

UNIVERSITE DE SHERBROOKE

**EFFETS DU NEUROPEPTIDE Y SUR LES
VOIES AERIENNES DE COBAYE ET SUR LE GROS
INTESTIN DE RAT: ETUDE DE STRUCTURE-ACTIVITE.**

par

MAJDA TAOUDI BENCHEKROUN

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de
Médecine en vue de l'obtention
du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)

Mai 1990

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-61301-7

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	x
ABREVIATIONS	xiii
RESUME	xiv
INTRODUCTION	1
1. GENERALITES SUR LE NEUROPEPTIDE Y (NPY)	1
1.1 Découverte, isolation et structure	1
2. LOCALISATION ET DISTRIBUTION	5
2.1 Système nerveux central	5
2.2 Système nerveux périphérique	7
3. CARACTERISTIQUES DES FIBRES NERVEUSES	
PERIPHERIQUES CONTENANT LE NPY	11
4. SITES RECEPTEURS	13
4.1 Système nerveux central	13
4.2 Système nerveux périphérique	13
4.3 Sous-classes de récepteurs pour le NPY	14
5. ACTIVITES PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES	14
5.1 Système nerveux central	15
5.2 Système nerveux périphérique	15
6. BUTS DE L'ETUDE	20
MATERIEL ET METHODES	21
1. ANIMAUX	21

2. PRELEVEMENT DES TISSUS	21
3. PREPARATION DES TISSUS	22
3.1 Tractus respiratoire de cobaye et de rat	22
3.2 Tractus gastro-intestinal de rat	22
3.3 Autres tissus	23
4. ESSAIS BIOLOGIQUES	23
5. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	24
5.1 Méthodologie générale	24
5.2 Méthodologie spécifique	24
5.2.1 Effet direct du p-NPY et du PYY	24
5.2.2 Effet modulateur du NPY	25
5.2.3 Mécanisme d'action du NPY, du fragment NPY (13-36) et du PYY	26
5.2.4 Etude de structure activité	26
6. SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES	28
7. PARAMETRES PHARMACOLOGIQUES	29
8. STATISTIQUES	29
RESULTATS	30
1. SYSTEME RESPIRATOIRE	30
1.1 Effet du p-NPY sur les voies aériennes de cobaye, de rat et de l'homme	30
1.2 Puissance relative du p-NPY sur la trachée de cobaye	33
1.3 Mécanisme d'action du p-NPY sur les	

	vóies aériennes de cobaye	35
1.4	Effet inhibiteur du p-NPY sur la trachée de cobaye	35
1.4.1	Norépinéphrine (NE)	35
1.4.2	Peptide vasoactif intestinal (VIP)	36
1.4.3	Agonistes contractiles	40
2.	SYSTEME GASTRO-INTESTINAL DE RAT	43
2.1	Effets du NPY et du PYY sur le côlon de rat	43
2.2	Puissance relative du p-NPY et du PYY sur le côlon descendant de rat	49
2.3	Mécanisme d'action du p-NPY et du PYY sur le côlon descendant de rat	52
2.3.1	Mécanisme d'action du p-NPY	52
2.3.2	Mécanisme d'action du PYY	52
3.	ETUDE DE STRUCTURE ACTIVITE	54
3.1	Fragments du p-NPY	54
3.1.1	Mécanisme d'action du fragment p-NPY(13-36)	60
3.2	Analogues du NPY	62
3.2.1	Modifications de la molécule de h-NPY en position 20	62
3.2.2	Modifications de la molécule de h-NPY en position 21	68
3.2.3	Autres analogues du h-NPY	72
	DISCUSSION	76

1.	EFFETS DU NPY SUR LES VOIES AERIENNES DES MAMMIFERES	76
2.	EFFETS DU NPY ET DU PYY SUR LE COLON DESCENDANT DE RAT	91
3.	ETUDE DE STRUCTURE ACTIVITE DU NPY	95
	CONCLUSION	106
	REMERCIEMENTS	107
	BIBLIOGRAPHIE	108

LISTE DES FIGURES

- FIGURE # 1: Structure primaire du Neuropeptide Y (NPY) humain. 2
- FIGURE # 2: Réponses contractiles induites par le p-NPY et l'histamine (H) sur les voies aériennes de cobaye. 31
- FIGURE # 3: Courbes doses-réponses cumulatives induites par l'addition de p-NPY sur des préparations isolées de trachées, de bronches principales et de bandelettes de parenchyme pulmonaire de cobaye. 32
- FIGURE # 4: Courbes doses-réponses cumulatives induites par la norépinéphrine (NE) sur des préparations isolées de trachée de cobaye en absence et en présence de 30 nM de NPY. 37
- FIGURE # 5: Courbes doses-réponses cumulatives

	induites par le peptide vasoactif intestinal (VIP) sur des préparations isolées de trachée de cobaye en absence et en présence de 30 nM de p-NPY.	38
FIGURE # 6:	Courbes doses-réponses cumulatives induites par le 5-hydroxytryptamine (5-HT), la substance P (SP), le carbamylcholine (Carb) et l'histamine (H) sur la trachée de cobaye en absence et en présence de 30 nM de p-NPY.	41
FIGURE # 7:	Effet du p-NPY sur l'activité spontanée et/ou sur le tonus de base des préparations isolées de segments ascendant, transverse et descendant de côlon de rat.	45
FIGURE # 8:	Effet du PYY sur l'activité spontanée et/ou sur le tonus de base des préparations isolées de segments ascendant, transverse et descendant de côlon de rat.	46
FIGURE # 9:	Courbes doses-réponses consécutives	

	induites par l'addition de p-NPY, de h-NPY et de PYY sur des préparations isolées de côlon descendant de rat.	48
FIGURE # 10:	Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de p-NPY, de 5-HT, de carbamylcholine et de PGE ₂ sur des préparations isolées de côlon descendant de rat.	50
FIGURE # 11:	Effets du p-NPY et du PYY sur des préparations isolées de côlon descendant de rat en absence et en présence d'atropine 10 ⁻⁶ M.	53
FIGURE # 12:	Courbes doses-réponses cumulatives induites par l'addition de p-NPY et des fragments p-NPY (2-36), (5-36) et (25-36) sur des préparations isolées de bronches principales de cobaye.	56
FIGURE # 13:	Courbes doses-réponses cumulatives induites par l'addition de p-NPY (1-36) et du fragment p-NPY (13-36) sur des	

	préparations isolées de bronches principales de cobaye.	58
FIGURE # 14:	Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de p-NPY et des fragments p-NPY (2-36), (5-36), (13-36) et (18-36) sur des préparations isolées de côlon descendant de rat.	59
FIGURE # 15:	Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de h-NPY (1-36) et du fragment h-NPY (13-36) sur des préparations isolées de côlon descendant de rat.	61
FIGURE # 16:	Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de h-NPY et de divers analogues (substitutions de Tyr ²⁰) sur des préparations isolées de côlon descendant de rat.	63
FIGURE # 17:	Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de h-NPY et de divers analogues (substitutions de Tyr ²¹) sur des préparations isolées de côlon	

	descendant de rat.	68
FIGURE # 18:	Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de h-NPY et ses analogues sur les préparations isolées de côlon descendant de rat.	73
FIGURE # 19:	Modèle hypothétique de la conformation tridimensionnelle du NPY	98

LISTE DES TABLEAUX

- TABLEAU # 1: Séquences d'acides aminés du polypeptide pancréatique humain (h-PP), du peptide YY humain (h-PYY), du neuropeptide Y humain (h-NPY), du neuropeptide Y porcin (p-NPY) et du neuropeptide Y de mouton (m-NPY). 4
- TABLEAU # 2: Liste des fragments et analogues des NPY porcin et humain. 27
- TABLEAU # 3: Contractions maximales (mg) et valeurs des EC_{50} (nM) du p-NPY, du carbamylcholine, de la substance P et de la 5-hydroxytryptamine (5-HT) sur des préparations isolées de trachée de cobaye. 34
- TABLEAU # 4: Relaxations maximales (g) et valeurs des EC_{50} (nM) de la norépinéphrine (NE) et du peptide vasoactif intestinal (VIP) sur la trachée de cobaye en absence et en présence de 30 nM de p-NPY. 39
- TABLEAU # 5: Contractions maximales (g) et valeurs des

	EC ₅₀ (nM) de la 5-hydroxytryptamine (5-HT), de la substance P, du carbamylcholine et de l'histamine sur la trachée de cobaye en absence et en présence de 30 nM de p-NPY.	44
TABLEAU # 6:	Contractions maximales (g) et valeurs des EC ₅₀ (nM) des NPY porcine et humaine, du PYY, du carbamylcholine, de la 5-hydroxy- tryptamine (5-HT) et de la prostaglandine E ₂ (PGE ₂) sur le côlon descendant de rat.	51
TABLEAU # 7:	Activité biologique relative, activité intrinsèque et puissance relative du p-NPY, du h-NPY et de leurs fragments respectifs sur les bronches principales de cobaye et sur le côlon descendant de rat.	55
TABLEAU # 8:	Activité biologique relative, activité intrinsèque et puissance relative du h-NPY et de ses analogues en position 20 et 21 sur les bronches principales de cobaye et sur le côlon descendant de rat.	65
TABLEAU # 9:	Activité biologique relative, activité	

intrinsèque et puissance relative du h-NPY et de ses analogues sur les bronches principales de cobaye et sur le côlon descendant de rat.	74
--	----

ABREVIATIONS

p-NPY	Neuropeptide Y porcin
h-NPY	Neuropeptide Y humain
r-NPY	Neuropeptide Y de rat
PP	Polypeptide pancréatique
PYY	Peptide YY
SS	Somatostatine
NE	Norépinéphrine
VIP	Peptide vasoactif intestinal
5-HT	5-hydroxytryptamine
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
SP	Substance P
TTX	Térodotoxine
Ca ⁺⁺	Calcium
K ⁺	Potassium
Na ⁺	Sodium
KCl	Chlorure de potassium
AMPc	Adénine monophosphate cyclique

EFFETS DU NEUROPEPTIDE Y (NPY) SUR LES VOIES AERIENNES DE COBAYE ET SUR LE GROS INTESTIN DE RAT: ETUDE DE STRUCTURE-ACTIVITE.

par

MAJDA TAOUDI BENCHEKROUN

Mémoire présenté au département de Pharmacologie en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.) Faculté de médecine. Université de Sherbrooke

RESUME

Le neuropeptide Y (NPY) et le peptide YY (PYY) sont des molécules de 36 acides aminés de la famille des polypeptides pancréatiques. Le PYY est exclusivement localisé dans les cellules endocrines de la muqueuse du tractus digestif alors que le NPY est impliqué dans la neurotransmission sympathique. Dans le poumon, le NPY est colocalisé avec la norépinéphrine (NE) dans une population de fibres nerveuses associées aux voies aériennes. Au niveau du tractus digestif, il se retrouve dans les éléments neuronaux impliquant à la fois les fibres sympathiques extrinsèques et les neurones intrinsèques. L'existence de deux sous-classes de récepteurs pour le NPY fût proposé. Ils se distinguent d'abord par leur localisation (post- Y_1 et pré-jonctionnel- Y_2) et par leur habileté à reconnaître (Y_2) ou non (Y_1) le fragment 13-36 du NPY. Afin de déterminer les rôles possibles de ce peptide sur les voies aériennes et sur le tractus digestif, nous avons étudié son effet sur diverses préparations isolées. Nos résultats ont démontré que le NPY induit une contraction dépendante de la dose sur la trachée, les bronches et les bandelettes de parenchyme pulmonaire de cobaye. La comparaison des valeurs des EC_{50} pour le carbamylcholine, l'histamine, la substance P, la 5-HT et le NPY a révélé que ce dernier était l'agent contractile le plus puissant. L'activation de la cyclooxygénase a été nécessaire pour observer une bronchoconstriction. De plus, nous avons démontré que le NPY exerçait un effet inhibiteur sur la trachée de cobaye. Il a induit une inhibition d'environ 40% des réponses maximales induites par la NE, le peptide vasoactif intestinal, la 5-HT et la substance P. Cependant, le NPY n'exerce aucun effet inhibiteur sur les réponses induites par l'histamine et le carbamylcholine. Sur les préparations isolées du tractus digestif de rat, le NPY et le PYY ont exercé d'une façon dépendante de la dose une augmentation de l'activité spontanée au niveau proximal, et une puissante contraction accompagnée d'une augmentation de l'activité spontanée au niveau du côlon distal. Les valeurs des EC_{50} obtenues ont indiqué que le NPY ($8.6 \times 10^{-8} M$) et le PYY ($4.4 \times 10^{-8} M$) sont les plus puissants agents contractiles identifiés jusqu'à ce jour. Des études pharmacologiques ont révélé que l'effet contractile de NPY semble être médié via la libération d'acétylcholine tandis que celui du PYY semble impliquer la libération d'une substance non adrénergique et non cholinergique dont la nature reste à déterminer. L'étude de structure activité a démontré que la portion C-terminale est importante pour l'activité du peptide alors que la partie N-terminale serait possiblement responsable pour l'affinité de la molécule. Le fragment NPY (13-36) s'est avéré plus efficace que le NPY sur les deux préparations isolées (bronches de cobaye et côlon descendant de rat). Le mécanisme d'action de ce fragment s'est révélé différent de celui du NPY sur les voies aériennes de cobaye alors que sur le côlon descendant de rat, il semble identique. D'après la classification de Wahlestedt, sur le muscle longitudinal du côlon de rat, le NPY activerait le récepteur Y_2 alors que sur le muscle lisse des voies aériennes, les résultats ne nous permettent pas de conclure au sujet des sous types de récepteurs activés.

INTRODUCTION

1. GENERALITES SUR LE NEUROPEPTIDE Y (NPY)

1.1 Découverte, isolation et structure:

Le NPY est un peptide de 36 acides aminés, initialement isolé à partir d'un extrait de cerveau de porc par Tatemoto (Tatemoto, 1982). Ce peptide présente une forte homologie de structure avec le polypeptide pancréatique (PP) (50%) et avec le peptide YY (PYY) (69% d'homologie) (Tatemoto et Mutt, 1980), ce qui a fait rassembler ces trois nouveaux peptides au sein d'une même famille. Tatemoto et Mutt ont isolé le NPY et le PYY en se basant sur une homologie structurale que semblaient posséder certains peptides régulateurs présents au sein du tractus gastro-intestinal, i.e la présence d'une fonction amide sur l'acide aminé en position C-terminale. Le NPY et le PYY possèdent tous deux un résidu tyrosine aux extrémités N- et C-terminales de leurs molécules.

Le NPY a été isolé depuis chez trois autres espèces animales: le rat, le mouton et l'homme. Chez ce dernier, la séquence complète du NPY (h-NPY) fut déterminée à partir d'extraits tumoraux d'un phéochromocytome (Minth et coll., 1984) (Figure # 1). Chez le rat et le mouton, le NPY fut isolé, comme chez le porc, à partir d'extraits de cerveau (Larhammar et coll., 1987, Sillard et coll., 1989). Le h-NPY et le r-NPY présentent une séquence d'acides aminés identiques, mais cette dernière diffère de celle du p-NPY par un acide aminé. La méthionine que l'on retrouve en position 17 chez le h- et le r-NPY est remplacée par une leucine chez le p-NPY. Chez le mouton, la glutamine que l'on retrouve à la position 10 est

Neuropeptide Y

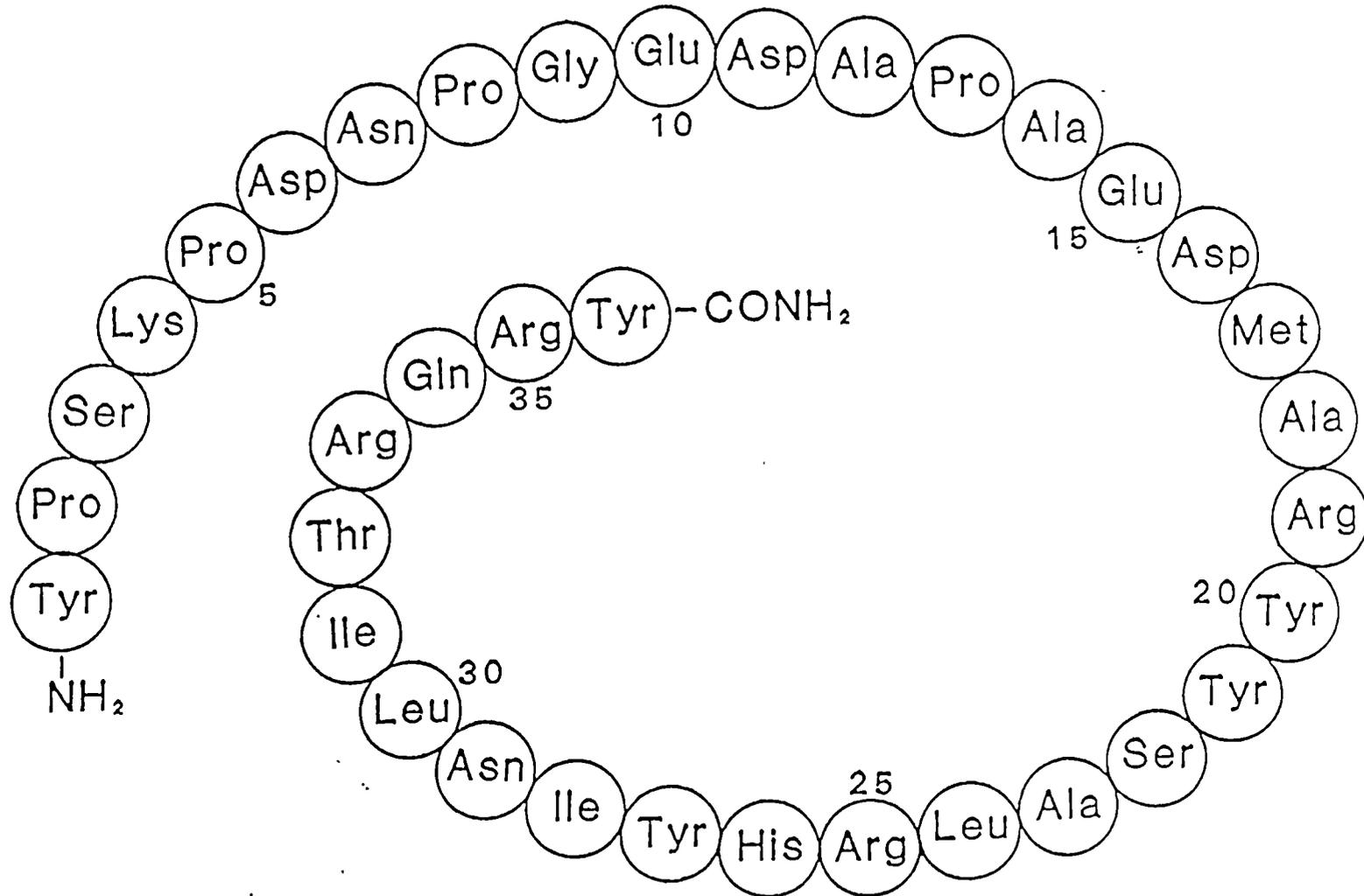


FIGURE # 1: Structure primaire du Neuropeptide Y (NPY) humain.

remplacée par un aspartate et la méthionine en position 17 est aussi remplacée par une leucine. Les séquences complètes en acides aminés des molécules de PP, PYY et des divers NPY sont présentées dans le tableau # 1.

Le PP et le PYY sont deux peptides qui ont été localisés dans des cellules de type endocrine respectivement au niveau du pancréas et du système gastro-intestinal (Lin et Chance, 1974; Lundberg et coll., 1982d). Chez l'homme et chez la plupart des mammifères, le PP a été mis en évidence à la fois au niveau du pancréas exocrine et endocrine. Les cellules contenant du PP ont été retrouvées à la périphérie des îlots de Langerhans, mais aussi au niveau du parenchyme pancréatique et dans l'épithélium des conduits excrétoires (Larsson et coll., 1975, 1976).

Le PYY fut localisé exclusivement dans les cellules endocrines présentes dans la muqueuse du tractus digestif. Chez l'homme des essais radioimmunologiques (RIA) ont révélé que les concentrations de PYY sont minimales au niveau de l'intestin grêle (iléon = 68 ± 6 pmol/g) alors que des concentrations maximales ont été retrouvées au niveau des muqueuses du côlon distal (82 pmol/g au niveau du côlon ascendant, 196 pmol/g au niveau du côlon sigmoïde) et du rectum (480 pmol/g) (Adrian et coll., 1985a). Chez d'autres espèces animales, comme pour le chien, de fortes concentrations de PYY ont été retrouvées dans l'iléon (1610 ± 123 ng/g) et le côlon (1607 ± 194 ng/g) (Taylor, 1985).

Par opposition au PP et au PYY, le NPY est un neuropeptide. Il a été mis en évidence dans des fibres nerveuses tant au niveau du système nerveux central que périphérique (Lundberg et coll., 1982b).

TABLEAU # 1

Séquences d'acides aminés du polypeptide pancréatique humain (h-PP), du peptide YY humain (h-PYY), du neuropeptide Y humain (h-NPY), du neuropeptide Y porcin (p-NPY) et du neuropeptide Y de mouton (m-NPY).

					5					10
h-PP	Ala	Pro	Leu	Glu	Pro	Val	Tyr	Pro	Gly	Asp
h-PYY	Tyr	Pro	Ile	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Gly	Glu
h-NPY	Tyr	Pro	Ser	Lys	Pro	Asp	Asn	Pro	Gly	<i>Glu</i>
p-NPY	Tyr	Pro	Ser	Lys	Pro	Asp	Asn	Pro	Gly	<i>Glu</i>
m-NPY	Tyr	Pro	Ser	Lys	Pro	Asp	Asn	Pro	Gly	<i>Asp</i>
					15					20
h-PP	Asn	Ala	Thr	Pro	Glu	Gln	Met	Ala	Gln	Tyr
h-PYY	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Asn	Arg	Tyr
h-NPY	Asp	Ala	Pro	Ala	Glu	Asp	<i>Met</i>	Ala	Arg	Tyr
p-NPY	Asp	Ala	Pro	Ala	Glu	Asp	<i>Leu</i>	Ala	Arg	Tyr
m-NPY	Asp	Ala	Pro	Ala	Glu	Asp	<i>Leu</i>	Ala	Arg	Tyr
					25					30
h-PP	Ala	Ala	Asp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Ile	Asn	Met
h-PYY	Tyr	Ala	Ser	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Leu
h-NPY	Tyr	Ser	Ala	Leu	Arg	His	Tyr	Ile	Asn	Leu
p-NPY	Tyr	Ser	Ala	Leu	Arg	His	Tyr	Ile	Asn	Leu
m-NPY	Tyr	Ser	Ala	Leu	Arg	His	Tyr	Ile	Asn	Leu
					35					
h-PP	Leu	Thr	Arg	Pro	Arg	Tyr	NH ₂			
h-PYY	Val	Thr	Arg	Gln	Arg	Tyr	NH ₂			
h-NPY	Ile	Thr	Arg	Gln	Arg	Tyr	NH ₂			
p-NPY	Ile	Thr	Arg	Gln	Arg	Tyr	NH ₂			
m-NPY	Ile	Thr	Arg	Gln	Arg	Tyr	NH ₂			

2. LOCALISATION ET DISTRIBUTION:

2.1 Système nerveux central:

Au niveau du cerveau, les résultats des études immunohistochimiques ont révélé que les fibres nerveuses contenant du NPY sont particulièrement concentrées dans les structures limbiques soit le cortex, l'hippocampe et le thalamus (Allen et Bloom, 1986; Maccarone et Jarrott, 1986; Gray et Morley, 1986b; McDonald, 1988; O'Donohue et coll., 1985). Ces observations ont été appuyées par des études d'essais radioimmunologiques (RIA) dans lesquelles il a été rapporté que de fortes concentrations de NPY sont retrouvées dans les régions limbiques et hypothalamiques, ainsi que dans le ganglion basal tant au niveau du noyau caudé que du putamen et aussi au niveau du cortex (Polak et Bloom, 1984). Des études comparatives ont révélé que les concentrations de NPY sont supérieures à celles de la somatostatine (SS) et de la cholécystokinine, en particulier au niveau de l'hypothalamus, du putamen et du noyau caudé, ce qui en ferait actuellement le peptide régulateur le plus abondant au niveau du système nerveux central (Adrian et coll., 1983; Gray et Morley, 1986a).

A l'aide de la technique d'immunocoloration double, il a été démontré que le NPY était présent dans des neurones catécholaminergiques dans certaines régions spécifiques du cerveau, tels que le locus caeruleus et la medulla oblongata (Hokfelt et coll., 1983; Allen et coll., 1983). Ce sont là les premières démonstrations révélant la co-localisation du NPY avec la norépinéphrine (NE) au niveau du système nerveux central. En plus d'être co-localisé avec la NE, le NPY a aussi été retrouvé dans des fibres contenant le peptide vasoactif intestinal (VIP) et la choline

acétyltransférase et ce, plus spécifiquement au niveau des ganglions parasympathiques crâniens (Leblanc et coll., 1987). Enfin, par le biais d'études immunohistochimiques, il a été montré qu'une injection intra-cérébro-ventriculaire de 6-hydroxydopamine induit une vidange du contenu en NE au niveau de l'hypothalamus mais n'affecte en rien l'innervation au NPY. Ces résultats indiquent que, dans cette région du cerveau, les fibres nerveuses contenant du NPY originent en grande partie de neurones intrinsèques (lesquels ne synthétisent que du NPY) plutôt que des neurones médullaires dans lesquels la NE et le NPY coexistent (Gustafson et Moore, 1987).

