., Kimura, H., Tada, S., Nakatsumi, R. C., Saito, H. & Ishii, H. (1998). Induction of endothelin-1 synthesis by IL-2 and its modulation of rat intestinal epithelial cell growth. *Am J Physiol* **275**, G556-63.
- Siebenlist, U., Franzoso, G. & Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 405-55.
- Simonson, M. S. & Dunn, M. J. (1990a). Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *Faseb J* **4**, 2989-3000.
- Simonson, M. S. & Dunn, M. J. (1990b). Endothelin-1 stimulates contraction of rat glomerular mesangial cells and potentiates beta-adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. *J Clin Invest* **85**, 790-7.
- Simonson, M. S., Wann, S., Mene, P., Dubyak, G. R., Kester, M., Nakazato, Y., Sedor, J. R. & Dunn, M. J. (1989). Endothelin stimulates phospholipase C, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* **83**, 708-12.

- Sirois, J., Simmons, D. L. & Richards, J. S. (1992). Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **267**, 11586-92.
- Smith, W. L., Garavito, R. M. & DeWitt, D. L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* **271**, 33157-60.
- Sokolovsky, M. (1992). Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Pharmacol Ther* **54**, 129-49.
- Soper, C. P., Latif, A. B. & Bending, M. R. (1996). Amelioration of hepatorenal syndrome with selective endothelin-A antagonist [letter]. *Lancet* **347**, 1842-3.
- Sorli, C. H., Zhang, H. J., Armstrong, M. B., Rajotte, R. V., Maclouf, J. & Robertson, R. P. (1998). Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1788-93.
- Spence, M. W., Wakkary, J., Clarke, J. T. & Cook, H. W. (1982). Localization of neutral magnesium-stimulated sphingomyelinase in plasma membrane of cultured neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* **719**, 162-4.
- Spiegel, S. (2000). Sphingosine 1-phosphate: a ligand for the EDG-1 family of G-protein- coupled receptors. *Ann NY Acad Sci* **905**, 54-60.
- Spiegel, S., Foster, D. & Kolesnick, R. (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 159-67.
- Spiegel, S. & Merrill, A. H., Jr. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *Faseb J* **10**, 1388-97.
- Spiegel, S. & Milstien, S. (2000). Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett* **476**, 55-7.
- Stanimirovic, D. B., Bacic, F., Uematsu, S. & Spatz, M. (1993). Profile of prostaglandins induced by endothelin-1 in human brain capillary endothelium. *Neurochem Int* **23**, 385-93.
- Stanimirovic, D. B., Nikodijevic, B., Nikodijevic-Kedeva, D., McCarron, R. M. & Spatz, M. (1994). Signal transduction and Ca<sup>2+</sup> uptake activated by endothelins in rat brain endothelial cells [published erratum appears in Eur J Pharmacol 1995 Apr 28;289(2):409]. *Eur J Pharmacol* **288**, 1-8.
- Stephenson, K., Gupta, A., Mustafa, S. B. & Halff, G. A. (1997). Endothelin-stimulated nitric oxide production in the isolated Kupffer cell. *J Surg Res* **73**, 149-54.
- Stephenson, K., Harvey, S. A., Mustafa, S. B., Eakes, A. T. & Olson, M. S. (1995). Endothelin association with the cultured rat Kupffer cell: characterization and regulation. *Hepatology* **22**, 896-905.
- Stewart, W. F., Kawas, C., Corrada, M. & Metter, E. J. (1997). Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use [see comments]. *Neurology* **48**, 626-32.
- Suzuki, A., Oiso, Y. & Kozawa, O. (1994). Effect of endothelin-1 on phospholipase D activity in osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol* **105**, 193-6.
- Suzuki, A., Shinoda, J., Watanabe-Tomita, Y., Ozaki, N., Oiso, Y. & Kozawa, O. (1997). ETA receptor mediates the signaling of endothelin-1 in osteoblast-like cells. *Bone* **21**, 143-6.