Plusieurs travaux ont démontré que le NPY et la SS sont fortement associés, en terme de distribution, dans certaines régions du cerveau dont le cortex, l'hippocampe et le noyau basal chez le rat (Chronwall et coll., 1984; Beal et coll., 1986; Hendrey et coll., 1984), chez le singe (Hendrey et coll., 1984; Beal et coll., 1987) et chez l'homme (Chan-Palay, 1987). Il a été rapporté que le taux d'immunoréactivité à la SS est diminué dans certaines régions cérébrales chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Beal et Martin, 1986). Des études similaires réalisées avec le NPY ont révélé que les concentrations de ce dernier étaient elles aussi diminuées dans certaines régions du cortex chez les patients atteints de cette maladie; suggérant ainsi une implication potentielle du NPY dans l'étiologie sinon le processus évolutif de la maladie d'Alzheimer.

Au niveau de la moelle épinière, des fibres nerveuses immunoréactives au NPY ont été retrouvées tant au niveau de la corne dorsale que ventrale. Un sectionnement du nerf sciatique, une rhizothomie dorsale, un sectionnement de la moelle épinière ou un traitement des animaux à la capsaïcine n'ont pas affecté la

distribution des fibres nerveuses immunoréactives au NPY (Polak et Bloom, 1984). Ces observations indiquent que les fibres nerveuses qui contiennent du NPY ne sont pas de nature sensorielle mais au contraire de nature motrice.

2.2 Système nerveux périphérique:

En périphérie, les fibres nerveuses immunoréactives au NPY ont été retrouvées dans la majorité des organes étudiés incluant les systèmes cardiovasculaire, gastro-intestinal et respiratoire. Cette observation se rapporte tant à l'homme (Lundberg et coll., 1983) que le cobaye, le rat, le chat et le porc (Lundberg et coll., 1983, 1985a; Uddman et coll., 1985 et Edvinsson et coll., 1983, 1984a). Dans tous ces systèmes, les fibres contenant du NPY présentent une forte association avec les vaisseaux sanguins et plus particulièrement avec les artères.

Au niveau du coeur, l'innervation présentant une immunoréactivité qui s'apparente au NPY est particulièrement dense au niveau des oreillettes et beaucoup plus faible dans les ventricules (Lundberg et coll., 1982b; Gu et coll., 1983, 1984; Uddman et coll., 1985). De plus, elle est très abondante au niveau des artères coronaires et du système de conduction cardiaque (Polak et Bloom, 1984). Les résultats des essais radioimmunologiques effectués à partir d'extraits de tissu cardiaque humain ont montré que les plus fortes concentrations de NPY se retrouvent au niveau des vaisseaux coronariens (20 ± 4 pmol/g) et du noeud auriculo-ventriculaire (22 ± 2 pmol/g). Les plus faibles concentrations se retrouvent au niveau des oreillettes droite et gauche, du noeud sino-auriculaire (15 ± 3 pmol/g) et des ventricules droit et gauche (10 ± 2 pmol/g) (Polak et Bloom, 1984). Lorsque comparé à la concentration de substance P (SP) que l'on retrouve au niveau

du coeur de cobaye, le NPY semble être le neuropeptide le plus abondant découvert jusqu'à maintenant au niveau du coeur chez plusieurs espèces de mammifères y compris l'homme (Polak et Bloom, 1984).

Le système respiratoire de diverses espèces de mammifères incluant le cobaye, le chat (Lundberg et coll., 1983; Sheppard et coll., 1984, Uddman et coll., 1984), le rat (Uddman et coll., 1984, Sheppard et coll., 1984), le porc (Lundberg et coll., 1983), la souris (Uddman et coll., 1984), le singe (Lundberg et coll., 1983; Ghatei et coll., 1987) et l'homme (Lundberg et coll., 1983; Sheppard et coll., 1984) est aussi très riche en fibres nerveuses contenant du NPY. Ces dernières ont été retrouvées en association avec les vaisseaux pulmonaires (artères et veines) et dans l'adventice du tractus trachéobronchial chez ces cinq espèces. Des fibres immunoréactives au NPY ont aussi été retrouvées au niveau des muscles lisses des voies aériennes, de la trachée jusqu'aux bronchioles; où la densité de ces fibres est plus faible. Par exemple, chez le chat, les plus fortes concentrations ont été retrouvées dans l'artère pulmonaire (95 pmol/g) et les bronches principales (21 pmol/g) (Lundberg et coll., 1983). Chez le singe, à l'exception des bronches, les concentrations de NPY ont été retrouvées inférieures à 1 pmol/g de tissus (Ghatei et coll., 1987). La variation dans les concentrations pulmonaires du NPY entre les espèces animales s'est aussi reflétée par une distribution non uniforme du neuropeptide entre ces mêmes espèces. Chez le chat, ces fibres nerveuses sont associées à la fois aux muscles lisses vasculaires et non vasculaires et ce, à partir de la trachée jusqu'au poumon profond. De plus, elles ont été démontrées dans les ganglions intramuraux de la trachée et des bronches (Lundberg et coll., 1983) suggérant ainsi une interaction possible avec l'innervation cholinergique. Chez le

cobaye, ce sont les vaisseaux sanguins, particulièrement les artères, qui reçoivent le plus riche approvisionnement de fibres nerveuses utilisant le NPY comme neurotransmetteur (Uddman et coll., 1985). Ce dernier, par contre, est absent dans les ganglions intramuraux (Sheppard et coll., 1984). Enfin, chez le singe, le NPY est associé exclusivement à la vascularisation pulmonaire et aux glandes tubuleuses de la trachée (Ghatei et coll., 1987). Aucune particularité dans la distribution des fibres immunoréactives au NPY au niveau du poumon de porc, de rat et de l'homme n'a été rapportée. La distribution des fibres est telle que décrite précédemment. Tel que démontré dans les autres systèmes, la distribution des neurones contenant du NPY dans les poumons se rapproche intimement de l'innervation sympathique noradrénergique.

De point de vue du développement, les fibres nerveuses contenant du NPY apparaissent aux environs de la 20^{ième} semaine de gestation dans les poumons de fœtus humain. La population de ces fibres nerveuses augmente considérablement à la période néonatale. La période d'apparition et le patron de développement de ces voies nerveuses s'apparentent de beaucoup à ceux des fibres nerveuses sympathiques ce qui confirme l'association étroite du NPY au neurotransmetteur classique qu'est la NE (Sheppard et coll., 1984; Polak et Bloom, 1984).

La distribution abondante des fibres nerveuses immunoréactives au NPY au niveau du système respiratoire des mammifères, son association particulière avec la musculature lisse vasculaire et non vasculaire laissent suggérer que le NPY est probablement impliqué dans le contrôle sinon la régulation de diverses fonctions pulmonaires.

Au niveau du système gastro-intestinal, les fibres nerveuses immunoréactives au NPY ont été retrouvées tout au long du tube digestif: de l'oesophage jusqu'au côlon distal. Chez les rongeurs (Furness et coll., 1983) et l'homme (Lundberg et coll., 1983), ces fibres positives ont été localisées dans la muqueuse, mais surtout dans la sous-muqueuse, les couches musculaires (circulaire et longitudinale) et les plexi nerveux sous-muqueux (Meissner). Dans la sous-muqueuse, la plupart des fibres qui contiennent du NPY sont présentes autour des vaisseaux sanguins. Les plexi sous-muqueux de l'intestin grêle contiennent une forte population de corps cellulaires immunoréactifs au NPY, cependant la quantité de peptide est moins importante au niveau de ces mêmes plexi de Meissner présents dans l'estomac et le gros intestin. Ceci ne semble pas être le cas pour la population de corps cellulaires immunoréactifs au NPY retrouvés dans les plexi myentériques (Sundler et coll., 1983; Polak et Bloom, 1984). Il a été suggéré que les fibres nerveuses immunoréactives au NPY retrouvées en association avec la musculature lisse du tractus gastro-intestinal seraient d'origine intrinsèque alors que les fibres nerveuses périvasculaires seraient d'origine extrinsèque. Ces observations sont basées sur le fait qu'une sympathectomie abdominale cause une disparition des fibres nerveuses périvasculaires immunoréactives au NPY et non des autres (Sundler et coll., 1983; Polak et Bloom, 1984). Cette vaste distribution des fibres contenant du NPY dans le système gastro-intestinal suggère une multitude de fonctions, incluant un rôle dans la régulation de l'activité neuronale intramurale, dans le tonus du muscle lisse et du flux sanguin local.

3. CARACTERISTIQUES DES FIBRES NERVEUSES PERIPHERIQUES CONTENANT LE NPY.

Tel qu'il a été démontré au niveau du système nerveux central, il a été suggéré que dans les fibres nerveuses périphériques le NPY serait dans une forte proportion aussi co-localisé avec la NE. Cette hypothèse découle d'une série d'observations concernant l'origine, la caractérisation et le devenir des fibres nerveuses contenant le NPY suivant divers traitements chirurgicaux et/ou pharmacologiques. Par exemple: 1) une sympathectomie chirurgicale résulte en une perte de fibres nerveuses périvasculaires immunoréactives au NPY et à la NE (Sundler et coll., 1983; Grunditz et coll., 1984; Uddman et coll., 1985), 2) les enzymes impliqués dans la formation de la NE soit la tyrosine hydroxylase et la dopamine β -hydroxylase (la TH et la DBH) coexistent avec le NPY dans certains corps cellulaires des ganglions sympathiques tels le ganglion cervical supérieur, le stellaire et le coeliaque ainsi que dans les fibres nerveuses originant de ces ganglions (Lundberg et coll., 1982b, 1983; Uddman et coll., 1984), 3) un traitement à l'aide de la neurotoxine 6-OHDA induit une déplétion de l'immunoréactivité à la NE et au NPY au niveau des fibres nerveuses périvasculaires (Lundberg et coll., 1982b; Furness et coll., 1983; Ekblad et coll., 1984a; Uddman et coll., 1985) et que 4) le NPY est libéré après une stimulation des nerfs sympathiques (Allen et coll., 1984a). Ces observations indiquent qu'une sous-population de neurones immunoréactifs au NPY serait de nature sympathique. A cet effet, des évidences ont été fournies à savoir que le NPY est synthétisé dans les corps cellulaires de ces fibres sympathiques, emmagasiné dans des vésicules et ensuite acheminé par un

mécanisme de transport axonal vers les terminaisons nerveuses (Fried et coll 1985a, b). Des études réalisées à l'aide de la microscopie électronique ont de plus révélé que chez la rate du chat et le canal déférent du rat, le NPY et la NE sont tous deux emmagasinés dans des vésicules denses au niveau des terminaisons nerveuses. Un entreposage séparé des deux molécules ne peut par contre être exclu. Il a été démontré (dans le canal déférent de rat) qu'un traitement à la réserpine induit une diminution du contenu en NE sans altérer celui du NPY (Lundberg et coll., 1985a, Fried et coll., 1985a). Enfin, des études de fractionnement cellulaire ont montré que la même terminaison nerveuse contient de petites vésicules qui entreposent séparément la NE et le NPY (Fried et coll., 1985a, b; De Quidt et coll., 1985). Ceci suggère donc que, selon les tissus ou les voies nerveuses, l'emmagasinage de la NE et du NPY peut se présenter sous diverses combinaisons.

En plus d'être souvent co-localisé avec la NE dans les fibres nerveuses sympathiques, le NPY a aussi été associé avec l'acétylcholine et ce plus particulièrement au niveau des ganglions sous-muqueux dans l'intestin de cobaye (Furness et coll., 1984). Enfin chez le rat, la souris et le porc le NPY a aussi été retrouvé en co-localisation avec le peptide intestinal vasoactif (VIP) et le peptide histidyl-isoleucine (PHI) dans les cellules périvasculaires non adrénérgiques. Il est à noter que les fibres périvasculaires adrénérgiques qui contiennent du NPY au niveau du tractus gastro-intestinal ne semblent pas contenir de VIP ni de PHI (Ekblad et coll., 1984c).

4. SITES RECEPTEURS:

4.1 Système nerveux central:

L'existence de sites récepteurs spécifiques au NPY a d'abord été démontrée chez le rat par le biais d'études de liaisons réalisées sur des préparations membranaires obtenues de différentes régions du cerveau (Saria et coll., 1984). Ces sites de liaison furent retrouvés au niveau du cortex cérébral, de l'hypothalamus, du striatum et de l'hippocampe (Unden et coll., 1984; Martel et coll., 1987). Des observations similaires ont été rapportées avec des préparations membranaires originant du cerveau de cobaye, de hamster et de l'homme (Martel et coll., 1987). Les études autoradiographiques ont confirmé l'existence d'une forte densité de sites de liaisons au NPY présents dans le bulbe olfactif, le septum, dans quelques noyaux thalamiques et dans l'aire postrema du noyau médian et du tractus solitari (Martel et coll., 1986; Nakajima et coll., 1986).

4.2 Système nerveux périphérique:

En périphérie, les études de liaisons sur des préparations de membranes ont révélé la présence de sites récepteurs spécifiques et de haute affinité au NPY sur des vaisseaux sanguins provenant de la rate de cochon (Lundberg et coll., 1988) ainsi que sur les muscles lisses de l'artère pulmonaire de lapin (Reynolds et Yokota, 1988). La présence de récepteurs au NPY a aussi été démontrée sur des lignées cellulaires de phéochromocytomes de rat (Reynolds et Yokota, 1988; Schwartz et coll., 1987) et sur les cellules épithéliales de l'intestin grêle de rat (Laburthe et coll., 1986). Enfin, les études autoradiographiques ont révélé la présence de sites de

liaisons au niveau du tubule proximal et des muscles lisses vasculaires des reins de lapin (Leys et coll., 1987).

4.3 Sous-classes de récepteurs pour le NPY.

En 1987, Wahlestedt et coll. ont suggéré l'existence de deux sous classes de récepteurs pour le NPY, soit Y_1 et Y_2 . Cette classification a été suggérée suite à l'observation que le fragment 13-36 du NPY était actif sur certaines préparations vasculaires (l'artère fémorale de rat) mais non sur d'autres (la veine iléaque de cobaye). Ainsi, les récepteurs Y_1 seraient post-jonctionnels et reconnaîtraient uniquement la molécule entière du peptide. Les récepteurs Y_2 seraient pré-jonctionnels et reconnaîtraient en plus de la molécule entière, le fragment 13-36 du NPY (Wahlestedt et coll., 1986; 1987).

5. ACTIVITES PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES:

L'abondance des réseaux nerveux immunoréactifs au NPY, la présence de récepteurs qui lui sont propres et la démonstration que ce peptide est effectivement libéré des terminaisons nerveuses suivant diverses stimulations, suggèrent que le NPY serait impliqué dans une multitude de fonctions tant au niveau du système nerveux central que périphérique (Allen et coll., 1985; Danger et coll., 1987; Drumheller et coll., 1988; Rioux et coll., 1986; Wahlestedt et coll., 1986).

5.1 Système nerveux central:

Parmi les différents effets centraux attribués au NPY, il a été rapporté entre autres qu'une injection intracérébrale de NPY provoque une hypotension, une bradycardie et un ralentissement de la respiration (Fuxe et coll., 1983; Harfstrand, 1986). Egalement, une injection intra-cérébro-ventriculaire ou une administration de NPY dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus résulte en une augmentation de l'ingestion de nourriture (Stanley et Leibowitz, 1985; Parrott et coll., 1986) et une diminution du taux plasmatique de LH-RH (McDonald et coll., 1985).

5.2 Système nerveux périphérique:

Au niveau périphérique, les principaux effets pharmacologiques rapportés pour le NPY dérivent majoritairement de travaux effectués sur le système cardiovasculaire. In vivo, une injection intraveineuse de NPY induit une hypertension systémique, caractérisée par une longue durée d'action (Lundberg et coll., 1982b). Une administration de NPY dans un coeur perfusé induit à la fois des effets chronotrope et inotrope positifs. Ces actions du NPY sont résistantes aux antagonistes des récepteurs α - et β -adrénergiques mais sont inhibées par la nifédipine, ce qui laisse entrevoir une implication potentielle du Ca^{++} dans les effets médiés par le peptide (Lundberg et coll., 1982b, 1984b; Corder et coll., 1986; Dahlof et coll., 1985a; Mabe et coll., 1985; Petty et coll., 1984). De plus, Rioux et coll. (1986) ont démontré qu'une infusion de NPY dans un coeur perfusé induit une augmentation de la fréquence cardiaque, de la pression myocardique et une diminution de la tension myocardique. Ces données suggèrent une forte implication du NPY dans la régulation de l'activité des muscles cardiaques lorsque administré in

vivo.

In vitro, trois actions principales ont été rapportées lorsque le NPY est mis en présence de différentes préparations isolées de muscle lisse vasculaire: 1) un effet post-jonctionnel direct, 2) un effet post-jonctionnel indirect et 3) un effet pré-jonctionnel indirect.

1) Effet post-jonctionnel direct du NPY:

Le NPY est avant tout reconnu comme un puissant agent vasoconstricteur (Lundberg et Tatemoto, 1982; Ekblad et coll., 1984a,b; Edvinsson et coll., 1985). Sur des préparations vasculaires isolées, cet effet est dépendant de la concentration et est caractérisé par une lente entrée en action et une durée d'action prolongée. Cependant, l'amplitude de la contraction induite par le NPY varie d'une préparation vasculaire à une autre. Par exemple, la contraction induite par le NPY n'atteint que $37 \pm 8\%$ et $11 \pm 4\%$ de la réponse induite par la NE respectivement sur l'artère rénale et la veine mésentérique de l'homme (Pernow, 1988). Cependant, sur les vaisseaux cérébraux et sur certains vaisseaux périphériques (artère du muscle lisse squelettique de l'homme) le NPY induit une contraction maximale dont l'amplitude est équivalente à celle induite par la NE (Edvinsson et coll., 1983, 1984a,b, 1985; Ekblad et coll., 1984a; Wahlestedt et coll., 1985). Sur les préparations sensibles au NPY (vaisseaux cérébraux), l'action vasoconstrictrice du peptide est abolie par les inhibiteurs des canaux calciques comme la nifédipine (Wahlestedt et coll., 1986).

2) Effet post-jonctionnel indirect du NPY:

Certains vaisseaux sanguins dont l'artère gastro-épiploïque de lapin répondent par une contraction lorsque stimulée électriquement. Cette réponse n'est pas bloquée par le guanéthidine et le prazosin (antagonistes α_1 - et α_2 - adrénergiques). Sur ces préparations, des concentrations de NPY plus faibles que celles requises pour induire un effet post-jonctionnel direct, augmentent les réponses induites par la stimulation électrique (Edvinsson et coll., 1983, 1984a,b; Ekblad et coll., 1984a; Glover, 1985; Dahlof et coll., 1985b; Lundberg et coll., 1985b; Wahlestedt et coll., 1985, Wahlestedt et Hakanson, 1986; Jansen et coll., 1986; Hanko et coll., 1986; Neild, 1987). Par exemple, sur l'artère gastro-épiploïque de lapin, le NPY induit un déplacement vers la droite de la courbe dose réponse induite par la NE ou par des stimulations électriques sans changer la réponse maximale (Edvinsson et coll., 1984b; Ekblad et coll., 1984a; Wahlestedt et coll., 1985). Cet effet potentiateur du NPY a aussi été noté envers d'autres agents vasoconstricteurs dont l'histamine et la prostaglandine $F_{2\alpha}$ (Edvinsson et coll., 1984b). Cet effet potentiateur du NPY n'est pas bloqué par les antagonistes du Ca^{++} .

3) Effet pré-jonctionnel indirect du NPY:

Cette dernière action du NPY fut étudiée plus particulièrement sur la partie prostatique du canal déférent de rat. Une stimulation électrique sur cette préparation induit une réponse contractile rapide causée par la libération de NE à partir des terminaisons nerveuses sympathiques (Lundberg et coll., 1984b, Lundberg et Starne, 1984). Sur cette préparation, le NPY inhibe la réponse contractile induite par une stimulation électrique mais n'affecte pas l'effet d'une administration exogène de NE

(Allen et coll., 1982; Ohhashi et Jacobowitz, 1983; Wahlestedt et coll., 1985). Des résultats similaires suggérant que le NPY inhibe la libération de la NE furent aussi obtenus en utilisant des préparations d'artère fémorale de rat (Lundberg et coll., 1985b). Cet effet modulateur pré-jonctionnel du NPY a été confirmé en utilisant de la NE tritiée ($[^3\text{H}]\text{NE}$). L'ensemble de ces travaux a permis de démontrer que sur certaines préparations non-vasculaires (canal déférent de rat) et vasculaires (l'artère fémorale de rat), des récepteurs pour le NPY sont présents sur les terminaisons nerveuses sympathiques (Ohhashi et Jacobowitz, 1983).

Depuis la découverte de substances vasoactives telles que le facteur relaxant dérivant de l'endothélium par Furchgott et Zawadzki (1980) ou le facteur contractant dérivant de l'endothélium par Luscher et VanHoutte (1986), deux groupes de chercheurs se sont intéressés à vérifier si l'effet du NPY, sur les vaisseaux sanguins, était relié à l'endothélium. Daly et Hieble (1987) ont démontré que l'effet potentiateur induit par le NPY sur l'artère de l'oreille de lapin stimulée électriquement est dépendant de l'endothélium. De leur côté, Pernow et Lundberg (1988) ont observé que les réponses directes induites par le NPY sur les artères du muscle glutéus maximus et splénique de porc, n'étaient pas reliées à la présence de l'endothélium. C'est donc dire que cet effet endothélium dépendant du NPY peut aussi varier d'une préparation tissulaire à l'autre tout comme l'effet potentiateur du peptide.

D'autres effets périphériques induits par le NPY furent rapportés. Par exemple, une perfusion au NPY, du rein isolé de rat, induit une augmentation de la pression et réduit le flux sanguin rénal. Ces effets sont accompagnés d'une baisse du taux de filtration glomérulaire et d'une augmentation de la natriurèse. Le fait que

le NPY soit vasoconstricteur et natriurétique au niveau du système rénovasculaire suggère que ce peptide est impliqué dans le contrôle des fonctions rénales (Allen et coll., 1985a).

Lorsque administré in vitro, ce peptide induit une augmentation des réponses contractiles induites par la NE sur des préparations tissulaires provenant du muscle dilatateur de l'iris de lapin (Piccone et coll., 1988). L'interprétation physiologique de ces effets est encore inconnue.

Au niveau du tractus urogénital, le NPY inhibe les contractions induites par des stimulations électriques sur le canal déférent de rat par une inhibition de la libération de la NE (Allen et coll., 1982; Ohhashi et Jacobowitz, 1983). De plus, ce peptide induit une diminution des réponses contractiles non adrénérique et non cholinergique, après une stimulation nerveuse sur la vessie de cobaye (Lundberg et coll., 1984a).

Aucune étude n'a été entreprise pour vérifier si le NPY peut induire une action directe sur les muscles lisses des voies aériennes ou encore si le peptide peut y exercer un effet potentiateur tel que démontré au niveau de certains vaisseaux sanguins. Cependant, il a été rapporté que le NPY induit une inhibition de la composante cholinergique suivant une stimulation électrique sur la trachée de cobaye (Stretton et Barnes, 1988).

Pour ce qui est du système gastro-intestinal, Wahlestedt et Hakanson (1986) ont rapporté que le NPY n'induisait aucun effet moteur direct sur des préparations isolées de taenia coli de cobaye. Par contre, les travaux de Hellstrom ont montré que chez le chat, une administration intra-artérielle de NPY cause une inhibition de la motilité du côlon ainsi qu'une vasoconstriction de longue durée (Hellstrom et

coll., 1985). D'autres données ont révélé que le NPY était capable de stimuler l'absorption des ions chlore au niveau de la muqueuse iléale de lapin (Hubel et Renquist, 1985). Cependant, le mécanisme par lequel le NPY exerce ses actions est inconnu de même que la localisation de ses récepteurs.

6. BUTS DE L'ETUDE:

Les objectifs du présent projet de recherche sont:

- 1) Déterminer si le NPY peut exercer un effet myotrope direct ou un effet potentiateur et/ou inhibiteur au niveau des muscles lisses des voies aériennes des mammifères et élucider les mécanismes d'actions s'il y a lieu.
- 2) Déterminer les rôles possibles du NPY et du PYY sur le tonus de base du muscle lisse longitudinal du côlon des mammifères et élucider les mécanismes d'actions s'il y a lieu.
- 3) A l'aide de fragments de synthèse du NPY, déterminer sur nos préparations biologiques laquelle des portions de la molécule de NPY est responsable de l'activité biologique du peptide.
- 4) Caractériser les récepteurs responsables des activités du NPY sur les deux systèmes biologiques en utilisant tout comme Wahlestedt et coll. (1986) la molécule entière de NPY et de PYY et le fragment 13-36.