- Suzuki, N., Matsumoto, H., Kitada, C., Kimura, S. & Fujino, M. (1989). Production of endothelin-1 and big-endothelin-1 by tumor cells with epithelial-like morphology. *J Biochem (Tokyo)* **106**, 736-41.

- Svegliati-Baroni, G., Ridolfi, F., Di Sario, A., Casini, A., Marucci, L., Gaggiotti, G., Orlandoni, P., Macarri, G., Perego, L., Benedetti, A. & Folli, F. (1999). Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* **29**, 1743-51.
- Tada, A., Suzuki, I., Im, S., Davis, M. B., Cornelius, J., Babcock, G., Nordlund, J. J. & Abdel-Malek, Z. A. (1998). Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ* **9**, 575-84.
- Takagi, Y., Ninomiya, H., Sakamoto, A., Miwa, S. & Masaki, T. (1995). Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelinA/B chimeras. *J Biol Chem* **270**, 10072-8.
- Takahashi, M., Fukuda, K., Shimada, K., Barnes, K., Turner, A. J., Ikeda, M., Koike, H., Yamamoto, Y. & Tanzawa, K. (1995). Localization of rat endothelin-converting enzyme to vascular endothelial cells and some secretory cells. *Biochem J* **311**, 657-65.
- Takahashi, M., Matsushita, Y., Iijima, Y. & Tanzawa, K. (1993). Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Biol Chem* **268**, 21394-8.
- Takano, M., Nishimura, H., Kimura, Y., Washizu, J., Mokuno, Y., Nimura, Y. & Yoshikai, Y. (1998). Prostaglandin E2 protects against liver injury after Escherichia coli infection but hampers the resolution of the infection in mice. *J Immunol* **161**, 3019-25.
- Takasaki, C., Tamiya, N., Bdolah, A., Wollberg, Z. & Kochva, E. (1988). Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. *Toxicon* **26**, 543-8.
- Takimoto, M., Oda, K., Fruh, T., Takai, M., Okada, T. & Sasaki, Y. (1996). ETA and ETB receptors cooperate in DNA synthesis via opposing regulations of cAMP in human lung cell line. *Am J Physiol* **271**, L366-73.
- Tanaka, A., Katagiri, K., Hoshino, M., Hayakawa, T., Tsukada, K. & Takeuchi, T. (1994). Endothelin-1 stimulates bile acid secretion and vesicular transport in the isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* **266**, G324-9.
- Tanaka, M., Fuentes, M. E., Yamaguchi, K., Durnin, M. H., Dalrymple, S. A., Hardy, K. L. & Goeddel, D. V. (1999). Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* **10**, 421-9.
- Tao, J., Mallat, A., Gallois, C., Belmadani, S., Mery, P. F., Nhieu, J. T., Pavoine, C. & Lotersztajn, S. (1999). Biological effects of C-type natriuretic peptide in human myofibroblastic hepatic stellate cells. *J Biol Chem* **274**, 23761-9.
- Teixeira, A., Chaverot, N., Schroder, C., Strosberg, A. D., Couraud, P. O. & Cazaubon, S. (1999). Requirement of caveolae microdomains in extracellular signal-regulated kinase and focal adhesion kinase activation induced by endothelin-1 in primary astrocytes. *J Neurochem* **72**, 120-8.
- Tepper, C. G., Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A., Wolff, R., Yonehara, S., Hannun, Y. A. & Seldin, M. F. (1995). Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8443-7.
- Tewari, M., Dobrzanski, P., Mohn, K. L., Cressman, D. E., Hsu, J. C., Bravo, R. & Taub, R. (1992). Rapid induction in regenerating liver of RL/IF-1 (an I kappa B that inhibits NF-kappa B, RelB-p50, and c-Rel-p50) and PHF, a novel kappa B site-binding complex. *Mol Cell Biol* **12**, 2898-908.

- Thanos, D. & Maniatis, T. (1995). NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* **80**, 529-32.
- Theret, N., Musso, O., L'Helgoualc'h, A. & Clement, B. (1997). Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol* **150**, 51-8.