MATERIEL ET METHODES

1. ANIMAUX

Les préparations tissulaires faisant l'objet de notre étude, provenaient principalement de deux espèces animales: des cobayes Hartley albinos, sans égard de sexe, dont le poids variait entre 200 et 300 g et des rats Sprague Dawley mâles de 225 à 250 g. Ces animaux ont été obtenus de la ferme d'élevage Charles River de St-Constant, Québec.

Certains tissus humains, obtenus de la salle d'autopsie du C.H.U.S et ceci suivant l'approbation du Comité d'éthique médicale de la faculté, ont aussi été utilisés.

Les cobayes pré-anesthésiés au pentobarbital de sodium (40 mg/kg, ip), ont été sacrifiés par dislocation cervicale et exsanguinés par le sectionnement de la veine cave inférieure. Les rats ont été exsanguinés par le sectionnement de la veine cave inférieure après une injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (50 mg/kg).

2. PRELEVEMENT DES TISSUS:

Six préparations principales ont été sélectionnées dont trois provenant du tractus respiratoire (trachée, bronches principales et bandelettes de parenchyme pulmonaire) et trois du système gastro-intestinal (côlon ascendant, transverse et

descendant).

Suivant leur prélèvement tous les tissus furent immédiatement immergés dans une solution physiologique identique à celle qui a été utilisée durant l'expérience.

Les tissus provenant du système respiratoire ont été baignés dans une solution de Krebs (pH = 7.4) dont la composition en mM était comme suit: NaCl 118.1; KCl 4.7; MgSO₄ 7H₂O 1.2; KH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2.5; glucose 11.1.

La solution physiologique utilisée pour les principaux tissus provenant du tractus gastro-intestinal fut le Tyrode (pH = 7.2) dont la composition en mM fut comme suit: NaCl 136.8; KCl 2.6; MgSO₄ 7H₂O 1.5; NaH₂PO₄ 0.47; NaHCO₃ 11.9; CaCl₂ 1.8; glucose 5.5.

3. PREPARATION DES TISSUS:

3.1. Tractus respiratoire de cobaye et de rat

Les préparations tissulaires provenant du cobaye et du rat ont été préparées de façon similaire. La trachée et les bronches principales ont été taillées en spirale selon les méthodes respectives de Constantine (Constantine, 1965) et de Patterson et Arbor (1958). Des bandelettes de parenchyme pulmonaire ont été préparées selon la méthode de Lulich (Lulich et coll., 1976), à partir des lobes inférieurs droit et/ou gauche des poumons.

3.2. Tractus gastro-intestinal de rat

Le côlon descendant a été prélevé du côlon sigmoïde à la courbure splénique; le côlon transverse, de la courbure splénique à la courbure hépatique et le côlon ascendant de la courbure hépatique au caecum. Les trois parties du côlon ont été nettoyées de leur contenu et dégraissées. Des segments de 1.0 cm de longueur pour chacune des trois parties du côlon ont été utilisés.

3.3. Autres tissus

Des bronches internes (diamètre de 1 à 2 mm) provenant de poumons humains furent préparées en spirale selon la méthode de Constantine (1965).

4. ESSAIS BIOLOGIQUES

Tous les essais biologiques ont été effectués dans des bains de 5 ml contenant une solution physiologique de Krebs ou de Tyrode. Ces dernières furent oxygénées à l'aide d'un mélange gazeux contenant 95% O₂ et 5% CO₂ et maintenues à température constante de 37°C.

Toutes les préparations tissulaires ont été reliées à un transducteur de force Grass (modèle FT 03C), sous une tension initiale de 1 g. Une période de stabilisation d'une heure leur a été ensuite allouée. La réponse des tissus suite à l'addition de peptide et/ou d'agoniste a été enregistrée isométriquement. Dans ce système, les signaux sont d'abord transformés en impulsion électrique par les

transducteurs, amplifiés et ensuite inscrits sur un enregistreur polygraphe de marque Grass (modèle 7D).

5. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

5.1. Méthodologie générale

Avant de débiter les expériences, la réactivité des tissus a été évaluée à l'aide de drogues (agonistes) de contrôle. Dans les cas où nous avons à travailler avec des agonistes relaxants, les tissus ont été précontractés à l'aide d'un Krebs enrichi en potassium (pH = 7.2) dont la composition en mM fut comme suit: NaCl 4.7; KCl 124.7; MgSO₄ 7H₂O 1.2; KH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2.5; glucose 11.1.

5.2. Méthodologie spécifique

5.2.1. Effet direct du p-NPY et du PYY

Dans un premier temps, nous avons déterminé si le NPY pouvait induire un effet direct (contraction ou relaxation) sur différentes préparations. D'une façon générale, pour les tissus présentant une faible ou une absence d'activité spontanée (telle que les voies aériennes), nous avons effectué des courbes doses-réponses cumulatives. Ces dernières ont été réalisées en augmentant progressivement la concentration d'agonistes dans les bains, jusqu'à l'obtention d'une réponse maximale. Pour les tissus présentant une forte activité spontanée (ex: le côlon), des

doses croissantes d'agonistes ont été appliquées de façon consécutive. Dans ce cas, un intervalle minimal de 15 minutes fut accordé après chaque application de l'agoniste afin d'éviter toute désensibilisation du tissu. Les peptides ont été maintenus en contact avec les préparations tissulaires pendant une période nécessaire au développement d'une réponse complète. Enfin, sur les préparations provenant du tractus gastro-intestinal l'effet du NPY fut comparé à celui du PYY.

5.2.2. Effet modulateur du NPY

Chez les tissus présentant une réponse de faible amplitude au NPY, nous avons évalué si ce peptide pouvait altérer (potentier ou inhiber) l'action d'agonistes classiques relaxants et/ou contractiles. Plus spécifiquement, des courbes doses-réponses cumulatives à l'aide d'agonistes tels la NE, le VIP, la SP, l'histamine, le carbamylcholine, et la 5-hydroxytryptamine (5-HT) ont été effectuées, en présence de 30 nM de NPY. Des expériences contrôles ont été réalisées en parallèle où seule la solution de véhicule (Krebs ou Tyrode) a été ajoutée. Lors de l'utilisation des substances relaxantes, les tissus ont été préalablement contractés à l'aide de la solution de Krebs enrichie en potassium. Pour toutes ces expériences, le NPY (30 nM) a été ajoutée 5 minutes avant le début de la stimulation avec les agonistes. Ce protocole expérimental (dose, temps de prétraitement) a été choisi sur la base des résultats obtenus lors d'expériences similaires réalisées par différents groupes de chercheurs sur des préparations isolées de vaisseaux sanguins (Edvinsson et coll., 1984b; Han et Abel, 1987; Ekblad et coll., 1984a).

5.2.3. Mécanisme d'action du NPY, du fragment NPY(13-36) et du PYY.

Dans le but de déterminer le mécanisme par lequel le NPY, certains fragments ou encore le PYY pouvait exercer leurs actions, des stimulations uniques avec ces peptides ont été répétées en absence ou en présence de divers antagonistes pharmacologiques classiques. Les préparations tissulaires ayant servi à cette étude ont été la trachée de cobaye et les trois parties de côlon de rat. Les inhibiteurs utilisés ont été l'indométacine (bloqueur de la cyclooxygénase), l'atropine (bloqueur des récepteurs cholinergiques muscariniques), le diphenhydramine (bloqueur des récepteurs histaminergiques H_1), le méthysergide (bloqueur des récepteurs sérotonergiques), le tétródotoxine (bloqueur non spécifique de la transmission nerveuse), le propranolol et le phentolamine (bloqueurs respectifs des récepteurs α et β adrénergiques).

5.2.4. Etude de structure activité

Dans le but de déterminer les acides aminés responsables de l'activité biologique du NPY, nous avons évalué l'activité biologique d'une série de fragments en N- et C-terminal et analogues de la molécule de NPY. Pour ce faire, nous nous sommes servi du même protocole que celui utilisé pour évaluer l'effet direct du NPY. Les préparations qui ont servis pour cette étude ont été les bronches principales de cobaye et le côlon descendant de rat. Les différents fragments et analogues testés, sont présentés dans le tableau # 2.

TABLEAU # 2

Liste des fragments et analogues des NPY porcine et humaine .

FRAGMENTS	ANALOGUES
p-NPY(2-36)	(Cha ²⁰) h-NPY
p-NPY(5-36)	(D-Trp ²⁰) h-NPY
p-NPY(11-36)	(D-Tyr ²⁰) h-NPY
p-NPY(13-36)	(Phe ²⁰) h-NPY
p-NPY(16-36)	(Trp ²⁰) h-NPY
p-NPY(18-38)	(Tyr-O-Me ²⁰) h-NPY
p-NPY(25-36)	
h-NPY(1-24)NH ₂	(Cha ²¹) h-NPY
h-NPY(13-36)	(D-Trp ²¹) h-NPY
	(D-Tyr ²¹) h-NPY
	(Phe ²¹) h-NPY
	(Trp ²¹) h-NPY
	(Tyr-O-Me ²¹) h-NPY
	[Leu ^{20,21}] h-NPY
	(Tyr ¹ -ψ-CH ₂ NH-Pro ³) h-NPY
	[Asp ² ,Lys ³¹] h-NPY
	cyclo ^{2,31} [Asp ² ,Lys ³¹] h-NPY

6. SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES

Les composés suivants ont été utilisés: le chlorure de carbamylcholine (le carbachol), la norépinéphrine (l'hydrochlorure (-) artérenol), la prostaglandine E₂ (PGE₂), le dihydrochlorure d'histamine, la 5-hydroxytryptamine (le complexe créatinine sulfate), le sulfate d'atropine, l'hydrochlorure de diphenhydramine, le propranolol (l'hydrochlorure D,L-propranolol), la tétradotoxine et l'indométacine; tous ces composés ont été obtenus de Sigma Chemical Co., St- Louis, U.S.A. Les NPY porcine et humaine (p-NPY et h-NPY), les fragments, les analogues, la SP, le peptide intestinal vasoactif (VIP) et le peptide YY (PYY) ont tous été synthétisés par les Dr S. St Pierre et A. Fournier de l'INRS - Santé à Montréal.

Tous les composés ont été fraîchement dilués dans la même solution physiologique que celle utilisée durant l'expérience (Krebs ou Tyrode) à l'exception des peptides. Ces derniers, sous forme lyophilisés, ont été dissous dans l'eau bidistillée contenant 0.1% d'albumine sérique bovine à une concentration initiale de 1 mg/ml et conservées à -20°C. Les dilutions subséquentes requises pour l'étude, ont été préparées dans le Krebs ou le Tyrode immédiatement avant le début des expériences. L'indométacine a d'abord été dissoute dans un volume minimal d'éthanol puis ensuite diluée dans le Krebs ou le Tyrode de façon à obtenir la concentration désirée. Enfin la solution stock de NE fut préparée dans de l'eau bidistillée contenant 1% d'acide ascorbique.

7. PARAMETRES PHARMACOLOGIQUES

Les courbes doses-réponses cumulatives ou consécutives effectuées à l'aide d'agonistes stimulants ou relaxants ont permis de déterminer les trois paramètres suivant: l'affinité apparente, l'activité intrinsèque et la puissance relative.

L'affinité apparente fut exprimée sous forme de EC_{50} ; le EC_{50} étant la concentration molaire d'agoniste nécessaire pour produire 50% de la réponse maximale (Ariens et coll., 1957).

L'activité intrinsèque (α^E) est une mesure de la capacité que possède un agoniste à stimuler les récepteurs. L' α^E d'un agoniste de référence est fixé à 1.0. L'effet maximal est atteint lorsque l'application de concentration croissante et subséquente de l'agoniste ne provoque plus d'augmentation de la réponse tissulaire (Ariens, 1964 et Ariens et coll., 1964).

L'ordre de puissance des agonistes est évalué en comparant l'affinité apparente d'un agoniste de référence à l'affinité de l'agoniste à évaluer. Ce rapport exprimé en pourcentage de l'affinité de l'agoniste de référence est calculé ainsi:

$$\frac{[EC_{50} \text{ de l'agoniste de référence}]}{EC_{50} \text{ de l'agoniste à évaluer}} \times 100$$

8. STATISTIQUES

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes plus ou moins l'erreur standard sur la moyenne (S.E.M). Les statistiques ont été faites en utilisant le test "t" de Student. Nous considérons une différence significative lorsque $P \leq 0.05$.

RESULTATS

1. SYSTEME RESPIRATOIRE.

1.1 Effet du p-NPY sur les voies aériennes de cobaye, de rat et de l'homme.

Le tonus de base des voies aériennes de rat (trachée, bronches principales et bandelettes de parenchyme pulmonaire) et de l'homme (bronches internes), n'a pas été modifié (contraction ou relaxation) après l'addition de p-NPY. Cependant, le p-NPY a exercé un effet contractile et ce d'une façon dépendante de la dose sur la trachée, les bronches principales et les bandelettes de parenchyme pulmonaire du cobaye. Lorsque comparée à une contraction induite par l'histamine, la réponse du peptide s'est caractérisée par une entrée en action lente et une durée d'action prolongée (Figure # 2, a). Au niveau des bronches principales la concentration seuil de NPY nécessaire pour induire une réponse fût de l'ordre de 10^{-11} M et la contraction maximale fut obtenue à 10^{-6} M (figure # 2, b). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant les bandelettes de parenchyme pulmonaire. Cependant, au niveau de la trachée, la réponse maximale fut déjà atteinte à une concentration de 10^{-7} M du peptide (Figure # 3). Aucune différence significative n'a été enregistrée entre les réponses maximales et les valeurs des EC_{50} de deux courbes doses réponses répétées à 60 minutes d'intervalle, suggérant ainsi une absence de tachyphylaxie du tissu au NPY. Les tensions maximales obtenues ont été respectivement de 51 ± 17 (n=9); 46 ± 8 (n=11); 30 ± 7 (n=7) mg pour la trachée, les bronches principales et les bandelettes de parenchyme pulmonaire. Les

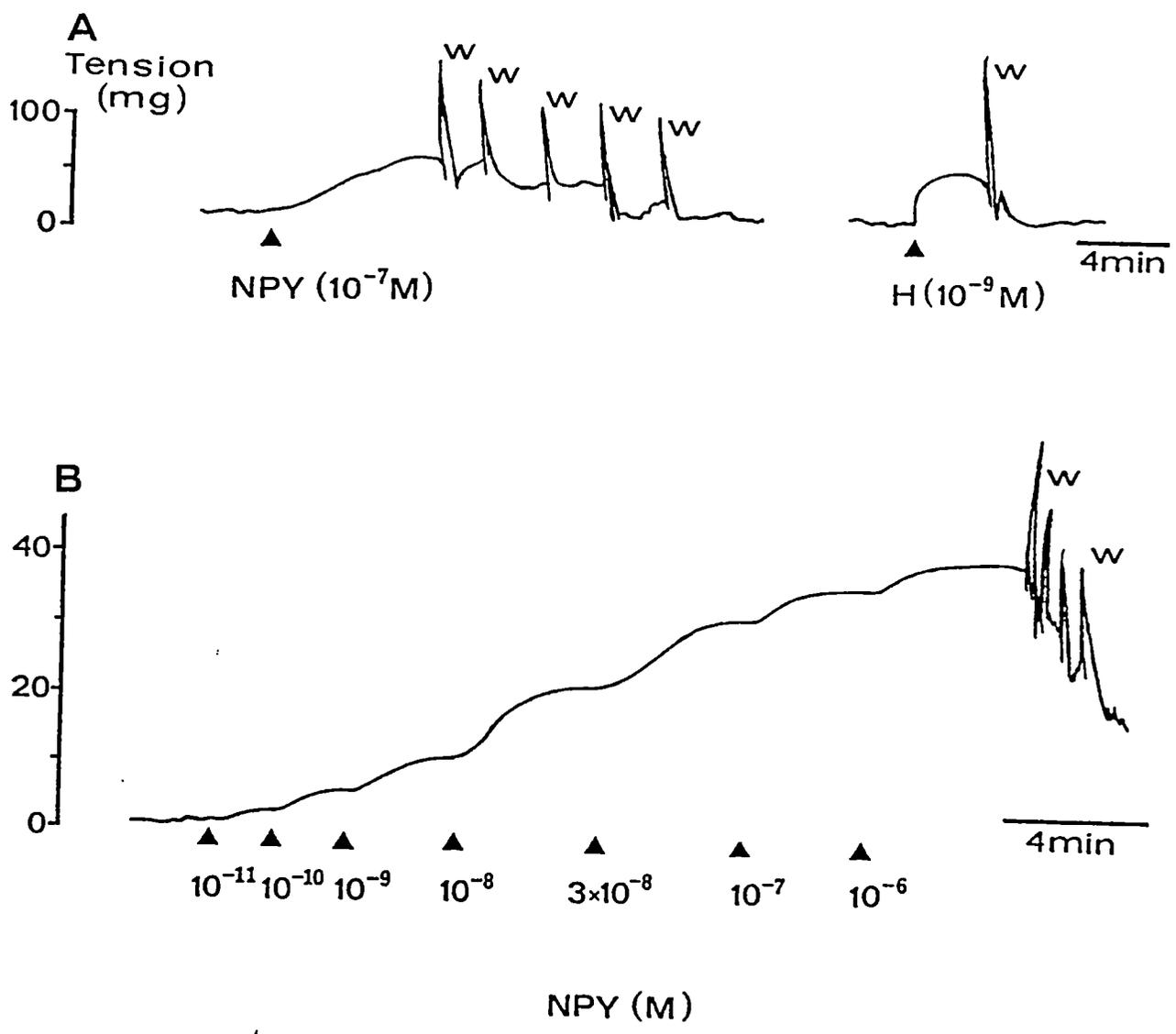


FIGURE # 2: Réponses contractiles induites par le p-*NPY* et l'histamine (H) sur les voies aériennes de cobaye. A: Effet d'une dose unique de chaque agoniste sur la trachée de cobaye. A noter que plusieurs lavages (W) sont nécessaires pour que le tissu cible reprenne son tonus de base suivant une stimulation avec le p-*NPY*. B: Enregistrement original d'une courbe dose-réponse cumulative induite par l'addition de p-*NPY* sur les bronches principales de cobaye. On peut remarquer que la lente entrée en action est une caractéristique qui se manifeste à chacune des concentrations ajoutées de p-*NPY*.

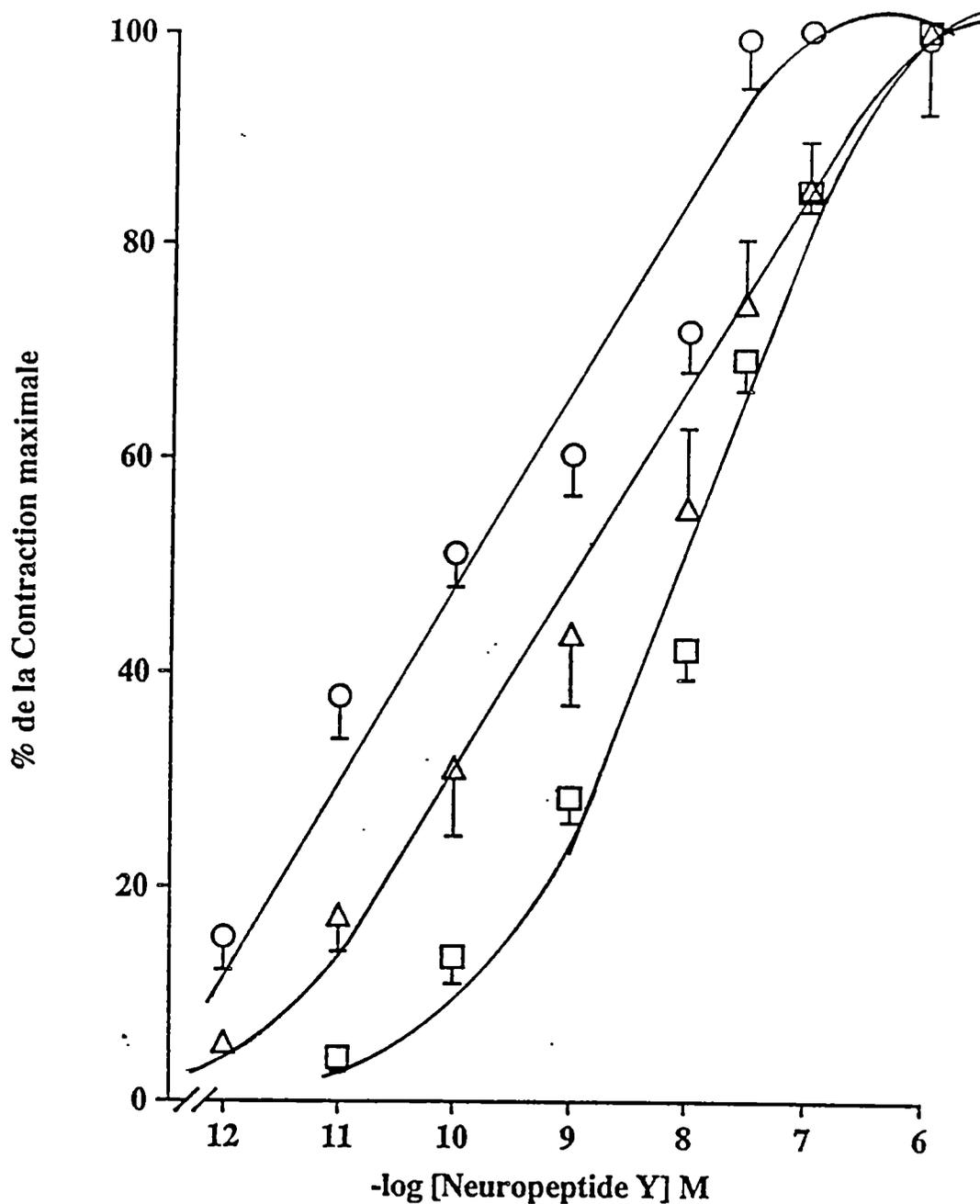


FIGURE # 3: Courbes doses-réponses cumulatives induites par l'addition de p-NPY sur des préparations isolées de trachées (○—○), de bronches principales (□—□) et de bandelettes de parenchyme pulmonaire (△—△) de cobaye. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 7 à 11 expériences. Les résultats ont été exprimés en fonction du pourcentage (%) de la contraction maximale.

valeurs des EC_{50} , calculées selon une analyse de régression linéaire, ont été de 0.1 nM pour la trachée, 6 nM pour les bronches principales et 1 nM pour les bandelettes de parenchyme pulmonaire.

Le PYY quant à lui n'induit aucune réponse biologique sur ces mêmes préparations tissulaires.

1.2 Puissance relative du p-NPY sur la trachée de cobaye.

Etant donné que le p-NPY induit une réponse maximale d'amplitude équivalente sur les trois préparations tissulaires provenant du système respiratoire de cobaye (voir plus haut) et que ce peptide a une plus grande affinité apparente sur la trachée que sur les bronches principales et le parenchyme pulmonaire, nous avons utilisé uniquement la trachée pour évaluer la puissance du p-NPY par rapport à d'autres agents bronchoconstricteurs.

L'histamine (10^{-8} à 10^{-4} M), le carbamylcholine (10^{-9} à 3×10^{-5} M), la SP (10^{-9} à 5×10^{-5} M) ou le 5-HT (10^{-9} à 10^{-5} M) ont tous induit sur cette préparation, une contraction dépendante de la dose. Les amplitudes maximales des réponses obtenues à l'aide de ces agonistes ont varié de 361 à 1310 mg (Tableau # 3). En comparaison, la réponse maximale obtenue avec le p-NPY fut de faible amplitude; le peptide n'ayant généré qu'une augmentation maximale de 51 mg de la tension. Lorsque exprimée en pourcentage, cette réponse du p-NPY s'est avéré équivalente à environ 20% de la réponse maximale induite par l'histamine, à 4% de celle causée par le carbachol, à 8% de la réponse à la SP et à 14% de la réponse à la 5-HT. Cependant sur la base des valeurs de EC_{50} obtenues pour chacun de ces composés,

TABLEAU # 3

Contractions maximales (mg) et valeurs des EC_{50} (nM) du p-NPY, du carbamylcholine, de la substance P et de la 5-hydroxytryptamine (5-HT) sur des préparations isolées de trachée de cobaye.

AGONISTES	CONTRACTION MAXIMALE (mg)	EC_{50} (nM)	(n)
p-NPY	51 ± 17	0.1 ± 0.77	(10)
Histamine	650 ± 90.3*	3625 ± 870	(8)
Carbamylcholine	1310 ± 150*	193 ± 17	(4)
Substance P	610 ± 5*	937 ± 114	(6)
5-HT	361 ± 26*	629 ± 172	(6)

Les valeurs des contractions maximales (mg) et des EC_{50} (nM) ont été exprimées en moyennes ± S.E.M. Le chiffre entre parenthèses représente le nombre d'expériences.

*: significativement différent de la contraction induite par p-NPY.

le p-NPY s'est avéré l'agent contractile le plus puissant. Tel que présenté dans le tableau # 3, l'ordre de puissance de ces agonistes sur la trachée de cobaye fut: p-NPY > carbamylcholine > 5-HT > SP > histamine.

1.3 Mécanisme d'action du p-NPY sur les voies aériennes de cobaye.

Les réponses induites par 10^{-6} M de p-NPY sur les trois préparations provenant du système respiratoire de cobaye n'ont pas été affectées par l'addition de tétrodotoxine (TTX) (10^{-6} M), d'atropine (10^{-5} M), de diphenhydramine (10^{-6} M) ou de méthysergide (10^{-5} M). Cependant un prétraitement des tissus à l'indométacine (10^{-6} M) a totalement inhibé la contraction induite par 10^{-6} M de p-NPY.

1.4 Effet inhibiteur du p-NPY sur la trachée de cobaye.

1.4.1 Norépinéphrine (NE)

L'activité contractile du p-NPY sur les voies aériennes de cobaye étant relativement de faible amplitude, nous avons émis l'hypothèse que ce peptide pourrait (comme il a été démontré au niveau des vaisseaux sanguins) interférer d'une façon quelconque avec le pouvoir relaxant ou contractile de diverses substances endogènes.

Le NPY étant avant tout co-localisé avec la NE, nous avons d'abord vérifié si ce peptide pouvait altérer les réponses des tissus à ce neurotransmetteur.

Des courbes doses-réponses cumulatives à la NE ont d'abord été effectuées tant sur le tonus de base de la trachée que sur des préparations précontractées à

l'aide d'un Krebs enrichi en potassium (K^+) (124 nM). Sur les deux types de préparations, l'addition de NE a induit une relaxation dépendante de la dose. Les amplitudes maximales des relaxations obtenues sur le tonus de base de la trachée et sur la même préparation précontractée au KCl furent respectivement de 0.6 ± 0.1 g et de 0.76 ± 0.07 g.

Les courbes doses-réponses induites par la NE en absence et en présence de NPY (30 nM) sur ces deux types de préparations sont présentées à la Figure # 4. Un prétraitement de 5 minutes avec une concentration de 30 nM de p-NPY a résulté en une diminution de 41% de la réponse maximale induite par la NE sur le tonus de base de la trachée et de 39.5% sur les tissus précontractés au KCl. Cependant, la présence de NPY n'a pas causé de déplacement significatif vers la droite des courbes doses-réponses à la NE sur les deux préparations. Les valeurs de EC_{50} calculées selon une analyse de régression linéaire tant en présence et qu'en absence de NPY sont présentées dans le tableau # 4.

1.4.2 Peptide vasoactif intestinal (VIP)

Des expériences similaires ont été réalisées en utilisant le VIP comme agent relaxant. Ce dernier exerce un effet inhibiteur et ce à des concentrations variant de 10^{-9} à 3×10^{-6} M sur les tissus précontractés au KCl. Telle qu'illustré sur la figure # 5, l'addition de 30 nM de p-NPY a résulté en une diminution significative de 42.8% de la réponse maximale obtenue à l'aide du VIP sur cette préparation. Cependant aucune différence significative n'a été observée entre les valeurs des EC_{50} obtenues en absence et en présence de p-NPY (Tableau # 4). Sur la préparation

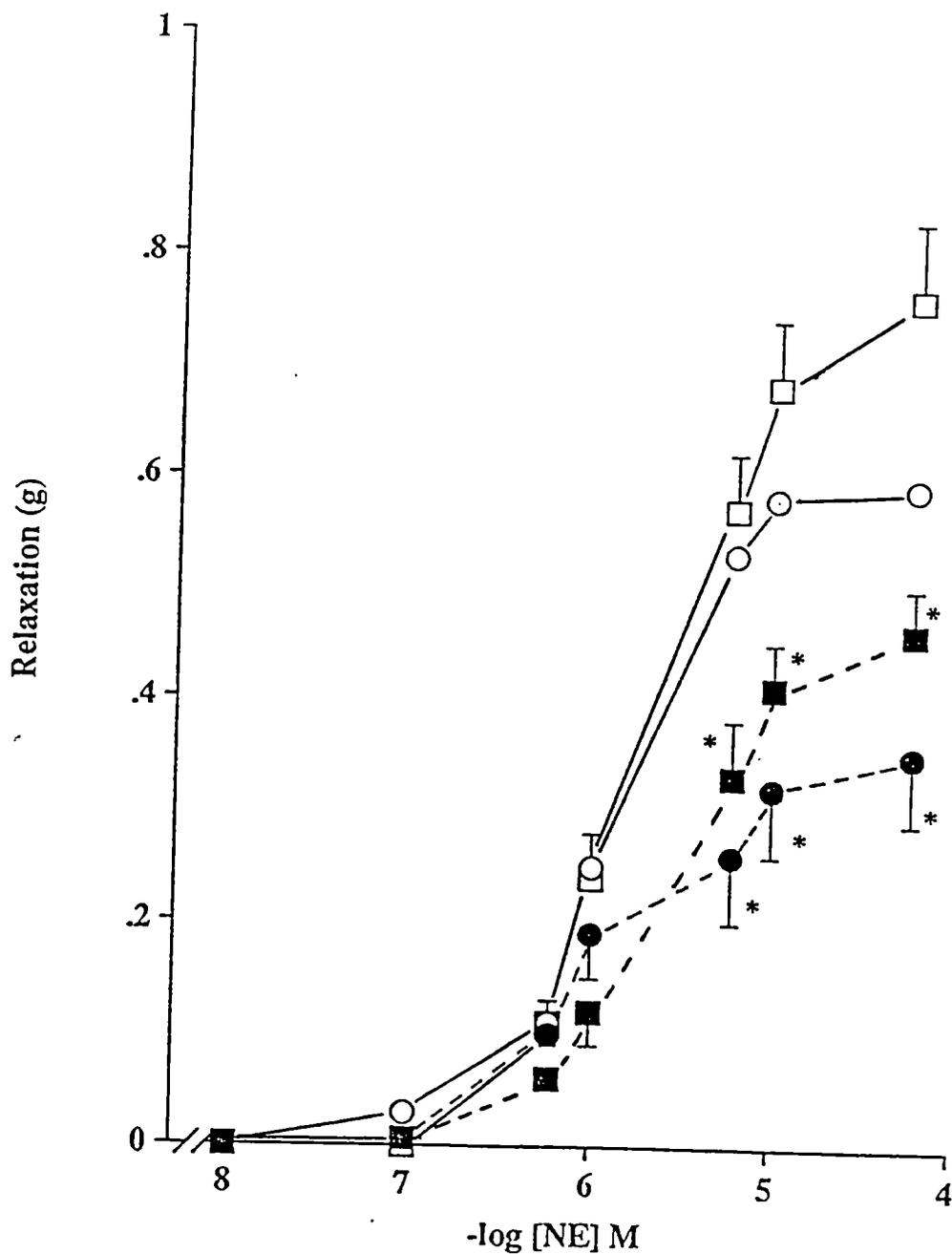


FIGURE # 4: Courbes doses-réponses cumulatives induites par la norépinéphrine (NE) sur des préparations isolées de trachée de cobaye en absence (symboles vides) et en présence (symboles pleins) de 30 nM de p-NPY. Les courbes ont été obtenues en absence (□) et en présence (○) de KCl. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 3 à 10 expériences. Les résultats ont été exprimés en gramme de relaxation.
*: significativement différent ($P < 0.05$) du contrôle (symboles vides).

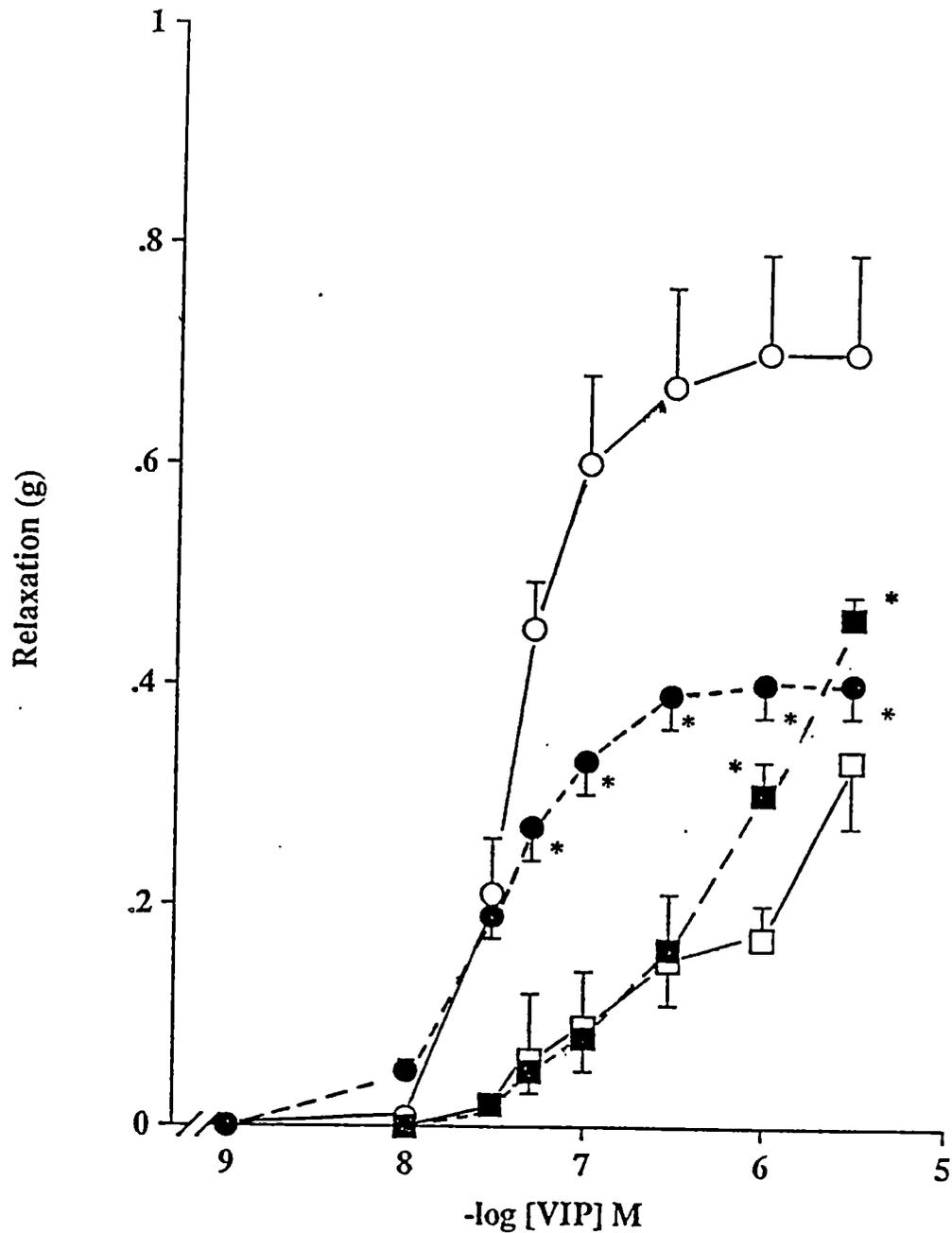


FIGURE # 5: Courbes doses-réponses cumulatives induites par le peptide vasoactif intestinal (VIP) sur des préparations isolées de trachée de cobaye en absence (symboles vides) et en présence (symboles pleins) de 30 nM de p-NPY. Les courbes ont été obtenues en absence (□) et en présence (○) de KCl. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues à partir de 4 expériences. Les résultats ont été exprimés en gramme de relaxation.
*: significativement différent ($P < 0.05$) du contrôle (symboles vides).

TABLEAU # 4

Relaxations maximales (g) et valeurs des EC_{50} (nM) de la norépinéphrine (NE) et du peptide vasoactif intestinal (VIP) sur la trachée de cobaye en absence et en présence de 30 nM de p-NPY.

Agonistes	REPONSE MAXIMALE (g)		EC_{50} (nM)	
	Témoin	p-NPY (30 nM)	Témoin	p-NPY (30 nM)
NE (K+)	0.76 ± 0.07	0.46 ± 0.04*	2030 ± 213	3050 ± 628
NE	0.59 ± 0.17	0.35 ± 0.06*	1033 ± 176	950 ± 150
VIP (K+)	0.7 ± 0.09	0.4 ± 0.03*	58.8 ± 10.5	33.8 ± 5.3
VIP	N.D	N.D	N.D	N.D

Les valeurs des relaxations maximales (g) et des EC_{50} (nM) ont été exprimées en moyennes ± S.E.M. Ces valeurs dérivent des données obtenues de 4 à 11 expériences.

*: significativement différent du contrôle ($P < 0.05$).

N.D: non déterminé

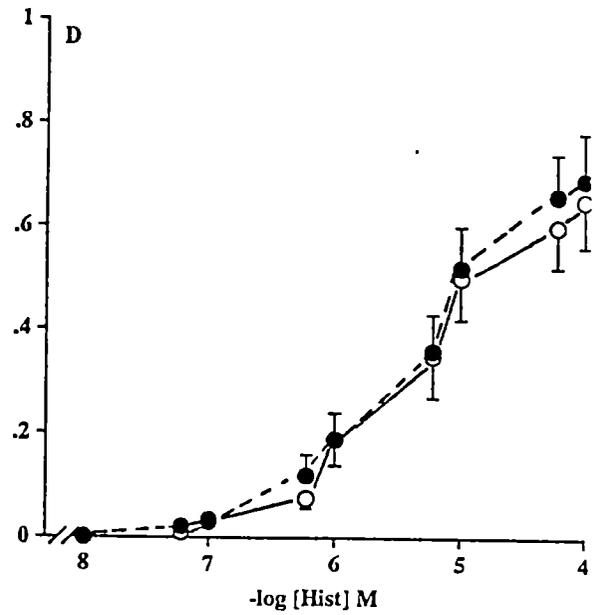
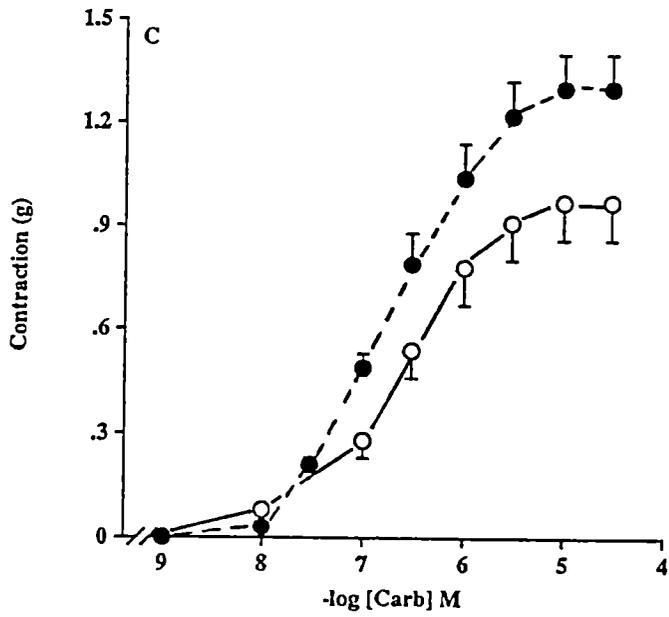
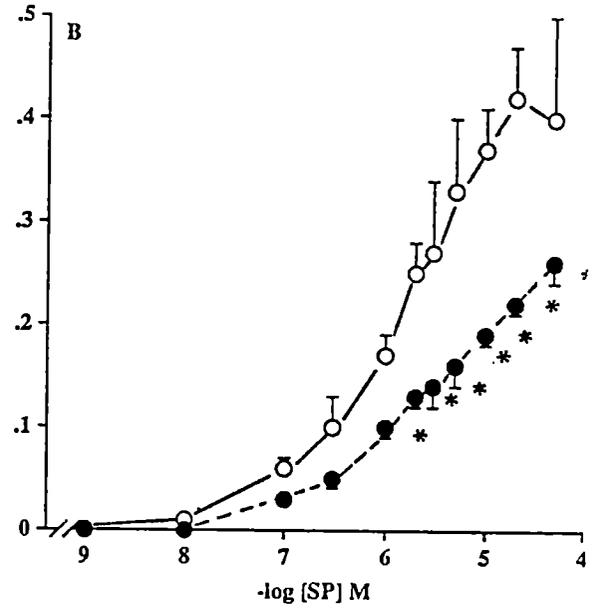
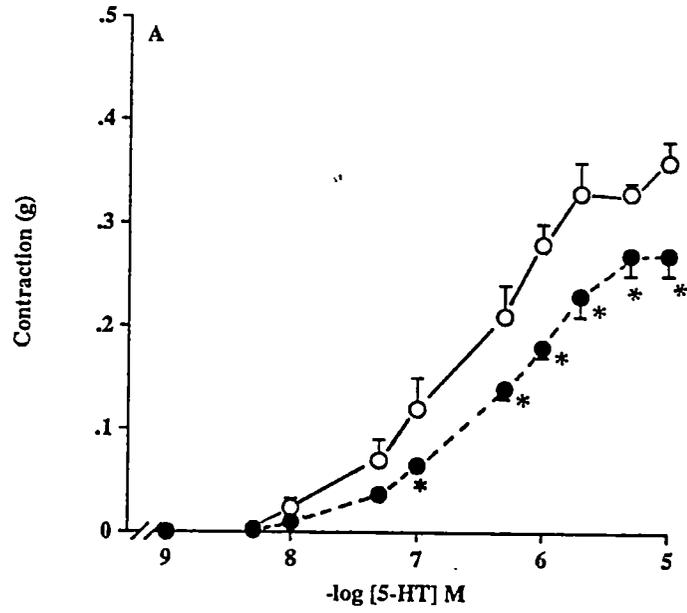
préalablement non contractée au K^+ , les concentrations de VIP utilisées ne nous ont pas permis de déterminer l'effet maximal ni la valeur du EC_{50} . Cependant nous avons observé qu'un prétraitement au p-NPY (30 nM) a causé une légère augmentation des réponses des tissus stimulés avec le VIP laquelle augmentation devient significative aux plus fortes concentrations utilisées (Figure # 5).

1.4.3 Agonistes contractiles

Le 5-HT (10^{-9} à 10^{-5} M), la SP (10^{-9} à 5×10^{-5} M), l'histamine (10^{-8} à 10^{-4} M) ou le carbamylcholine (10^{-9} à 10^{-5} M) induisent tous une contraction dépendante de la dose sur les préparations isolées de trachée de cobaye. Tel qu'illustré sur le panneau A de la figure # 6, un prétraitement au p-NPY (30 nM) a entraîné une baisse significative de 30% dans la réponse maximale induite par la 5-HT. Les réponses des tissus aux concentrations plus faibles de sérotonine (10^{-7} à 5×10^{-6} M) ont aussi été significativement diminuées en présence de p-NPY. Des résultats similaires ont été obtenus avec la SP. Nous avons observé une diminution de 38% dans la réponse maximale (10^{-4} M) ainsi qu'une diminution significative dans les réponses induites par les doses plus faibles du peptide (Figure # 6 B). Il est à noter que pour les mêmes concentrations de SP, la réponse maximale des tissus cibles n'a pas été atteinte en présence de p-NPY. Enfin, un prétraitement de la trachée au p-NPY (30 nM) a causé une faible potentiatio quoique non significative des réponses générées par le carbamylcholine (Figure # 6 C) et n'a exercé aucun effet inhibiteur sur les réponses induites par l'histamine (Figure # 6 D).

FIGURE # 6: Courbes doses-réponses cumulatives induites par le 5-hydroxytryptamine (5-HT) (A), la substance P (SP) (B), le carbamylcholine (Carb) (C) et l'histamine (H) (D) sur la trachée de cobaye en absence (○-○) et en présence de 30 nM de p-NPY (●-●). Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues à partir de 4 à 9 expériences. Les résultats ont été exprimés en gramme de contraction.

*: significativement différent ($P < 0.05$) du contrôle (symboles vides).



Pour chacun des agonistes, aucun déplacement significatif des courbes-doses réponses n'a été détecté suite au prétraitement avec le NPY (Tableau # 5).

2. SYSTEME GASTRO-INTESTINAL DE RAT.

2.1 Effet du NPY et du PYY sur le côlon de rat

Dans cette série d'expérience, nous avons comparé l'activité biologique du PYY à celle du NPY étant donné que ces deux peptides font partie de la même famille des polypeptides pancréatiques. Tel que mentionné plus haut, le PYY a été exclusivement localisé dans les cellules neuroendocrines de la muqueuse du tube digestif. Il a donc été intéressant d'étudier son effet sur les trois parties du côlon de rat.

Lorsque placés dans les bains à organes isolés, les segments ascendant, transverse et descendant de côlon de rat ont présenté une activité de base irrégulière. Celle-ci a consisté en une succession de contractions phasiques dont l'amplitude et la fréquence ont varié d'un segment de côlon à un autre et aussi d'un animal à l'autre. L'addition de p-NPY ou de PYY a résulté en une altération tant de l'activité spontanée que du tonus de base chez les trois segments isolés du côlon (figures # 7 et 8).

Sur le côlon ascendant, les deux peptides ont causé majoritairement une stimulation des contractions phasiques. Les augmentations de l'amplitude de même que de la fréquence de ces contractions nous sont apparues reliées à la concentration de PYY ou de p-NPY. Par contre, la durée d'action des deux peptides semblait indépendante de leur concentration. En augmentant fortement les doses des deux

TABLEAU # 5

Contractions maximales (g) et valeurs des EC_{50} (nM) de la 5-hydroxytryptamine (5-HT), de la substance P, du carbamylcholine et de l'histamine sur la trachée de cobaye en absence et en présence de 30 nM de p-NPY.

Agonistes	REPONSE MAXIMALE (g)		EC_{50} (nM)	
	Témoin	p-NPY (30 nM)	Témoin	p-NPY (30 nM)
5-HT	0.33 ± 0.03	0.27 ± 0.2*	629 ± 172	682 ± 107
Substance P	0.42 ± 0.05	ND	938 ± 114	ND
Carbachol	0.97 ± 0.1	1.3 ± 0.1	193 ± 17	185 ± 3.9
Histamine	0.65 ± 0.09	0.69 ± 0.09	3625 ± 870	4200 ± 878

Les valeurs des contractions maximales (g) et des EC_{50} (nM) ont été exprimées en moyennes ± S.E.M. Ces valeurs dérivent de données obtenues de 4 à 11 expériences.

*: significativement différent du contrôle ($P < 0.05$)

N.D: non déterminé

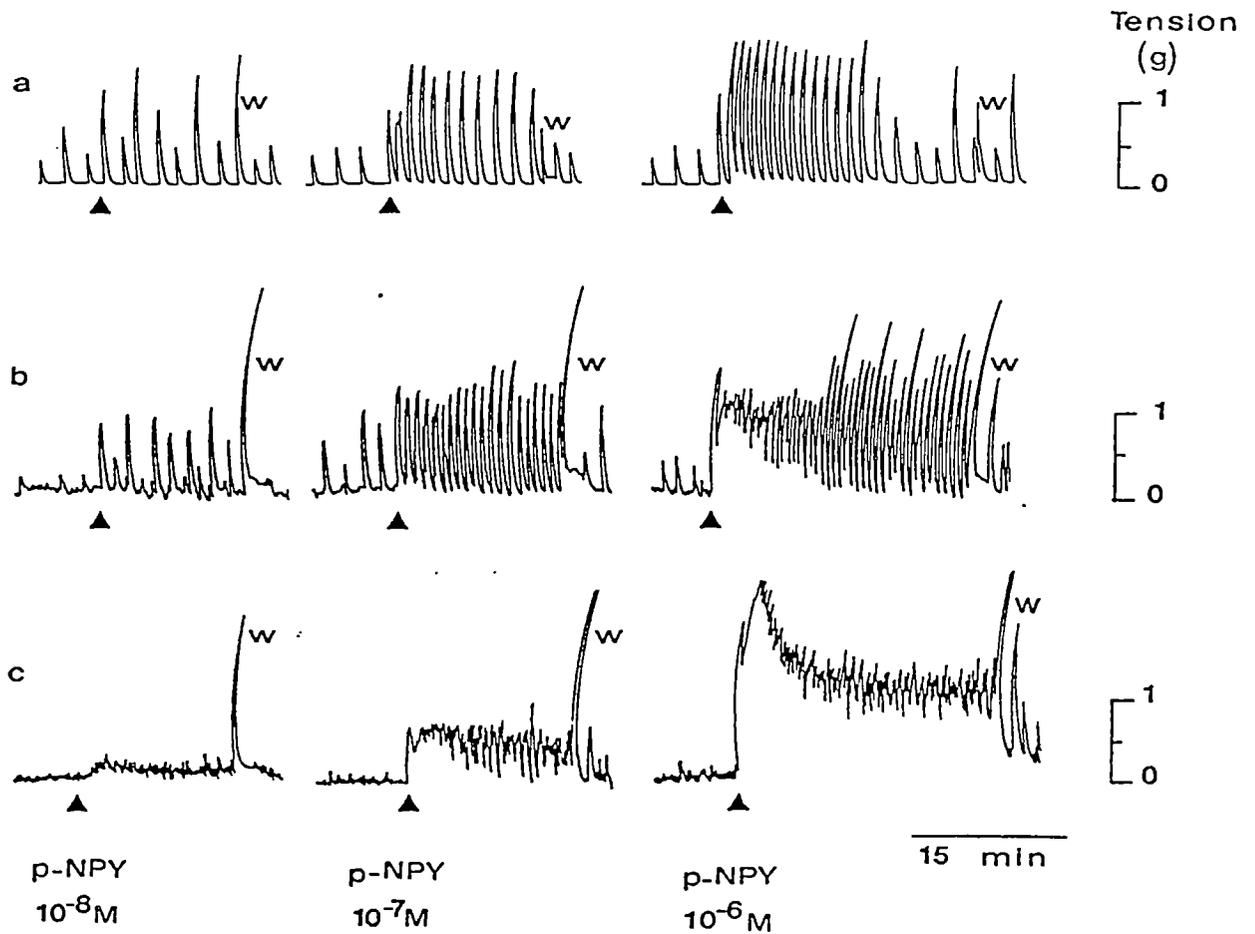


FIGURE # 7: Effet du p-NPY sur l'activité spontanée et/ou sur le tonus de base de préparations isolées de segments ascendant (a), transverse (b) et descendant (c) de côlon de rat. Les symboles (\blacktriangle) indiquent le moment auquel le peptide a été administré. "W": indiquent un lavage des tissus.