- Thomas, T., Kurihara, H., Yamagishi, H., Kurihara, Y., Yazaki, Y., Olson, E. N. & Srivastava, D. (1998). A signaling cascade involving endothelin-1, dHAND and msx1 regulates development of neural-crest-derived branchial arch mesenchyme. *Development* **125**, 3005-14.
- Thompson, K. C., Trowern, A., Fowell, A., Marathe, M., Haycock, C., Arthur, M. J. & Sheron, N. (1998). Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation In vitro. *Hepatology* **28**, 1518-24.
- Throckmorton, D. C., Dickinson, M. & Dransfield, D. T. (1996). Type I A-kinase is activated by platelet-derived growth factor in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 692-6.
- Tigyi, G., Dyer, D. L. & Miledi, R. (1994). Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1908-12.
- Tran-Thi, T. A., Kawada, N. & Decker, K. (1993). Regulation of endothelin-1 action on the perfused rat liver. *FEBS Lett* **318**, 353-7.
- Tsuboi, R., Sato, C., Oshita, Y., Hama, H., Sakurai, T., Goto, K. & Ogawa, H. (1995). Ultraviolet B irradiation increases endothelin-1 and endothelin receptor expression in cultured human keratinocytes. *FEBS Lett* **371**, 188-90.
- Tsujii, H., Okamoto, Y., Kikuchi, E., Matsumoto, M. & Nakano, H. (1993). Prostaglandin E2 and rat liver regeneration. *Gastroenterology* **105**, 495-9.
- Uhlik, M., Good, L., Xiao, G., Harhaj, E. W., Zandi, E., Karin, M. & Sun, S. C. (1998). NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase participate in human T- cell leukemia virus I Tax-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **273**, 21132-6.
- Vainio, M., Saijonmaa, O., Fyhrquist, F. & Tornquist, K. (1996). Purinergic agonists stimulate the secretion of endothelin-1 in rat thyroid FRTL-5 cells. *J Cell Physiol* **169**, 538-43.
- Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J., Thangada, S., Liu, C. H., Hla, T. & Spiegel, S. (1998). Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi- coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* **142**, 229-40.
- Van Eyken, P., Geerts, A., De Bleser, P., Lazou, J. M., Vrijsen, R., Sciot, R., Wisse, E. & Desmet, V. J. (1992). Localization and cellular source of the extracellular matrix protein tenascin in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology* **15**, 909-16.
- Vicente, C. P., Fortuna, V. A., Margis, R., Trugo, L. & Borojevic, R. (1998). Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in an in vitro model of hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* **187**, 11-21.
- Vidal, C., Raully, I., Zeggari, M., Delesque, N., Esteve, J. P., Saint-Laurent, N., Vaysse, N. & Susini, C. (1994). Up-regulation of somatostatin receptors by epidermal growth factor and gastrin in pancreatic cancer cells. *Mol Pharmacol* **46**, 97-104.



- Vigne, P., Breittmayer, J. P., Marsault, R. & Frelin, C. (1990a). Endothelin mobilizes Ca<sup>2+</sup> from a caffeine- and ryanodine-insensitive intracellular pool in rat atrial cells. *J Biol Chem* **265**, 6782-7.
- Vigne, P., Ladoux, A. & Frelin, C. (1991). Endothelins activate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in brain capillary endothelial cells via a high affinity endothelin-3 receptor that is not coupled to phospholipase C. *J Biol Chem* **266**, 5925-8.
- Vigne, P., Lazdunski, M. & Frelin, C. (1989). The inotropic effect of endothelin-1 on rat atria involves hydrolysis of phosphatidylinositol. *FEBS Lett* **249**, 143-6.
- Vigne, P., Marsault, R., Breittmayer, J. P. & Frelin, C. (1990b). Endothelin stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and DNA synthesis in brain capillary endothelial cells. *Biochem J* **266**, 415-20.