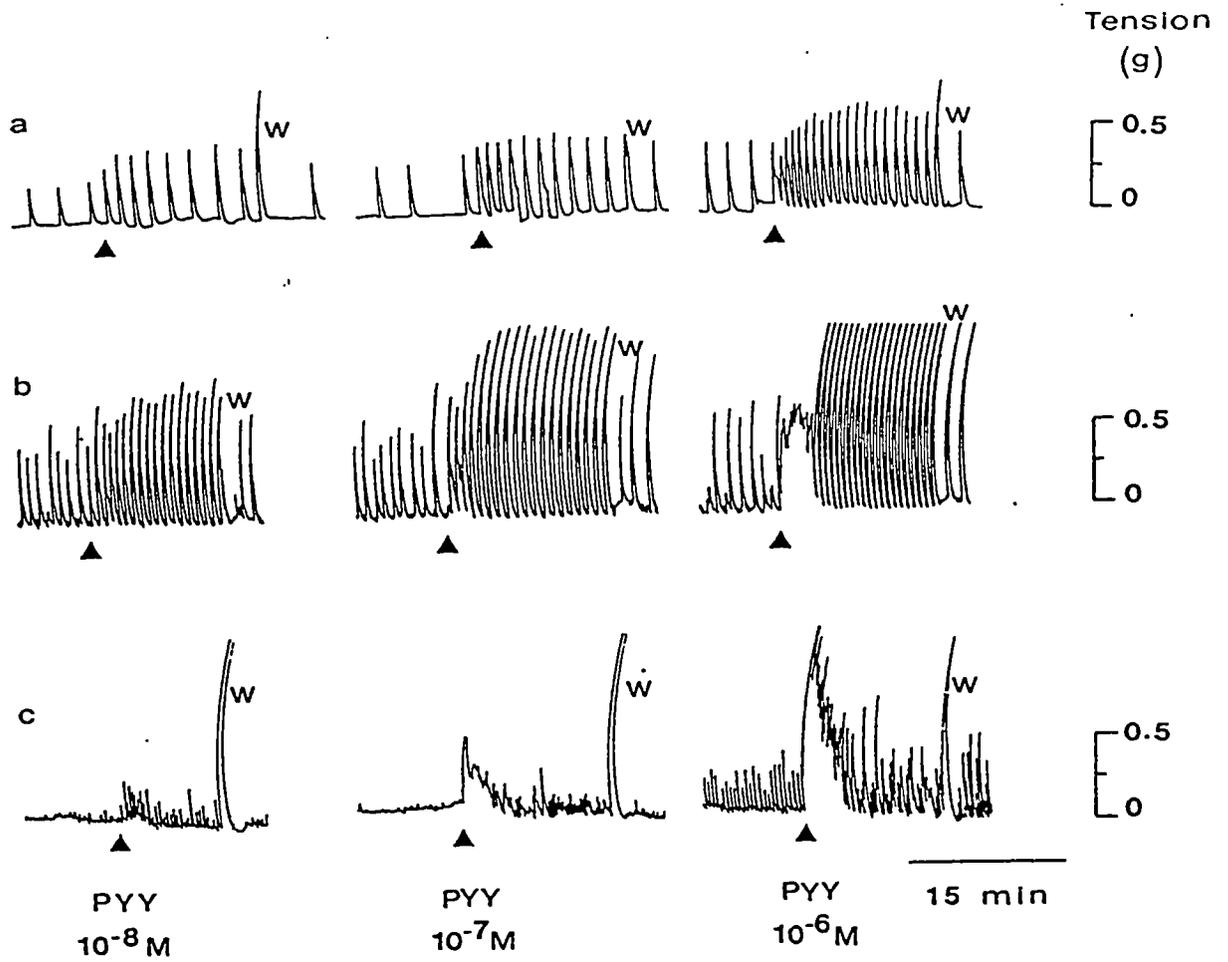


FIGURE # 8: Effet du PYY sur l'activité spontanée et/ou sur le tonus de base de préparations isolées de segments ascendant (a), transverse (b) et descendant (c) de côlon de rat. Les symboles (▲) indiquent le moment auquel le peptide a été administré. "W": indiquent un lavage des tissus.

peptides ($>10^{-6}$ M) une contraction transitoire fut parfois observée. Cependant dans la majorité des préparations, cette réponse tonique s'est avérée faible (Figures # 7 a et 8 a).

Sur le côlon transverse, l'addition de faibles concentrations de p-NPY ou de PYY (10^{-8} et 10^{-7} M) a résulté en une augmentation de l'activité spontanée (amplitude et fréquence) et ce, d'une façon dépendante de la dose. De plus fortes concentrations ($\geq 5 \times 10^{-7}$ M) ont induit une contraction. De façon générale, les contractions causées par le PYY ont toujours été de courte durée. Par opposition, celles induites par le p-NPY ont plutôt été caractérisées par l'apparition d'une réponse maximale initiale (pic) suivi d'une diminution progressive de la tension, celle-ci étant accompagnée d'une augmentation de l'activité spontanée. L'incidence de ces contractions toniques fut directement reliée aux concentrations de peptide et ce pour des doses variant de 5×10^{-7} à 3×10^{-6} M. Les courbes doses-réponses complètes pour le p-NPY et le PYY au niveau du côlon transverse n'ont par contre pas été établies à cause des trop grandes quantités de peptides requises (Figures 7 b et 8 b).

Sur le côlon descendant, l'addition de p-NPY ou de PYY a résulté (pour des concentrations variant de 10^{-9} à 3×10^{-6} M) en une augmentation distincte du tonus de base. Les caractéristiques de ces contractions toniques se sont avérées similaires à celles observées sur le côlon transverse et ascendant; c'est-à-dire transitoire et relativement de longue durée respectivement pour le PYY et le p-NPY (Figures # 7 c et 8 c). Les courbes doses-réponses consécutives générées par l'addition des deux peptides sont présentées à la figure # 9. Le PYY s'est avéré plus efficace que le p-NPY pour induire une contraction sur cette préparation. Les

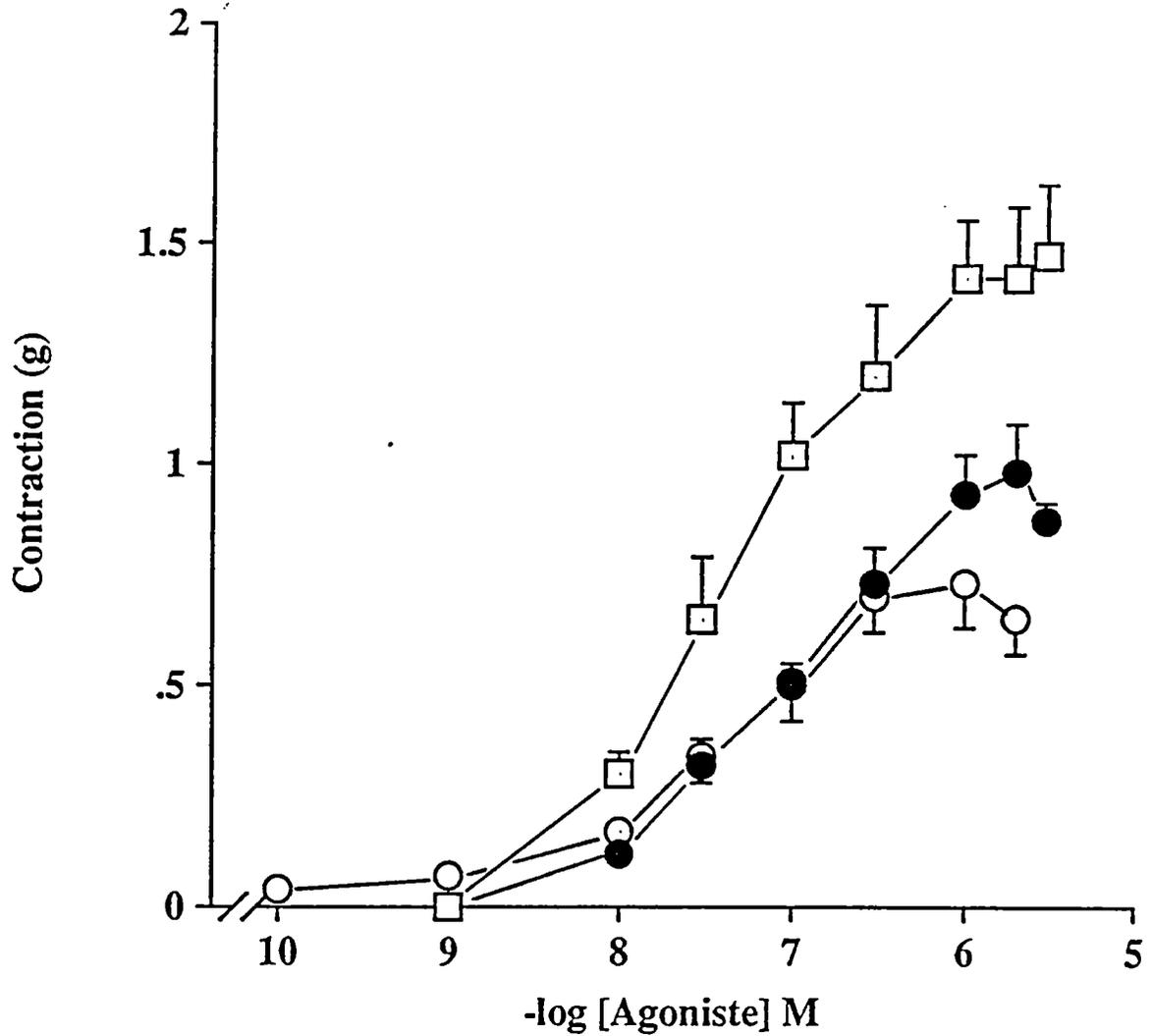


FIGURE # 9: Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de p-NPY (●-●), de h-NPY (○-○) et de PYY (□-□) sur des préparations isolées de côlon descendant de rat. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 4 à 12 expériences. Les résultats ont été exprimés en gramme de contraction.

concentrations seuils pour induire une contraction ont été de 10^{-9} M pour le PYY et le p-NPY et de 10^{-10} M pour le h-NPY. Les réponses maximales ont été obtenues à des concentrations équivalentes de 3×10^{-6} M. Sur cette préparation le p-NPY et le h-NPY se sont avérés de puissance et d'activité biologique équivalentes. Aucune différence significative n'a été détecté entre les réponses maximales obtenues avec les deux peptides.

2.2 Puissance relative du p-NPY et du PYY sur le côlon descendant de rat.

Pour toutes les études subséquentes, nous avons travaillé uniquement avec le côlon descendant de rat. Cette préparation a été préférée aux deux autres car 1) ce tissu est plus sensible à l'activité du p-NPY et du PYY et 2) l'activité spontanée y est moindre.

L'addition consécutive de 5-HT, de carbamylcholine ou de PGE_2 dans les bains à organes isolés a entraîné une contraction dépendante de la dose sur le côlon descendant de rat (Figure # 10). Les concentrations seuils pour induire ces contractions furent de 10^{-9} M pour la PGE_2 et le carbamylcholine et de 10^{-8} M pour la 5-HT. Les réponses maximales de ces agonistes ont été atteintes à des concentrations variant entre 2×10^{-6} et 2×10^{-4} M. Lorsque exprimée en pourcentage, la contraction maximale induite par le NPY s'est avérée équivalente à 17% de celle du carbamylcholine, à 80% de celle de la 5-HT et à 112% de celle de la PGE_2 (Tableau # 6). En comparaison, celle du PYY s'est avérée équivalente à 25% de celle du carbamylcholine, à 115% de celle de la 5-HT, à 150% de celle du p-NPY et à 163% de celle de la PGE_2 . Tel qu'illustré à la figure # 10, l'ordre de

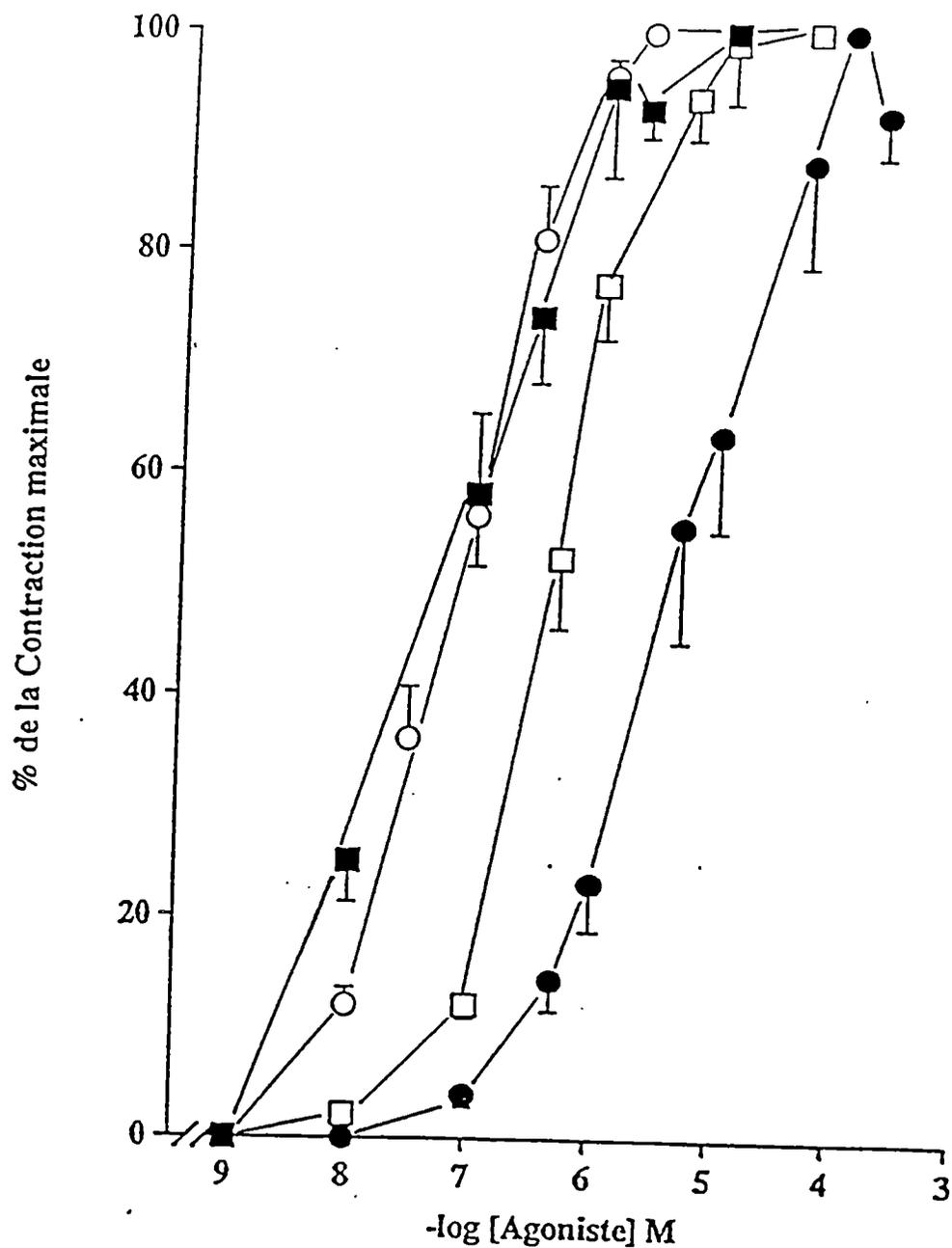


FIGURE # 10: Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de p-NPY (○-○), de 5-HT (●-●), de carbamylcholine (□-□) et de la PGE₂ (■-■) sur des préparations isolées de côlon descendant de rat. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 5 à 8 expériences. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la contraction maximale pour chacun des agonistes.

TABLEAU # 6

Contractions maximales (g) et valeurs des EC_{50} (nM) des NPY porcine et humaine, du PYY, du carbamylcholine, de la 5-hydroxytryptamine (5-HT) et de la prostaglandine E_2 (PGE_2) sur le côlon descendant de rat.

Agonistes	CONTRACTION MAXIMALE (g)	EC_{50} (nM)
p-NPY	0.98 ± 0.11	46.9 ± 6.43
h-NPY	0.73 ± 0.1	32.3 ± 11.3
PYY	1.47 ± 0.16	81.7 ± 22.8
Carbamylcholine	$5.6 \pm 0.29^*$	300 ± 88
5-HT	1.23 ± 0.09	3200 ± 723
PGE_2	0.87 ± 0.17	61.6 ± 13.1

Les valeurs des contractions maximales (g) et des EC_{50} (nM) ont été exprimées en moyenne \pm S.E.M. Ces valeurs dérivent de données obtenues de 5 à 10 expériences. "*": significativement différent de p-NPY.

puissance de ces agonistes sur cette préparation fut: PYY = PGE₂ = p-NPY > carbamylcholine > 5-HT. La courbe dose réponse obtenue à l'aide du PYY n'a pas été présentée sur cette figure car elle chevauche celle du p-NPY.

2.3 Mécanisme d'action du p-NPY et du PYY sur le côlon descendant de rat

2.3.1 Mécanisme d'action du p-NPY

Les réponses au p-NPY (10^{-7} ou 10^{-6} M) sur le côlon descendant de rat n'ont pas été affectées par l'addition de diphenhydramine (10^{-5} M), de méthysergide (10^{-6} M), d'indométacine (10^{-6} M), de propranolol (10^{-6} M) ou de phentolamine (10^{-6} M). Cependant les réponses des agonistes respectifs (10^{-7} M) de ces inhibiteurs ont été bloqués. Suivant l'addition d'atropine (10^{-6} M), les réponses au p-NPY (10^{-7} ou 10^{-6} M) sur le côlon descendant de rat ont été inhibées (Figure # 11, a). Sur cette même préparation, l'addition de TTX (10^{-6} M) a aussi totalement inhibé les réponses au p-NPY (10^{-7} ou 10^{-6} M). Enfin, l'addition de TTX (10^{-6} M) ou d'atropine (10^{-6} M) a également bloqué les réponses au p-NPY (10^{-7} ou 10^{-6} M) sur le côlon ascendant et transverse de rat.

2.3.2 Mécanisme d'action du PYY

Les réponses au PYY (10^{-7} ou 10^{-6} M) sur le côlon descendant de rat n'ont pas été affectées par l'addition de diphenhydramine (10^{-5} M), d'indométacine (10^{-6} M), de propranolol (10^{-6} M), de phentolamine (10^{-6} M) ou d'atropine (10^{-6} M) (Figure # 11, b). Par contre, en présence de TTX (10^{-6} M), les réponses au PYY ont

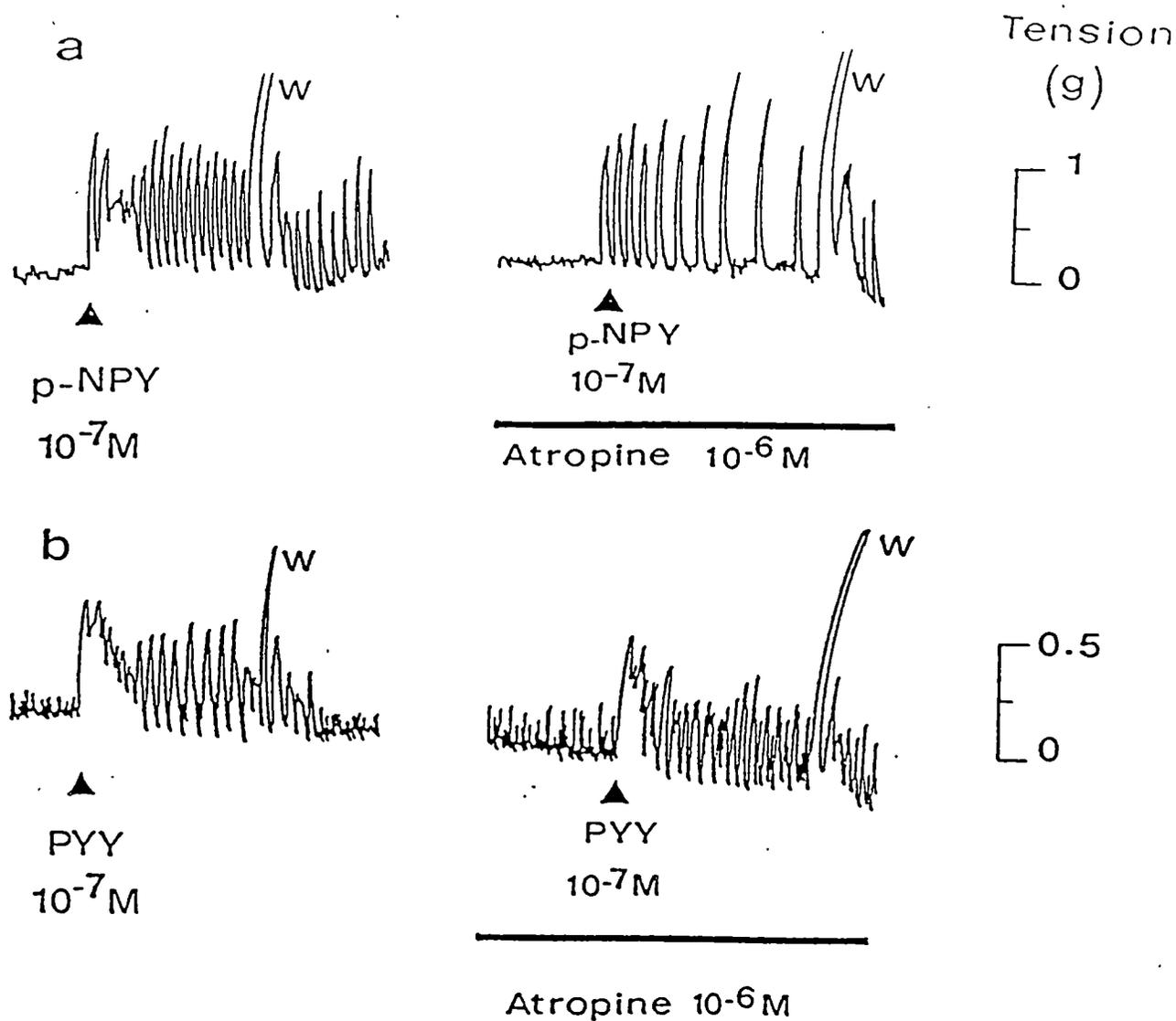


FIGURE # 11: Effets du p-NPY (a) et du PYY (b) sur des préparations isolées de côlon descendant de rat en absence et en présence d'atropine $10^{-6}M$. Les symboles (▲) indiquent le moment auquel le peptide a été administré. "W": indiquent un lavage des tissus.

été inhibées sur le côlon descendant de rat. L'addition de TTX (10^{-6} M) a également inhibé les réponses au PYY (10^{-7} ou 10^{-6} M) sur le côlon ascendant et transverse de rat.

3. ETUDE DE STRUCTURE ACTIVITE

3.1 Fragments du p-NPY.

Les valeurs des activités intrinsèques (α^E), des activités biologiques relatives (A.R), des EC_{50} et les puissances relatives des NPY (porcin et humain) et de leurs fragments respectifs ont été calculées à partir des courbes doses-réponses obtenues sur les deux préparations tissulaires. Les données sont présentées dans le tableau # 7.

Bronches principales de cobaye:

Les courbes doses-réponses cumulatives effectuées sur des préparations isolées de bronches de cobaye à l'aide du p-NPY et de ses fragments en C-terminal sont illustrées à la figure 12. D'une façon générale, cette figure démontre que les récepteurs au NPY sont très sensibles aux faibles changements apportées à la molécule mère. Par exemple, le retrait d'un seul acide aminé tel la Tyr¹, a résulté en la formation d'un peptide (NPY 2-36) pratiquement inactif sur les bronches principales de cobaye. La réponse maximale obtenue avec le fragment (2-36) du p-NPY s'est avéré 76.3% plus faible que celle obtenue avec la molécule entière. Un raccourcissement plus grand de la molécule de NPY, fragment (5-36), a mené à la formation d'un peptide moins actif que le fragment (2-36) mais environ 140 fois

TABLEAU # 7

Activité biologique relative, activité intrinsèque et puissance relative du p-NPY, du h-NPY et de leurs fragments respectifs sur les bronches principales de cobaye et sur le côlon descendant de rat.