- Vittet, D., Mathieu, M. N., Launay, J. M. & Chevillard, C. (1992). Thrombin inhibits proliferation of the human megakaryoblastic MEG-01 cell line: a possible involvement of a cyclic-AMP dependent mechanism. *J Cell Physiol* **150**, 65-75.
- Vrochides, D., Papanikolaou, V., Pertoft, H., Antoniadis, A. A. & Heldin, P. (1996). Biosynthesis and degradation of hyaluronan by nonparenchymal liver cells during liver regeneration. *Hepatology* **23**, 1650-5.
- Vyas, S. K., Leyland, H., Gentry, J. & Arthur, M. J. (1995). Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology* **109**, 889-98.
- Wadleigh, D. J. & Herschman, H. R. (1999). Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene by diverse ligands in murine osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 865-70.
- Walenga, R. W., Kester, M., Coroneos, E., Butcher, S., Dwivedi, R. & Statt, C. (1996). Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthetase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in human tracheal epithelial cells in vitro. *Prostaglandins* **52**, 341-59.
- Wang, P. & Bitar, K. N. (1998). Rho A regulates sustained smooth muscle contraction through cytoskeletal reorganization of HSP27. *Am J Physiol* **275**, G1454-62.
- Wang, S. C., Ohata, M., Schrum, L., Rippe, R. A. & Tsukamoto, H. (1998a). Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* **273**, 302-8.
- Wang, X. D., Liu, C., Chung, J., Stickle, F., Seitz, H. K. & Russell, R. M. (1998b). Chronic alcohol intake reduces retinoic acid concentration and enhances AP-1 (c-Jun and c-Fos) expression in rat liver. *Hepatology* **28**, 744-50.
- Wang, X. E., Watanabe, S., Oide, H., Hirose, M., Itatsu, T., Osada, T., Takazakura, Y., Yokoi, Y. & Sato, N. (1998c). Hepatic stellate cell contraction is inhibited by lipo-prostaglandin E1 in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* **13 Suppl**, S14-8.
- Watanabe, S., Hirose, M., Wang, X. E., Ikejima, K., Oide, H., Kitamura, T., Takei, Y., Miyazaki, A. & Sato, N. (1998). A novel hepatic stellate (Ito) cell-derived protein, epimorphin, plays a key role in the late stages of liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **250**, 486-90.
- Wilkes, B. M., Ruston, A. S., Mento, P., Girardi, E., Hart, D., Vander Molen, M., Barnett, R. & Nord, E. P. (1991). Characterization of endothelin 1 receptor and signal transduction mechanisms in rat medullary interstitial cells. *Am J Physiol* **260**, F579-89.

- Williams, C. S., Smalley, W. & DuBois, R. N. (1997). Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. *J Clin Invest* **100**, 1325-9.
- Win, K. M., Charlotte, F., Mallat, A., Cherqui, D., Martin, N., Mavier, P., Preaux, A. M., Dhumeaux, D. & Rosenbaum, J. (1993). Mitogenic effect of transforming growth factor-beta 1 on human Ito cells in culture: evidence for mediation by endogenous platelet-derived growth factor. *Hepatology* **18**, 137-45.
- Windh, R. T., Lee, M. J., Hla, T., An, S., Barr, A. J. & Manning, D. R. (1999). Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **274**, 27351-8.
- Wong, L., Yamasaki, G., Johnson, R. J. & Friedman, S. L. (1994). Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest* **94**, 1563-9.
- Wu, H. H., Tao, L. C. & Cramer, H. M. (1996a). Vimentin-positive spider-shaped Kupffer cells. A new clue to cytologic diagnosis of primary and metastatic hepatocellular carcinoma by fine-needle aspiration biopsy. *Am J Clin Pathol* **106**, 517-21.
- Wu, J., Spiegel, S. & Sturgill, T. W. (1995). Sphingosine 1-phosphate rapidly activates the mitogen-activated protein kinase pathway by a G protein-dependent mechanism. *J Biol Chem* **270**, 11484-8.