Fragments	Bronches principales de cobaye			Côlon descendant de rat		
	A.R. ⁽¹⁾	P.R. ⁽²⁾	EC ₁₀ ⁽³⁾ (nM)	α ^{E(4)}	P.R	EC ₅₀ ⁽⁵⁾ (nM)
p-NPY	1	100	5.24 ± 2.17	1	100	86.2 ± 0.65
(2-36)	0.23	0.74	705 ± 279	0.5	44.8	192 ± 38.7
(5-36)	0.12	-	>1000	0.26	66.8	129 ± 36.7
(11-36)	0.21	0.61	847 ± 453	0.28	28.7	300 ± 40
(13-36)	0.74	5.73	91.4 ± 29.2	1.18	20.5	420 ± 42.7
(16-36)	0.19	-	>1000	0.1	10.3	830 ± 328
(18-36)	ND	ND	ND	0.61	56.3	153 ± 31
(25-36)		inactif		0.1	9.5	900 ± 360
h-NPY	1	100	570 ± 119	1	100	32.3 ± 11.3
(13-36)	ND	ND	ND	0.5	22.9	147 ± 49
(1-24)		inactif			inactif	

1: activité biologique relative exprimée en fonction de la contraction maximale obtenue avec une concentration de 10⁻⁶ M.

2: la puissance relative des agonistes exprimée en pourcentage de celle du p-NPY et du h-NPY.

3: la concentration (nM) de peptide requise pour atteindre une contraction de 10 mg. Ces résultats représentent la moyenne ± S.E.M des données obtenues de 3 à 14 expériences.

4: activité intrinsèque exprimée en fonction de l'effet maximal de p- ou h-NPY.

5: concentration effective de peptide qui produit 50% de la contraction maximale. Ces résultats représentent la moyenne ± S.E.M des données obtenues de 3 à 7 expériences.

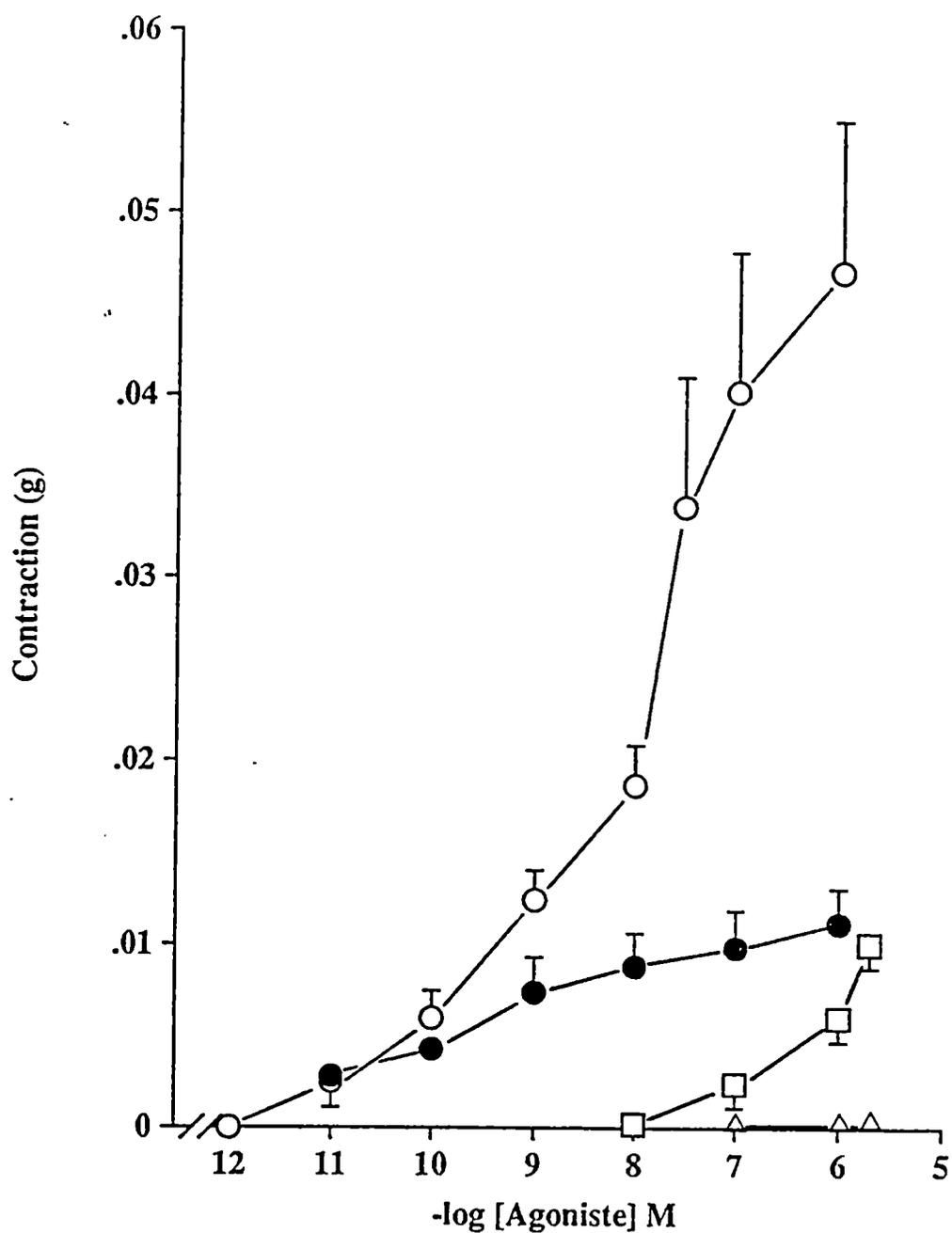


FIGURE # 12: Courbes doses-réponses cumulatives induites par l'addition de p-
NPY (○—○) et des fragments p-NPY (2-36) (●—●), (5-36) (□—
□) et (25-36) (△—△) sur des préparations isolées de bronches
principales de cobaye. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M
des données obtenues de 5 à 11 expériences. Les résultats ont été
exprimés en gramme de contraction.

moins puissant. Une perte proportionnelle d'activité et de puissance ont été observées après un raccourcissement plus grand de la molécule soit avec les fragments (11-36) et (16-36). Le fragment (25-36) du NPY s'est avéré quant à lui totalement inactif sur cette préparation et ce même à des concentrations supérieures à 10^{-6} M (Tableau # 7).

Une exception à la règle fut le cas du fragment (13-36). Tel qu'illustré à la figure # 13, ce fragment s'est avéré, comme ces prédécesseurs moins puissant que le peptide mère. Cependant, ce fragment a présenté une activité biologique supérieure à celle du peptide naturel. Les quantités restreintes de ce composé ne nous ont pas permis de compléter la courbe dose-réponse. Cependant la réponse obtenue avec une concentration de 3×10^{-6} M de ce fragment a été de 0.16 g. Ceci représente une augmentation de 243.3% par rapport à la réponse maximale obtenue avec le NPY.

Côlon descendant de rat:

Les courbes doses-réponses consécutives effectuées sur les préparations isolées de côlon de rat à l'aide des mêmes composés que ceux mentionnés précédemment sont illustrées à la figure 14. D'une façon générale, cette figure montre que des changements apportés à la molécule mère ont des répercussions moins grande sur l'activité du peptide sur cette préparation que sur les voies aériennes de cobaye. Par exemple, le raccourcissement de la molécule de NPY d'un seul acide aminé en position N-terminal, soit le fragment p-NPY (2-36), n'a entraîné qu'un léger déplacement vers la droite de la courbe dose-réponse, accompagnée d'une diminution de moins de 50% dans la réponse maximale. Le raccourcissement

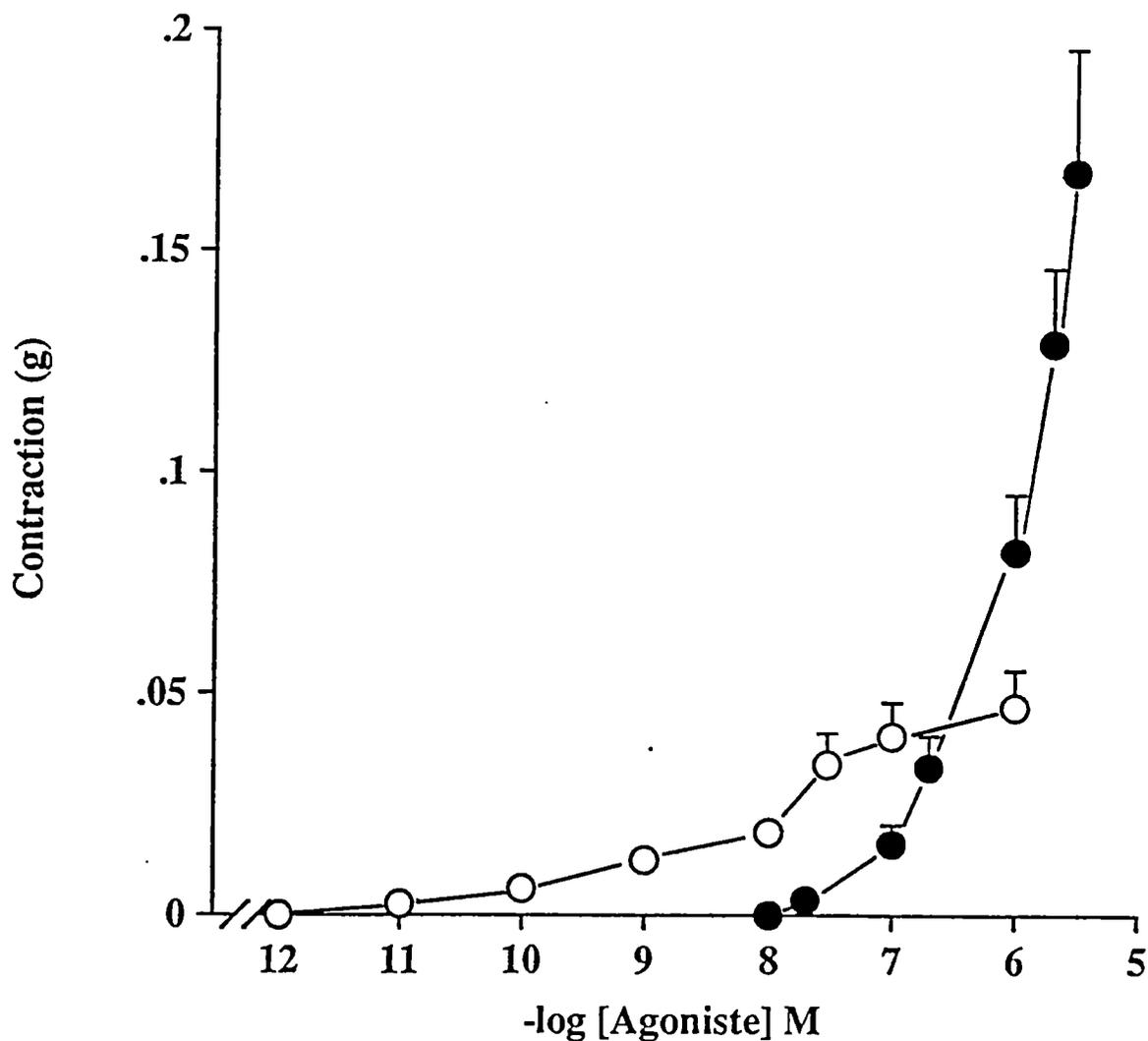


FIGURE # 13: Courbes doses-réponses cumulatives induites par l'addition de p-NPY (1-36) (○—○) et du fragment p-NPY (13-36) (●—●) sur des préparations isolées de bronches principales de cobaye. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 8 à 11 expériences. Les résultats ont été exprimés en gramme de contraction.

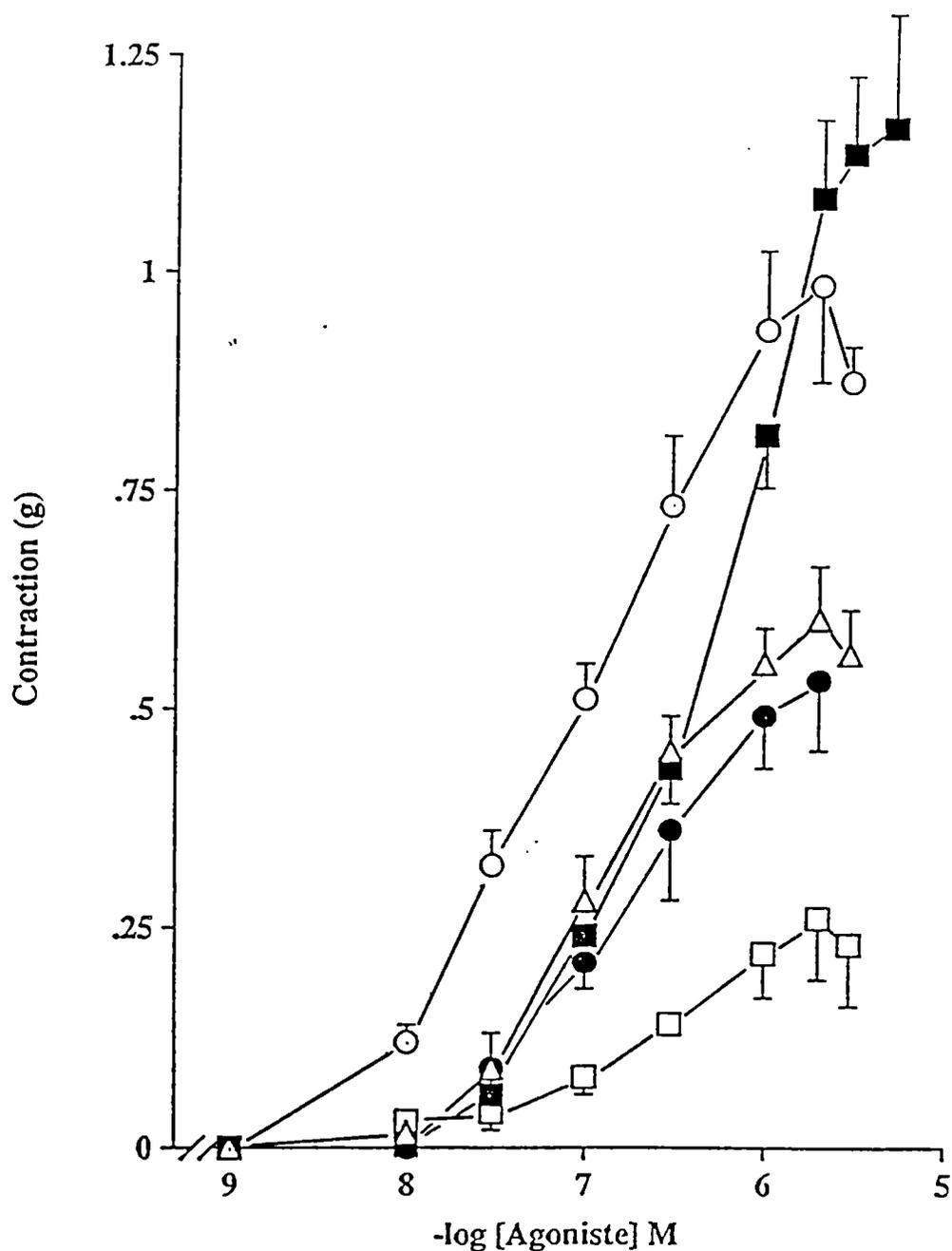


FIGURE # 14: Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de p-NPY (○—○) et des fragments p-NPY (2-36) (●—●), (5-36) (□—□), (13-36) (■—■) et (18-36) (△—△) sur des préparations isolées de côlon descendant de rat. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 3 à 14 expériences. Les résultats ont été exprimés en gramme de contraction.

plus grand de la molécule, fragment (5-36) a mené à la formation d'un peptide dont l'efficacité est plus faible que celle du fragment (2-36). Une perte proportionnelle d'activité et de puissance a été observée avec des fragments plus courts, soit le (11-36) et le (16-36). Cependant, une activité intrinsèque équivalente à 25% de celle du peptide mère a été maintenue avec le fragment (18-36). Le fragment (25-36) du p-NPY est un peptide dont la puissance et l'efficacité sont très faibles par rapport au peptide naturel. Le fragment en N-terminal (1-24 NH₂) du h-NPY n'a induit aucune réponse biologique. Le fragment (13-36) quant à lui s'est avéré légèrement moins puissant que la molécule entière mais avec une efficacité légèrement plus grande. Ce fragment (13-36) du NPY s'est avéré 11.7% plus efficace que le NPY ($P > 0.05$) (Tableau # 7).

Les courbes doses-réponses consécutives effectuées, à l'aide du h-NPY et de son fragment h-NPY (13-36) sur cette même préparation sont illustrées sur la figure # 15. Tel que démontré précédemment, le h-NPY s'est avéré moins efficace que le p-NPY pour induire une contraction sur le côlon descendant de rat (Figure # 9 et Tableau # 6). Par opposition à ce que nous avons observé avec le fragment p-NPY(13-36), le fragment h-NPY(13-36) s'est avéré 4.3 fois moins puissant et 2 fois moins actif que son peptide mère soit le h-NPY.

3.1.1 Mécanisme d'action du fragment p-NPY (13-36).

Nous avons démontré plus haut que la contraction induite par le p-NPY sur les bronches principales de cobaye était dépendante de l'activation de la voie de la cyclooxygénase. Tel qu'illustré sur la figure # 13, le fragment p-NPY (13-36) induit

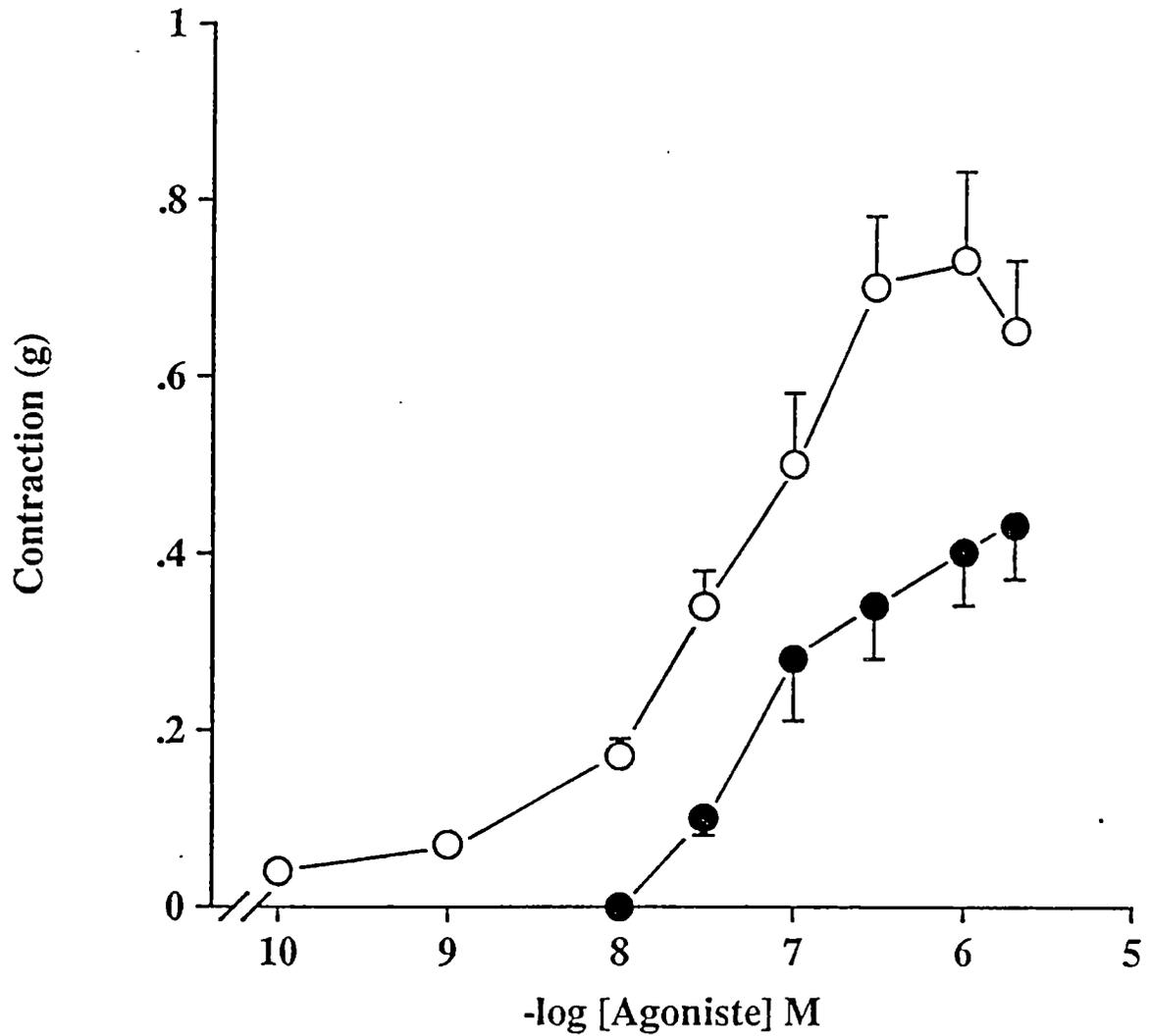


FIGURE # 15: Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de h-NPY (1-36) (○—○) et du fragment h-NPY (13-36) (●—●) sur des préparations isolées de côlon descendant de rat. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 5 à 6 expériences. Les résultats ont été exprimés en gramme de contraction.

aussi sur cette même préparation une contraction dépendante de la dose. L'absence de parallélisme entre les deux courbes doses réponses (p-NPY et p-NPY (13-36)) laisse suggérer que les récepteurs impliqués ou encore le mécanisme par lequel les deux peptides exercent leur action pourraient être différents. Nous avons vérifié cette hypothèse. En conformité aux résultats obtenus avec le p-NPY, l'activité contractile du fragment p-NPY (13-36) (10^{-6} M) n'a pas été altérée suivant un prétraitement des tissus avec la TTX (10^{-6} M), l'atropine (10^{-6} M), le diphenhydramine (10^{-5} M) ou le méthysergide (10^{-6} M). Contrairement aux résultats obtenus avec le NPY, la réponse contractile des bronches principales n'a pas été affectée par la présence d'indométacine (10^{-6} M).

Des expériences similaires ont été réalisées avec les préparations isolées de côlon descendant de rat. Sur cette préparation, l'activité biologique du fragment p- $\text{NPY}(13-36)$ (10^{-6} M) fut comme celle du p- NPY (10^{-6} M) totalement inhibée par l'addition de TTX (10^{-6} M) ou d'atropine (10^{-6} M).

3.2 Analogues du NPY

3.2.1 Modifications de la molécule de h-NPY en position 20

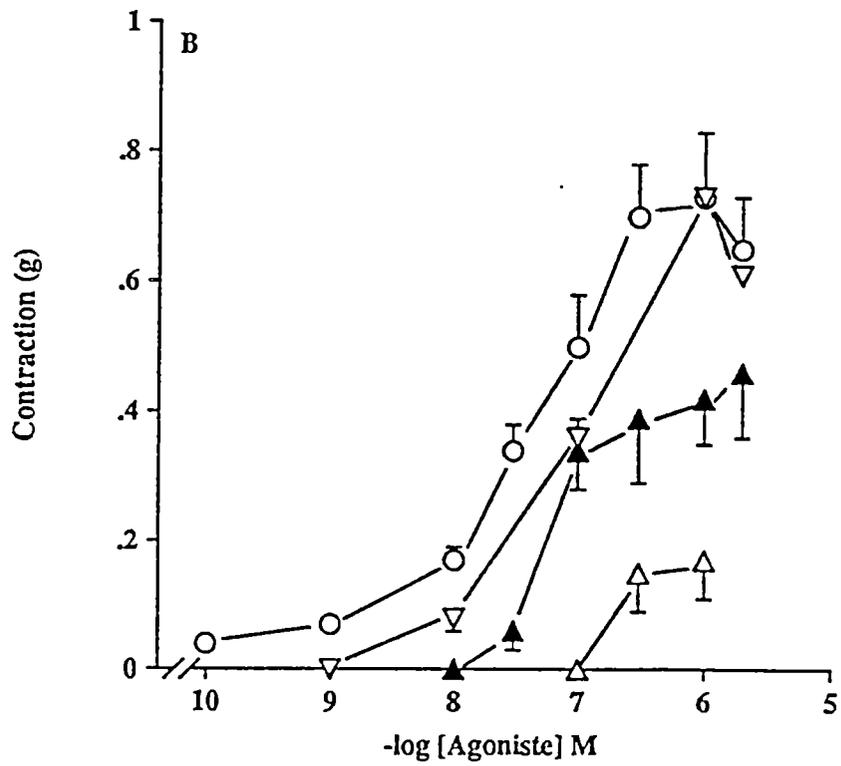
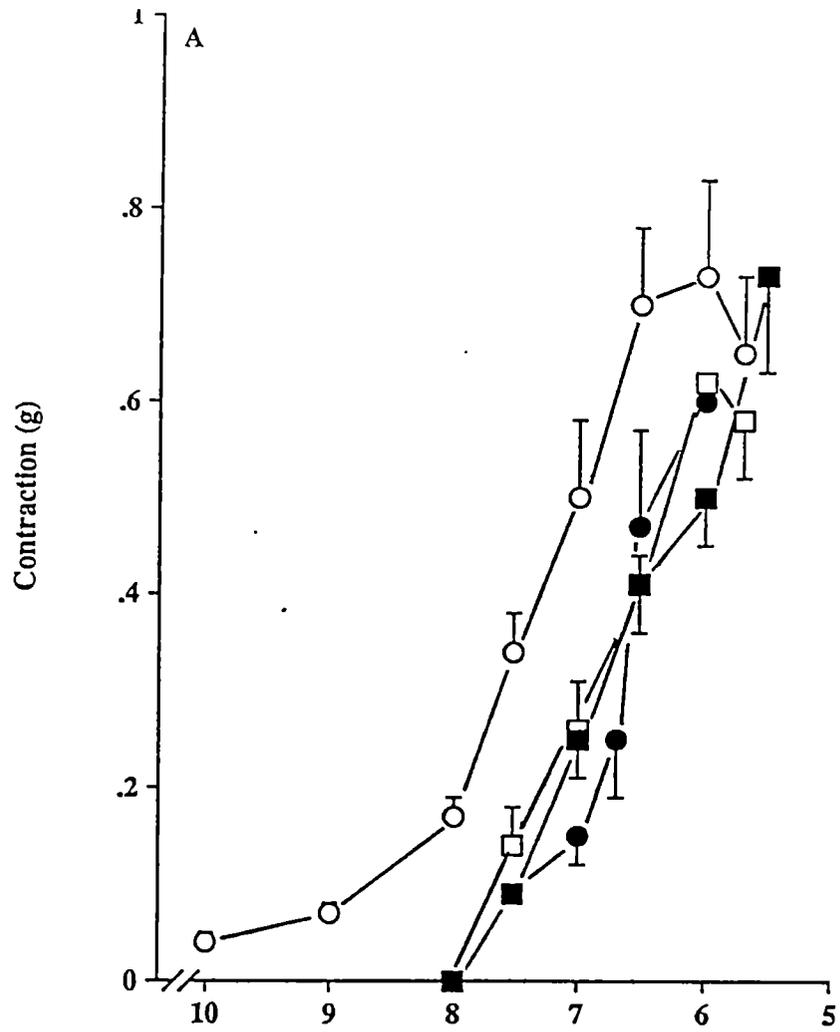
Système gastro-intestinal de rat:

Les courbes doses-réponses consécutives effectuées sur les préparations isolées de côlon descendant de rat à l'aide des analogues du h-NPY sont présentées sur la figure 16. Le panneau A de la figure 16 présente les courbes doses-réponses consécutives effectuées à l'aide du h-NPY, du (D-Tyr²⁰), du (Trp²⁰) et du (Phe²⁰) h-

FIGURE # 16: Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de h-NPY et de divers analogues (substitutions de Tyr²⁰) sur des préparations isolées de côlon descendant de rat. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 4 à 6 expériences. Les résultats ont été exprimés en gramme de contraction.

A: h-NPY (○—○), D-Tyr²⁰ (●—●), Trp²⁰ (□—□) et Phe²⁰ (■—■).

B: h-NPY (○—○), D-Trp²⁰ (▽—▽), Tyr-O-Me²⁰ (▲—▲) et L-Cha²⁰ (△—△).



NPY. De façon générale cette figure # 16 A montre qu'un remplacement de Tyr²⁰ a entraîné un déplacement vers la droite de la courbe dose-réponse au h-NPY. Les concentrations seuils pour induire une contraction ont été de 10⁻⁸ M pour les trois analogues du h-NPY. Ces substitutions de Tyr²⁰ ont aussi résulté en la formation de peptide dont la puissance s'est avérée environ 4 à 8 fois plus faible que celle du peptide naturel. Les analogues (D-Tyr²⁰) ou (Trp²⁰) ont présenté une perte d'environ 18% d'efficacité lorsque comparés à celle de la molécule mère. Le (Phe²⁰) h-NPY s'est avéré aussi actif que la molécule naturelle (Tableau # 8).

Le panneau B de cette figure illustre les courbes doses-réponses consécutives effectuées sur cette même préparation à l'aide du h-NPY et des analogues (D-Trp²⁰), (Tyr-O-Me²⁰) et (Cha²⁰) (cyclohexylalanine). Les concentrations seuils pour induire une contraction ont été de 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M et 10⁻⁷ M respectivement pour le (D-Trp²⁰), le (Tyr-O-Me²⁰) et le (Cha²⁰) indiquant ainsi une perte graduelle d'affinité envers les récepteurs. Par opposition au h-NPY, les analogues (Tyr-O-Me²⁰) et (Cha²⁰)h-NPY ont présenté une perte respective de 37% et 77% en terme d'activité biologique tandis que le (D-Trp²⁰)h-NPY s'est avéré aussi actif que la molécule naturelle.

La molécule de h-NPY modifié en position 20 à l'aide de ces 3 acides aminés a donc mené à la formation de peptides qui se sont avérés 3 à 8 fois moins puissants que le peptide naturel (Tableau # 8).

TABLEAU # 8

Activité biologique relative, activité intrinsèque et puissance relative du h-NPY et de ses analogues en position 20 et 21 sur les bronches principales de cobaye et sur le côlon descendant de rat.

Analogues	Bronches principales de cobaye			Côlon descendant de rat		
	A.R. ⁽¹⁾	P.R. ⁽²⁾	EC ₁₀ ⁽³⁾ (nM)	α^E ⁽⁴⁾	P.R.	EC ₅₀ ⁽⁵⁾ (nM)
h-NPY	1	100	570 ± 119	1	100	32.3 ± 11.3
[D-Tyr ²⁰]hNPY	0.46	-	>1000	0.82	13.8	233 ± 33.3
[Trp ²⁰]hNPY	0.66	61.4	927 ± 42.2	0.83	25.9	125 ± 25
[D-Trp ²⁰]hNPY	0.88	-	>1000	1	33.3	96.8 ± 35.4
[Phe ²⁰]hNPY	0.74	71.2	800 ± 237	1	12.6	225 ± 25
[Cha ²⁰]hNPY	0.76	67.7	841 ± 22	0.23	13.8	233 ± 66
[Tyr-O-Me ²⁰]hNPY	0.53	-	>1000	0.63	37.6	85.7 ± 7.2
[D-Tyr ²¹]hNPY	0.32	-	>1000	0.7	7.6	425 ± 25
[Trp ²¹]hNPY	inactif	-	-	0.5	9.6	346 ± 57.6
[D-Trp ²¹]hNPY	inactif	-	-	0.82	6.4	500 ± 100
[Phe ²¹]hNPY	1.38	110	518 ± 29.5	1.3	33.8	95.5 ± 19.1
[Cha ²¹]hNPY	inactif	-	-	0.9	44.6	72.3 ± 14
[Tyr-O-Me ²¹]hNPY	0.21	-	≥1000	1.09	20.5	157 ± 71.7
[Leu ^{20,21}]hNPY	2.6	228.9	249 ± 94.8	1.42	26.0	124 ± 19.5

suite tableau # 8

- 1: activité biologique relative exprimée en fonction de la contraction maximale obtenue avec une concentration de 10^{-6} M.
- 2: la puissance relative des agonistes exprimée en pourcentage de celle du p-NPY et du h-NPY.
- 3: la concentration (nM) de peptide requise pour atteindre une contraction de 10 mg. Ces résultats représentent la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 3 à 7 expériences.
- 4: activité intrinsèque exprimée en fonction de l'effet maximal de p- ou h-NPY.
- 5: concentration effective de peptide qui produit 50% de la contraction maximale. Ces résultats représentent la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 3 à 7 expériences.

3.2.2 Modifications de la molécule de h-NPY en position 21.

Des substitutions avec les mêmes acides aminés ont aussi été réalisées pour la Tyr²¹. Les courbes doses-réponses consécutives induites par ces divers analogues ont été illustrées sur la figure # 17. Les valeurs quantitatives (EC_{50} , α^E , A.R et P.R) ont été présentées dans le tableau # 8. Le panneau A de la figure 17 illustre les résultats obtenus avec le h-NPY, le (D-Tyr²¹) et le (Trp²¹)h-NPY sur le côlon de rat. Ces substitutions de Tyr²¹ ont résulté en la formation de peptide dont la puissance s'est avérée environ 10 à 14 fois plus faible que celle du peptide naturel. Cependant, l'activité biologique du peptide natif n'a été diminuée que d'environ 30% et 50% après la substitution de la Tyr²¹ par le D-Tyr et le Trp.

Le panneau B de cette figure 17 illustre les courbes doses-réponses consécutives induites par les analogues le (Cha²¹), (Tyr-O-Me²¹) et (D-Trp²¹)h-NPY. Les concentrations seuils pour induire un effet biologique ont été de 10^{-9} M, 10^{-8} M et 10^{-7} M respectivement pour (Cha²¹), (Tyr-O-Me²¹) et (D-Trp²¹). L'activité biologique du h-NPY a été diminuée de 18% suite au remplacement de Tyr²¹ par D-Trp mais est demeurée inchangée lorsque la tyrosine 21 fut substituée par Tyr-O-Me ou Cha.

Les analogues tels (D-Tyr²¹), (Trp²¹) et (D-Trp²¹)h-NPY se sont avérés respectivement 13, 10 et 15 fois moins puissants que le h-NPY alors que les analogues (Cha²¹) et (Tyr-O-Me²¹) n'ont présentés une perte de puissance que de l'ordre de 2 à 4 fois (Tableau # 8).

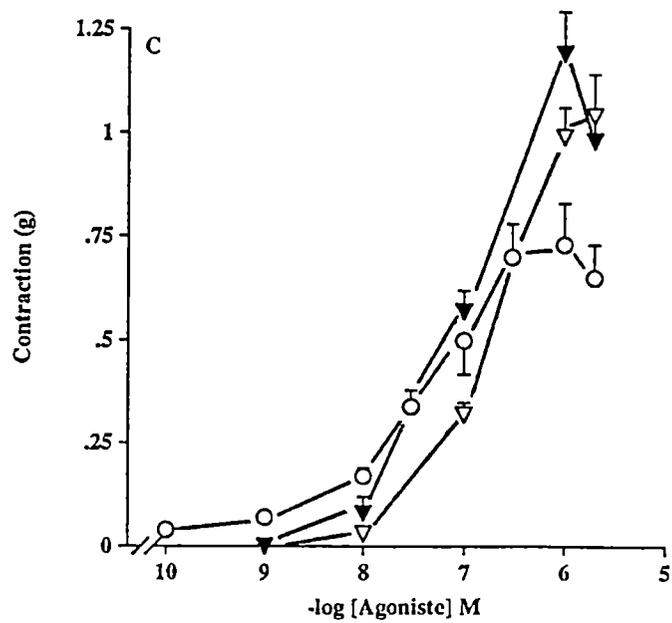
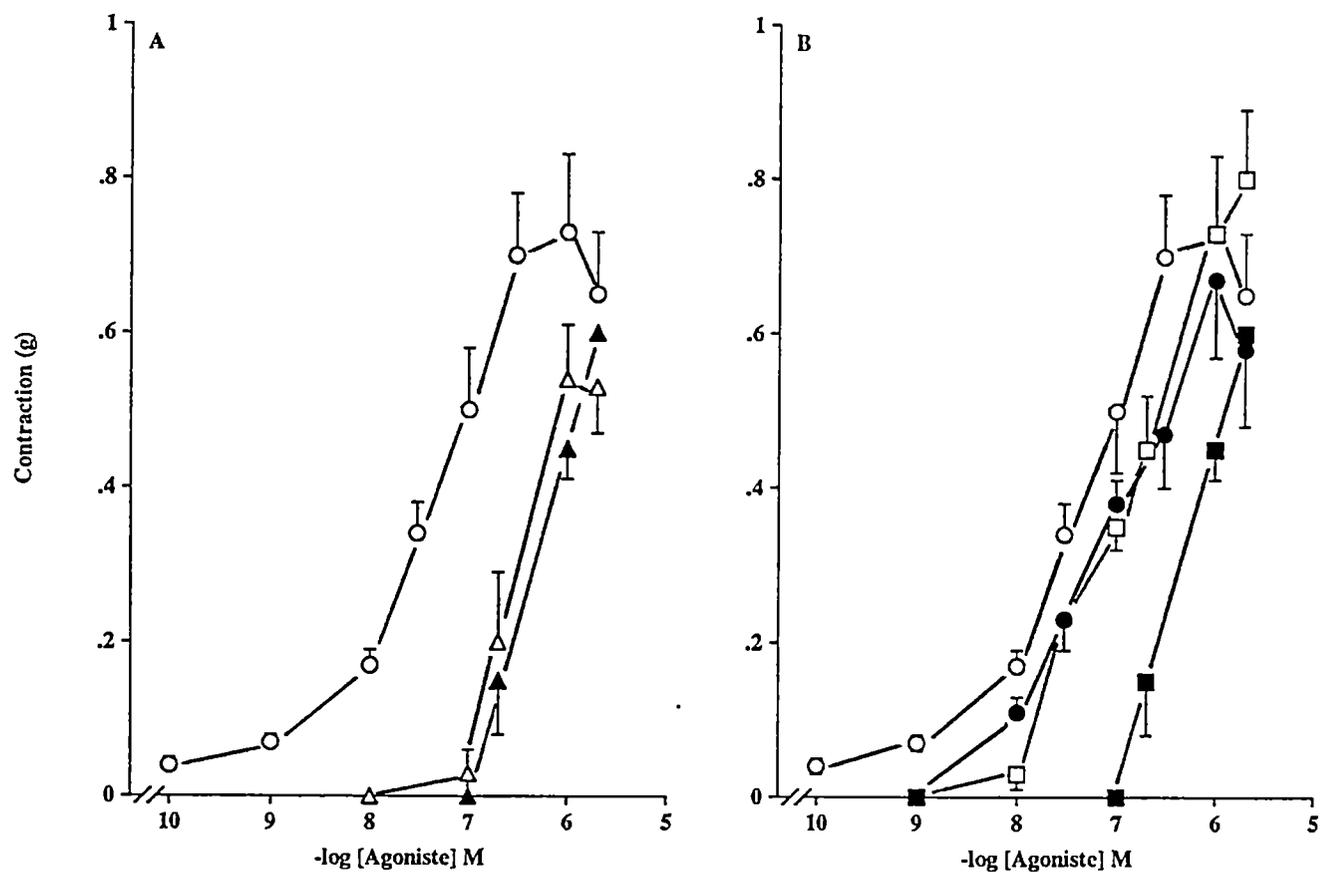
Le dernier panneau de cette figure, soit le 17 C, illustre les courbes doses-réponses consécutives induites par les analogues (Leu^{20,21}) et le (Phe²¹)h-NPY. D'une

FIGURE # 17: Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de h-NPY et de divers analogues (substitutions de Tyr²¹) sur des préparations isolées de côlon descendant de rat. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 3 à 6 expériences. Les résultats ont été exprimés en gramme de contraction.

A: h-NPY (○—○), D-Tyr²¹ (△—△) et Trp²¹ (▲—▲).

B: h-NPY (○—○), Cha²¹ (●—●), Tyr-O-Me²¹ (□—□) et D-Trp²¹ (■—■).

C: h-NPY (○—○), Leu^{20,21} (▽—▽) et Phe²¹ (▼—▼).



façon générale, ces peptides se sont avérés plus actifs que la molécule naturelle malgré une légère perte de puissance (3 à 4 fois). Ces modifications spécifiques de la molécule mère ont entraîné des augmentations de 30% (Phe²¹) et 42% (Leu^{20,21}) dans l'activité biologique du peptide (Tableau # 8).

Système respiratoire de cobaye:

Tous les analogues (position 20 et 21) du h-NPY cités plus haut, ont été testés sur les bronches principales de cobaye. Sur cette préparation tissulaire, la substitution de la tyrosine en position 20 par D-Tyr²⁰, D-Trp²⁰ et Tyr-O-Me²⁰ a entraîné une perte de puissance chez la molécule mère. De plus, ces analogues se sont avérés de 12 à 54 fois moins actifs que la molécule naturelle (Tableau # 8). Le remplacement de Tyr²⁰ par Trp²⁰, Phe²⁰ ou Cha²⁰ a aussi résulté en une perte importante d'efficacité variant de 24 à 34%. La puissance de ces analogues s'est par contre avérée similaire à celle du peptide naturelle, du moins lorsque évaluée en terme de EC₁₀ (quantité de peptide nécessaire pour induire une contraction de 10 mg).

Des changements majeurs tant au niveau de l'efficacité qu'au niveau de la puissance du h-NPY ont été observé lorsque des substitutions similaires ont été réalisées en position 21. Les analogues (Trp²¹), (D-Trp²¹) et (Cha²¹) du h-NPY se sont avérés totalement inactifs sur cette préparation et ce même à des doses supérieures à 10⁻⁶ M. Le remplacement de cette position par D-Tyr ou Tyr-O-Me a résulté en une perte considérable d'affinité et d'activité biologique du h-NPY pour ses récepteurs. Pour une concentration équivalente de 10⁻⁶ M, les analogues D-Tyr²¹ et (Tyr-O-Me²¹) se sont avérés respectivement 68% et 79% moins actifs que la

molécule naturelle. Contrairement à ces observations, le (Phe²¹) et le (Leu^{20,21}) ont présentés une augmentation d'efficacité respective de 1.3 et 2.6 fois par rapport à celle de la molécule mère.

3.2.3 Autres analogues du h-NPY

Des substitutions des résidus autres que le Tyr²⁰ et Tyr²¹ ont été effectuées au sein de la molécule naturelle. Ces analogues ont été testés sur les deux préparations tissulaires. Les valeurs des activités intrinsèques (α^E), des activités biologiques relatives (A.R.), des EC₅₀ et des puissances relatives (P.R.) pour chacun des analogues et ce sur les deux préparations tissulaires ont été présentées dans le tableau # 9.

La figure # 18 illustre les courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition du h-NPY et des analogues du h-NPY soit le (Tyr¹- ψ -CH₂NH-Pro²) (lien pseudo-amide), le [Asp²,Lys³¹] et le cyclo^{2,31} [Asp²,Lys³¹] sur le côlon descendant de rat. Les concentrations seuils de peptide pour induire une contraction ont été de 10⁻¹⁰ M pour le cyclo^{2,31}[Asp²,Lys³¹], 10⁻⁹ M pour le [Asp²,Lys³¹] et de 10⁻⁸ M pour le Tyr¹- ψ -CH₂NH-Pro². Les 3 analogues se sont avérés moins actifs (diminution de 40%, 24% et de 29% en terme de réponses maximales) et moins puissants (de 1.2 à 6.7 fois) que la molécule naturelle sur cette préparation.

Sur les bronches principales de cobaye, le [Asp²,Lys³¹] et le cyclo^{2,31} [Asp²,Lys³¹] ont présenté une perte respective de 66% et 96% en terme d'activité biologique. Leurs puissances relatives n'ont pas pu être déterminées puisque les contractions maximales n'ont pas été atteintes. Le Tyr¹- ψ -CH₂NH-Pro² s'est avéré

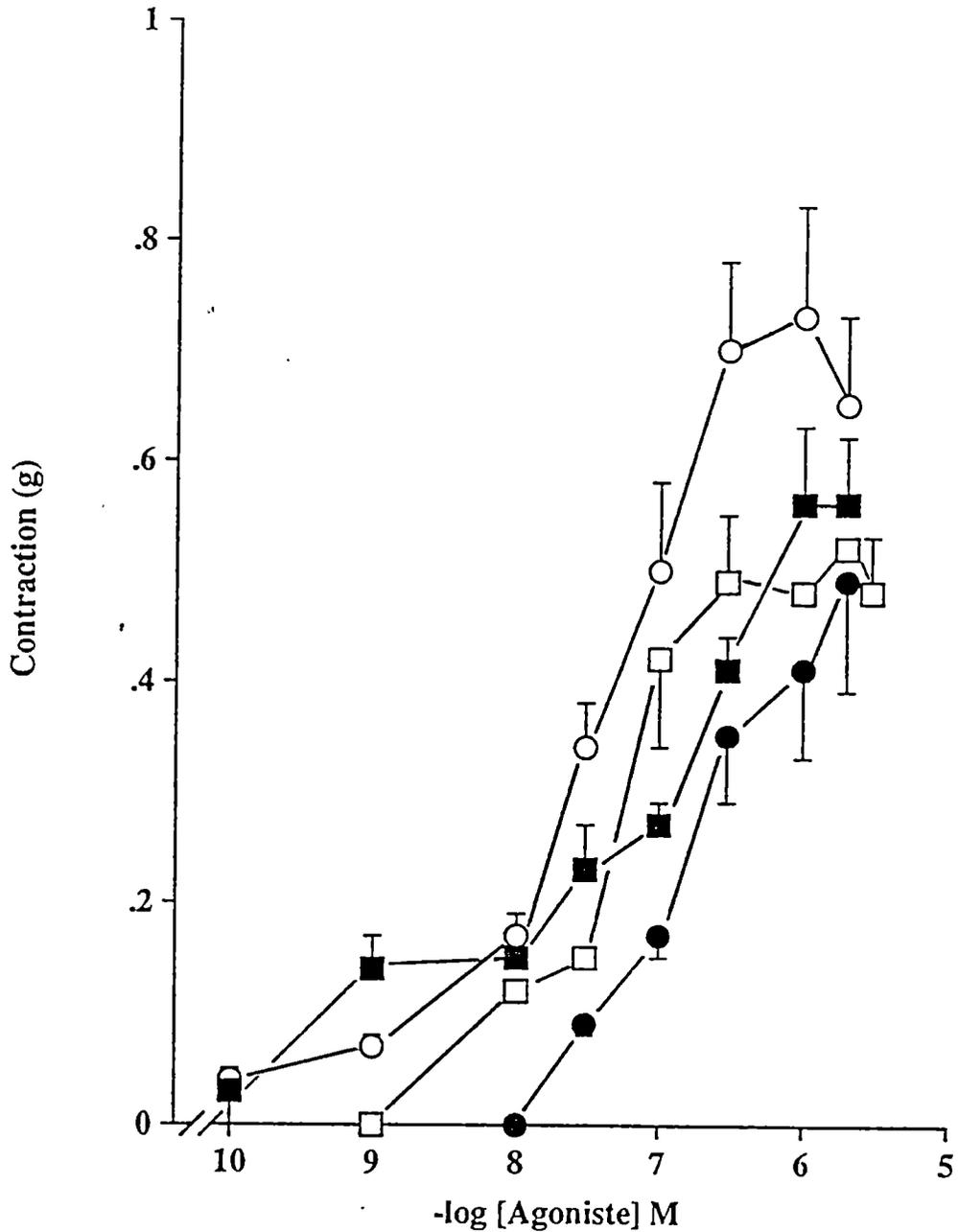


FIGURE # 18: Courbes doses-réponses consécutives induites par l'addition de h-NPY et ses analogues sur les préparations isolées de côlon descendant de rat. Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M des données obtenues de 4 à 6 expériences. Les résultats ont été exprimés en gramme de contraction.
 h-NPY (○—○), Tyr-ψ-CH₂NH-Pro² (●—●), [Asp², Lys³¹] (□—□) et cyclo^{2,31} [Asp², Lys³¹] (■—■).

TABLEAU # 9

Activité biologique relative, activité intrinsèque et puissance relative du h-NPY et de ses analogues sur les bronches principales de cobaye et sur le côlon descendant de rat.

Analogues	Bronches principales de cobaye			Côlon descendant de rat		
	A.R. ⁽¹⁾	P.R. ⁽²⁾	EC ₁₀ ⁽³⁾ (nM)	α^E ⁽⁴⁾	P.R.	EC ₅₀ ⁽⁵⁾ (nM)
h-NPY	1	100	570 ± 119	1	100	32.3 ± 11.3
[Tyr ¹ -ψ-CH ₂ NH-Pro ⁽²⁾]hNPY	0.06	72.4	787 ± 48.3	0.6	14.8	138 ± 37
Cyclo ^{2,31} [Asp ² , Lys ³¹]hNPY	0.34	-	>1000	0.76	82.8	32.5 ± 10.7
[Asp ² ,Lys ³¹]hNPY	0.04	-	>1000	0.71	50	62.7 ± 14.8

1: activité biologique relative exprimée en fonction de la contraction maximale obtenue avec une concentration de 10⁻⁶ M.

2: la puissance relative des agonistes exprimée en pourcentage de celle du p-NPY et du h-NPY.

3: la concentration (nM) de peptide requise pour atteindre une contraction de 10 mg. Ces résultats représentent la moyenne ± S.E.M des données obtenues de 3 à 7 expériences.

4: activité intrinsèque exprimée en fonction de l'effet maximal de p-NPY ou h-NPY.

5: concentration effective de peptide qui produit 50% de la contraction maximale. Ces résultats représentent la moyenne ± S.E.M des données obtenues de 3 à 7 expériences.

1.3 fois moins puissant que le h-NPY et 94% moins efficace que le h-NPY pour induire une contraction de 10 mg sur les bronches principales de cobaye.

DISCUSSION

De façon globale, nos résultats ont montré que le NPY exerce divers effets biologiques (contraction, inhibition) tant au niveau du système respiratoire que gastro-intestinal. Les mécanismes régissant ces actions se sont révélés différents d'une préparation tissulaire à l'autre et parfois même d'une espèce animale à l'autre. Sur le côlon de rat, le PYY a induit une contraction dont le mécanisme d'action s'est avéré différent de celui du NPY. L'addition de TTX et/ou d'atropine a totalement inhibé les réponses induites par le NPY alors que les réponses induites par le PYY ont été bloquées uniquement par l'addition de TTX.

L'étude de structure activité, réalisée à l'aide de fragments et d'analogues synthétiques, a révélé que les séquences d'acides aminés importantes pour l'activation des récepteurs du NPY peuvent différer d'une préparation tissulaire à une autre.