- Wu, M., Lee, H., Bellas, R. E., Schauer, S. L., Arsur, M., Katz, D., FitzGerald, M. J., Rothstein, T. L., Sherr, D. H. & Sonenshein, G. E. (1996b). Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *Embo J* **15**, 4682-90.
- Wu-Wong, J. R., Chiou, W. J., Dickinson, R. & Opgenorth, T. J. (1997). Endothelin attenuates apoptosis in human smooth muscle cells. *Biochem J* **328**, 733-7.
- Xia, P., Gamble, J. R., Rye, K. A., Wang, L., Hii, C. S., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A. G., Barter, P. J. & Vadas, M. A. (1998). Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14196-201.
- Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L. & Simmons, D. L. (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 2692-6.
- Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D. & Yanagisawa, M. (1994). ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* **78**, 473-85.
- Xuan, Y. T., Watkins, W. D. & Whorton, A. R. (1991). Regulation of endothelin-mediated calcium mobilization in vascular smooth muscle cells by isoproterenol. *Am J Physiol* **260**, C492-502.
- Yamagata, K., Andreasson, K. I., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A. & Worley, P. F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* **11**, 371-86.
- Yamagishi, S., Hsu, C. C., Kobayashi, K. & Yamamoto, H. (1993). Endothelin 1 mediates endothelial cell-dependent proliferation of vascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* **191**, 840-6.
- Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N. & Yamamoto, S. (1995). Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* **270**, 31315-20.

- Yamamoto, T. & Nozaki-Taguchi, N. (1996). Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. *Brain Res* **739**, 104-10.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J. & Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* **93**, 1231-40.
- Yamazaki, Y., Kon, J., Sato, K., Tomura, H., Sato, M., Yoneya, T., Okazaki, H., Okajima, F. & Ohta, H. (2000). Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca(2+) signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 583-9.
- Yamboliev, I. A., Hruby, A. & Gerthoffer, W. T. (1998). Endothelin-1 activates MAP kinases and c-Jun in pulmonary artery smooth muscle. *Pulm Pharmacol Ther* **11**, 205-8.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. & Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells [see comments]. *Nature* **332**, 411-5.
- Yang, Q., Battistini, B., D'Orleans-Juste, P., Jeng, A. Y. & Sirois, P. (1997). Modulation of endothelin production and metabolism in guinea-pig tracheal epithelial cells by peptidase inhibitors. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 1884-9.
- Yatomi, Y., Ruan, F., Hakomori, S. & Igarashi, Y. (1995). Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* **86**, 193-202.
- Yin, M. J., Christerson, L. B., Yamamoto, Y., Kwak, Y. T., Xu, S., Mercurio, F., Barbosa, M., Cobb, M. H. & Gaynor, R. B. (1998). HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkappaB kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell* **93**, 875-84.
- Yokoyama, C., Takai, T. & Tanabe, T. (1988). Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett* **231**, 347-51.
- Yorimitsu, K., Moroi, K., Inagaki, N., Saito, T., Masuda, Y., Masaki, T., Seino, S. & Kimura, S. (1995). Cloning and sequencing of a human endothelin converting enzyme in renal adenocarcinoma (ACHN) cells producing endothelin-2. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 721-7.
- Yoshizumi, M., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T. & Yazaki, Y. (1989). Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161**, 859-64.
- Zandi, E., Chen, Y. & Karin, M. (1998). Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate. *Science* **281**, 1360-3.
- Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M. & Karin, M. (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* **91**, 243-52.
- Zhang, H., Desai, N. N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G. & Spiegel, S. (1991). Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* **114**, 155-67.
- Zhang, J. X., Pegoli, W., Jr. & Clemens, M. G. (1994). Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* **266**, G624-32.

Zou, Z., Ekataksin, W. & Wake, K. (1998). Zonal and regional differences identified from precision mapping of vitamin A-storing lipid droplets of the hepatic stellate cells in pig liver: a novel concept of addressing the intralobular area of heterogeneity. *Hepatology* 27, 1098-108.