Plusieurs questions ont donc été soulevées au cours de cette recherche et de nombreuses observations, parfois sans lien apparent, en sont ressorties. Donc de façon à mieux saisir l'importance relative de chacune de ces données, les résultats seront discutés par étapes définies en tenant compte des premiers objectifs poursuivis.

1. Effets du NPY sur les voies aériennes des mammifères:

Nos résultats fournissent d'abord une première évidence à savoir que le NPY peut être impliqué directement dans le contrôle du tonus de base des voies aériennes chez le cobaye. Sur chacune des préparations tissulaires étudiées (obtenues

de trois niveaux différents de l'arbre trachéobronchique), le NPY a induit une contraction dépendante de la dose. Les concentrations seuils pour déclencher une réponse ont été en moyenne inférieures à 10^{-11} M ce qui suggère la présence de récepteurs à forte affinité pour le peptide dans ces tissus. Cette observation est fort intéressante puisqu'il a déjà été démontré que les fibres nerveuses sympathiques présentant une immunoréactivité qui s'apparente au NPY étaient présentes au niveau des muscles lisses des voies aériennes chez plusieurs espèces de mammifère incluant le cobaye (Uddman et coll., 1984, Sheppard et coll., 1984). En se basant uniquement sur l'activité intrinsèque, nos résultats suggèrent que le NPY est aussi efficace pour induire une réponse contractile sur les voies aériennes proximales que distales (Figure # 3). Cependant, les valeurs des EC_{50} indiquent que le NPY serait plus puissant au niveau de la trachée que sur les bandelettes de parenchyme pulmonaire et les bronches principales.

Les études pharmacologiques ont révélé que l'activité myotrope du NPY n'était pas médiée via la stimulation de fibres nerveuses. L'addition de 10^{-6} M de tétródotoxine n'a pas affecté la réponse induite par le peptide. Cependant, les contractions générées par le NPY ont totalement été abolies par l'addition d'indométacine, ce qui indique que l'inhibition de la synthèse et de la libération des produits de la cyclooxygénase résulte en une inhibition totale de la réponse du peptide. Cette observation peut sans doute expliquer l'absence d'activité apparente du NPY au niveau du muscle lisse de la trachée de cobaye telle que rapportée par Stretton et Barnes (1988). Durant leurs expériences, une concentration de 10^{-5} M d'indométacine a toujours été présente dans leur solution de Krebs physiologique.

Bien que le NPY s'avère être un agent bronchoconstricteur chez le cobaye, nous avons observé que ce peptide n'exerçait aucun effet contractile ou relaxant sur des préparations tissulaires similaires obtenues du rat et de l'homme. Ceci pourrait probablement refléter une absence d'activité de la phospholipase A après l'interaction du NPY avec la membrane du muscle lisse chez ces deux espèces plutôt qu'une absence de récepteurs pour le NPY dans ces tissus. En effet, il a déjà été démontré que des fibres nerveuses immunoréactives au NPY sont présentes en étroite association avec les muscles lisses des voies aériennes chez le rat et chez l'homme (Uddman et coll., 1984; Sheppard et coll., 1984; Lundberg et coll., 1982b).

La contraction générée par le NPY présente un patron particulier lorsque comparée à celle d'autres agents myotropes. Par opposition aux réponses rapides et de courte durée induites par l'histamine, la 5-HT, le carbamylcholine et la SP, les contractions générées par le NPY sont de longue durée et se caractérisent par une entrée en action lente (Figure # 2). De plus, les amplitudes maximales des réponses obtenues avec le NPY sont minimales et n'équivalent qu'à un faible pourcentage de celles induites par les autres agents bronchoconstricteurs. D'une part, ceci pourrait suggérer que le NPY est moins important que les autres agonistes pour influencer le tonus de base des muscles lisses des voies aériennes. D'autre part, si l'on se base sur les valeurs de EC_{50} , ces mêmes résultats pourraient indiquer que le NPY est, du moins chez le cobaye, parmi les agents bronchoconstricteurs les plus puissants identifiés à date (Tableau # 3).

Pour l'instant, l'importance physiologique de la bronchoconstriction prolongée induite par le NPY demeure inconnue. Mais, quelle qu'en soit la véritable issue, ces premières données suggèrent que des récepteurs sensibles à la molécule de NPY

seraient possiblement présents au niveau des voies aériennes chez le cobaye.

D'une façon générale, le NPY est reconnu pour induire trois principales actions (possiblement séparées) au niveau de la jonction neuro-effectrice sympathique (Potter, 1988). Ces dernières sont 1) une inhibition de la libération de la norépinéphrine via une action pré-jonctionnelle, 2) l'induction d'une contraction directe (vasoconstriction) et 3) une modulation de la réponse induite par différents agents endogènes (la NE et l'histamine) via une action post-jonctionnelle (Sundler et coll., 1988; Potter, 1988). Ces trois principales actions du NPY ont été mises en évidence lors d'expériences réalisées principalement sur des préparations isolées de divers vaisseaux sanguins (Potter, 1988; Sundler et coll., 1988). A plusieurs reprises il a été démontré que chacune de ces trois actions du NPY est de lente entrée en action et de longue durée (Lundberg et Tatemoto, 1982a). De plus, le degré relatif d'apparition de ces trois actions du peptide varie d'un vaisseau sanguin à un autre (Wahlestedt et coll., 1985) et aussi d'une espèce animale à l'autre pour une même préparation (Wahlestedt et coll., 1985). Par exemple, l'effet potentiateur du NPY semble davantage se manifester sur les artères que sur les veines. Ainsi, le NPY augmente les contractions causées par la NE sur l'artère pulmonaire, gastro-épiplœique et fémorale de lapin mais n'altère en aucune façon celles induites par la NE sur la veine gastro-épiplœique et fémorale (Edvinsson et coll., 1984b; Wahlestedt et coll., 1985, 1987). Certains autres vaisseaux sanguins, insensibles à l'effet potentiateur du NPY, (artères cérébrales de chat) répondent par une contraction en présence du peptide (Edvinsson et coll., 1983; Ekblad et coll., 1984a); tandis que chez d'autres (artères coronaires de lapin) les deux actions du NPY (potentiation et vasoconstriction directe) sont présentées (Han et Abel, 1987). De plus, il a été

démontré que l'effet potentiateur du NPY apparaît habituellement à des concentrations plus faibles que celles requises pour générer une vasoconstriction (Edvinsson et coll., 1984a, b; Wahlestedt et coll., 1985; Sundler et coll., 1988; Potter, 1988). Par exemple, sur les petites artères provenant des muscles squelettiques chez l'homme, le NPY n'exerce aucun effet potentiateur mais génère des contractions dont l'amplitude correspond à $95 \pm 16\%$ de celles causées par la NE (Pernow, 1988). Par opposition, les contractions maximales générées par le NPY sur les artères coronaires de lapin sont de faibles amplitudes. En plus de cet effet post-jonctionnel direct, le NPY augmente légèrement les contractions induites par divers agonistes contractiles (NE, histamine, $\text{PGF}_{2\alpha}$) et bloque fortement les relaxations induites par les agents vasodilatateurs dont l'acétylcholine (Edvinsson et coll., 1984b; Han et Abel, 1987) sur cette même préparation.

Dans notre étude, les réponses contractiles au NPY furent obtenues avec des concentrations similaires à celles utilisées chez les artères coronaires de lapin (Han et Abel, 1987) mais légèrement plus faibles que celles nécessaires pour induire une réponse sur les petites artères obtenues des muscles squelettiques chez l'homme (Pernow et Lundberg, 1988). Donc, en se basant sur les évidences obtenues des études réalisées sur les vaisseaux sanguins, nous avons émis l'hypothèse que la réponse contractile obtenue avec le NPY sur les voies aériennes de cobaye ne serait possiblement pas sa seule action.

Le protocole expérimental que nous avons adopté pour déterminer si le NPY pouvait aussi exercer un effet potentiateur et/ou inhibiteur sur les voies aériennes de cobaye a été choisi en fonction des résultats obtenus d'expériences similaires réalisées sur des préparations vasculaires par différents groupes de chercheurs

(Edvinsson et coll., 1984b; Han et Abel, 1987). Nous avons opté pour un prétraitement de 5 minutes pendant lequel les tissus ont été mis en présence d'une concentration de 30 nM de NPY avant de générer des courbes dose-réponse avec divers agonistes. Des études réalisées avec des préparations d'artère fémorale de lapin avaient permis de démontrer qu'il n'existait aucune différence significative dans les valeurs des réponses maximales obtenues avec la NE en présence de NPY si le peptide avait été ajouté entre 1 et 10 minutes avant l'administration de l'amine (Edvinsson et coll., 1984b). Une diminution de l'effet potentiateur du NPY n'était évidente qu'après environ 30 minutes de prétraitement (Edvinsson et coll., 1984b). Des observations similaires avaient été rapportées en utilisant comme tissus cibles l'artère mésentérique de chat et les veines mésentériques de lapin et de l'homme (Hanko et coll., 1986). De ces travaux, il devenait évident que l'effet potentiateur du NPY sur les vaisseaux sanguins était généralement de longue durée et probablement médié par des récepteurs présentant une forte affinité pour le peptide (Hanko et coll., 1986). A cet effet, il a été rapporté que ce n'est qu'après une période de prétraitement d'environ 60 minutes que les réponses maximales, obtenues avec la NE en présence de NPY, redeviennent équivalentes à celles des tissus contrôles (Edvinsson et coll., 1984b). A savoir si cet effet potentiateur du NPY sur les contractions induites par la NE est relié à la concentration du peptide n'a pas encore été réellement démontré. Il a été rapporté que chez les artères gastro-épiploïques et l'artère de l'oreille de lapin, l'effet potentiateur du NPY pourrait effectivement être associé à la concentration de peptide présente dans les bains (Edvinsson et coll., 1984b; Hanko et coll., 1986). Cependant, ces observations demeurent pour le moment très discutables car l'échelle des concentrations utilisées

a toujours été très faible; les doses ayant varié majoritairement entre 1 et 50 nM de NPY (Edvinsson et coll., 1984b; Hanks et coll., 1986; Han et Abel, 1987).

A l'aide du protocole décrit ci-haut nous avons observé que, chez la trachée de cobaye, le NPY a altéré aussi l'activité biologique de divers agonistes naturels tant relaxants que contractiles. Par opposition à son effet potentiateur sur les vaisseaux sanguins, l'action du NPY sur les voies aériennes s'est révélée plutôt comme étant inhibitrice. Ainsi le peptide a réduit l'amplitude des relaxations induites par la NE et le VIP de même que celles des contractions induites par la 5-HT et la SP. Aucune différence significative n'a pu être décelée concernant le degré d'inhibition (40%) généré par le NPY sur les relaxations induites par la NE tant sur le tonus de base des préparations que sur les tissus pré-contractés au KCl (Tableau # 4). Cependant, le peptide s'est avéré moins efficace à réduire les relaxations induites par le VIP lorsque les tissus avaient été préalablement contractés au KCl, que lorsque les mesures avaient été réalisées sur le tonus de base des préparations. Nous ne voyons pas d'explication évidente à ce phénomène. On peut remarquer une certaine analogie entre l'effet du VIP et du NPY puisque l'effet relaxant du VIP est beaucoup plus grand (du moins lorsqu'exprimé en gramme de relaxation) lorsque mesuré sur le tonus de base que sur la tension résultant de l'addition d'une solution riche en K^+ . Il est possible que ce résultat apparent soit dû au fait que sur les préparations pré-contractées au KCl, la relaxation maximale n'aie pas été atteinte avec les concentrations de VIP utilisées; ce qui aurait comme conséquence de masquer l'effet véritable du NPY. Nous doutons cependant que ce soit véritablement le cas car les résultats obtenus suggèrent que le NPY augmenterait les relaxations induites par le VIP sur ces préparations. Pour éclaircir ce phénomène, d'autres

expériences seraient nécessaires.

L'addition de 30 nM de NPY a également eu comme effet d'inhiber de façon significative (respectivement de 30% et de 38%) les réponses contractiles induites par la 5-HT et la SP (Tableau # 5). Ceci confirme en quelque sorte cette caractéristique généralisée et non sélective de l'effet "modulateur" du NPY tel que déjà rapporté chez les vaisseaux sanguins (Wahlestedt et coll., 1987). Nous avons vu précédemment que le NPY augmente légèrement les contractions induites par les agonistes contractiles sur les artères coronaires de lapin mais bloque aussi fortement les relaxations causées par les agents vasodilatateurs sur cette même préparation (Edvinsson et coll., 1984b; Han et Abel, 1987). Chez les voies aériennes de cobaye, le NPY ne semble pas agir de façon préférentielle envers les agents relaxants ou contractiles car l'amplitude de la réponse de son action "modulatrice" fut sensiblement de même grandeur (environ 35%) pour les deux groupes d'agents myotropes.

Nos résultats suggèrent que le NPY pourrait faire preuve d'une certaine sélectivité car ce ne sont pas les réponses de tous les agents myotropes qui sont touchées. Sur certaines préparations de vaisseaux sanguins, le NPY augmente la réponse à l'histamine et à l'acétylcholine en plus de celle de la NE (Edvinsson et coll., 1984b; Han et Abel, 1987). Par opposition, le neuropeptide n'a pas altéré de façon significative l'amplitude des contractions induites par le carbachol et l'histamine sur nos préparations (Tableau # 5).

Au niveau des vaisseaux sanguins, le mécanisme d'action responsable de cet effet potentiateur du NPY n'a pas encore été réellement élucidé. Plusieurs hypothèses ont été émises mais chacune découlant de résultats obtenus avec des

préparations vasculaires différentes et dans des conditions expérimentales variables. Par exemple, il a été rapporté que, sur l'artère centrale de l'oreille de lapin, la potentiation causée par le NPY sur les contractions induites par des stimulations électriques était dépendante de la présence de l'endothélium (Daly et Hieble, 1987). Comme la réponse vasculaire de certains agonistes dont la SP et l'acétylcholine, a déjà été démontrée comme souvent dépendante de la présence de l'endothélium, ces auteurs ont spéculé que l'augmentation des réponses vasculaires à la NE par le NPY pourrait aussi être dépendante de la présence des cellules endothéliales. L'hypothèse apparaît quelque peu alléchante mais malheureusement elle est demeurée sans suite. Comme deuxième possibilité, il a été proposé que in vitro le NPY induirait une légère augmentation dans la tension de base des muscles lisses vasculaires, ce qui faciliterait l'effet contractile des agonistes subséquentement testés. Cette hypothèse repose sur le fait que la nifédipine (qui abolit l'activité contractile directe du NPY) inhibe l'augmentation de la réponse à la NE par le NPY sur l'artère fémorale de rat (Pernow, 1988). Comme la précédente, cette hypothèse n'a trouvé aucun preneur puisque des résultats opposés (absence d'effet de la nifédipine) ont été obtenus sur d'autres types de préparations vasculaires (Pernow, 1988; Wahlestedt et coll., 1985). Comme troisième possibilité, il a été suggéré que le NPY pourrait stimuler le catabolisme du phosphatidyl inositol pour induire une contraction et pourrait aussi activer la protéine kinase C pour inhiber les relaxations médiés par l'AMPc. Cette idée repose sur des observations récentes impliquant ces seconds messagers dans le contrôle du tonus vasculaires (Wahlestedt et coll., 1987; Lundberg et coll., 1988). Cependant, dans le contexte qui nous concerne, cette possibilité demeure spéculative car aucune évidence n'a encore été fournie démontrant une activation de ces seconds

messagers par le NPY.

Un travail beaucoup plus concret a été présenté par Wahlestedt et coll. en 1985. Ces auteurs ont d'abord montré que sur l'artère fémorale de lapin, l'augmentation de la réponse à la NE par le NPY s'exerçait au niveau post-jonctionnel. C'est-à-dire que le NPY n'exerce aucun effet inhibiteur sur les mécanismes de recapture de la NE, ni ne stimule une libération additionnelle de NE au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques. De plus, ils ont démontré que cet effet potentiateur du NPY était dépendant de la présence du Na^+ et de la mobilisation du Ca^{++} séquestré intracellulairement mais non de la présence du Ca^{++} extracellulaire. Ces données pourraient donc suggérer que l'effet potentiateur du NPY découlerait d'une action inhibitrice sur l'activité de la pompe électrogénique $\text{Na}^+\text{-K}^+$. A cet effet, il a déjà été rapporté que sur les muscles vasculaires, l'inhibition de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+$ cause une dépolarisation des membranes (Abel et coll., 1981), une contraction (Aarlus et coll., 1983), une augmentation dans l'amplitude des réponses contractiles induites par divers agonistes (Abel et coll., 1981) et une inhibition des relaxations induites par les agents vasodilatateurs (Foley, 1984). Ces effets étant similaires à ceux causés par le NPY (Han et Abel, 1987), l'hypothèse d'une inhibition de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+$ a donc été suggérée à plusieurs reprises comme mécanisme possiblement responsable de l'effet du peptide (Han et Abel, 1987; Hakanson et coll., 1986). A savoir si cette explication peut être applicable à tous les vaisseaux sanguins (compte tenu des effets variables que le NPY peut y exercer) demeure par contre à être prouvée.

Comme nous venons de le voir, malgré la multitude de travaux déjà réalisés à l'aide de différentes préparations vasculaires, les données concernant cet effet

potentiateur du NPY sont encore incomplètes. Il en est de même en ce qui a trait à l'élucidation du mécanisme responsable de l'effet inhibiteur du peptide sur les voies aériennes des mammifères. L'observation rapportée dans notre étude est tout à fait originale et nous n'avons pas encore poussé nos investigations vers l'élucidation du mécanisme sous jacent à cet effet du peptide. Pour le moment, le mécanisme responsable de cet effet du NPY demeure sujet à de multiples interprétations. Par exemple, on pourrait spéculer tout comme il a été fait chez les vaisseaux sanguins que le NPY pourrait interférer avec la mobilisation du Ca^{++} , la translocation du Ca^{++} intracellulaire ou avec la génération d'un second messenger cellulaire commun aux divers agonistes. D'autres possibilités seraient que le NPY supprime aussi l'excitabilité des cellules musculaires lisses en altérant l'influx ionique ou qu'il entraîne la libération de médiateurs à partir des cellules épithéliales de la trachée de cobaye.

Mis à part la participation possible des PGs, nous n'avons pour le moment aucune donnée concrète qui puisse nous servir comme unité de base pour l'élaboration d'une hypothèse précise. Par contre une analyse plus détaillée de nos résultats peut nous permettre de faire un certain tri parmi les hypothèses citées plus haut. Par exemple, il apparaît fort probable que l'effet inhibiteur du NPY soit la résultante d'une interférence directe avec la mobilisation du Ca^{++} . S'il en était le cas, nous aurions dû observer une diminution des réponses induites par l'histamine et le carbachol tout comme il en a été pour les contractions générées par la SP et la 5-HT. Une altération ponctuelle de la génération d'un second messenger cellulaire commun apparaît aussi irréaliste car les agonistes utilisés lors de nos expériences sont reconnus pour induire leur réponse via des mécanismes différents. Chez les

voies aériennes de cobaye, les réponses contractiles générées par la SP, l'histamine et la 5-HT impliquent une stimulation du métabolisme des phosphoinositides et l'activation de la phospholipase C tandis que celles générées par le carbachol dérivent initialement de l'ouverture des canaux potassiques. Les agonistes bronchodilatateurs tels que la NE et le VIP stimulent quant à eux l'adénylate cyclase, ce qui résulte en une augmentation de l'AMPc. De plus, chacun de ces agonistes agit via des récepteurs qui lui sont propres (Watson et Abbot, 1990). Cependant, malgré ce que nous venons de mentionner au sujet des différences en ce qui concerne les seconds messagers intracellulaires, une possibilité serait que le NPY bloque un certain médiateur qui intervient entre le moment où l'agoniste se lie à son récepteur et l'activation ou la génération comme telle du second messager. C'est à dire que le NPY pourrait altérer d'une façon quelconque l'activité des sous unités β , γ et/ou α des protéines G (guanine). D'une façon générale, au moment de l'interaction d'une drogue avec son récepteur, il y a activation de la protéine G. Ceci résulte en une dissociation de la sous unité α et du complexe $\beta\gamma$. La sous unité α étant ainsi libérée, elle active des enzymes effectrices (dont l'adénylate cyclase) lesquelles médient les réponses cellulaires. C'est la ré-association du complexe $\beta\gamma$ (en présence de phosphate inositol) qui généralement vient bloquer l'activation de la sous unité α (Gilman, 1987; Cereione et coll., 1986). Puisque la sous unité α est unique pour chaque protéine G tandis que les sous unités $\beta\gamma$ sont fortement homologues et fonctionnellement interchangeable (Gilman, 1987) on pourrait suggérer que le NPY libère un excès de complexe $\beta\gamma$ suivant son interaction avec ses récepteurs. Ces sous unités $\beta\gamma$, étant libres à la surface interne des membranes cellulaires, auraient la capacité de lier les sous unités α libérées lors

de stimulation par divers agonistes. Cette hypothèse est audacieuse certes, mais des évidences d'un tel rôle modulateur des sous unités $\beta\gamma$ ont déjà été fournis pour des cellules sanguines isolées de souris (Katada et coll., 1984).

Comme autre possibilité, l'on pourrait suggérer que le NPY aurait aussi la propriété d'inhiber l'activité de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+$ des cellules musculaires lisses des voies aériennes. On sait que l'induction d'une hyperpolarisation chez les muscles lisses des bronches et de la trachée a comme répercussion de diminuer l'amplitude des réponses tant des agents contractiles que relaxants (Dorothy et McCaig, 1986). C'est en fait ce que l'on observe au cours de notre étude sauf que le NPY n'a pas altéré l'amplitude des contractions induites par le carbachol et l'histamine. Dans ce cas bien particulier, il y aurait donc lieu de reprendre des études en présence de ouabaine, substance bien connue pour bloquer l'activité de cette pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Overbeck et coll., 1976).

Enfin, comme dernière alternative, l'on pourrait spéculer que le NPY exerce son effet inhibiteur via les cellules épithéliales de la trachée. Là aussi, il est reconnu que la réponse des voies aériennes à divers agents contractiles dont l'histamine, l'acétylcholine, la SP et la 5-HT augmente en absence de cellules épithéliales (Barnes et coll., 1985; Flavahan et coll., 1985; Hay et coll., 1985). La réponse d'agonistes relaxants est aussi altérée sur ce type de préparations mais les résultats ne sont pas constants (Flavahan et coll., 1985). Donc ce nouveau paramètre (cellules épithéliales) devrait aussi être pris en considération dans les travaux futurs.

Peu de données sont disponibles en ce qui concerne la signification physiologique de la présence du NPY au niveau du système respiratoire. En 1984, Lundberg et coll. (1984b) ont rapporté que le NPY n'affectait ni l'excitation

cholinergique ni l'inhibition non-adrénergique induite par une stimulation électrique sur la trachée de cobaye. Ils ont conclu que ce peptide n'avait aucun rôle particulier sur le maintien ou le contrôle du tonus de base des voies aériennes chez le cobaye. Récemment, en utilisant une technique beaucoup plus raffinée, Stretton et Barnes (1988) ont rapporté que sur ce type de préparation tissulaire, le NPY réduisait la composante cholinergique résultant d'une stimulation électrique via une action directe sur les récepteurs situés sur les terminaisons nerveuses cholinergiques. De plus, ils ont montré que le NPY n'altérait en aucune façon les contractions induites par l'acétylcholine sur la trachée de cobaye. Ceci donc conférait au NPY un rôle sur le maintien du calibre des voies aériennes mais via une action pré-jonctionnelle. Ces observations ont été confirmées par Grundemar et coll. (1988) en utilisant une trachée de cobaye comme tissu cible et aussi confirmées par Matran et coll. (1989) sur les bronches de cobaye. De plus, ces derniers auteurs ont rapporté que le NPY n'exerçait aucun effet inhibiteur ou potentiateur sur les contractions induites par la neurokinine A mais que le peptide diminuait les contractions non-adrénergiques non-cholinergiques suivant une stimulation électrique. Ils ont donc suggéré que le NPY exerçait son effet inhibiteur strictement au niveau pré-jonctionnelle en inhibant à la fois la libération d'acétylcholine au niveau des terminaisons nerveuses cholinergiques et des neurotransmetteurs (neurokinines) libérés des terminaisons nerveuses sensibles (Matran et coll., 1989).

Nos résultats ont révélé que le NPY exerçait à la fois un effet contractile post-jonctionnel (bronchoconstriction de faible amplitude) et un effet inhibiteur post-jonctionnel (inhibition des réponses induites par plusieurs agents tant contractiles que relaxants) sur ces mêmes préparations. Donc, l'ensemble de ces données montre que

sur les voies aériennes de cobaye, le NPY exerce trois effets différents tout comme il a été rapporté pour les vaisseaux sanguins: 1) un effet pré-jonctionnel: une inhibition des contractions induites par des stimulations électriques, 2) un effet post-jonctionnel médié par la libération de PGs: une contraction et 3) un effet inhibiteur post-jonctionnel: une inhibition non sélective des réponses à divers agonistes. Après analyse de tous ces résultats, il apparaît que les effets post-jonctionnels du peptide seraient prédominants (du moins dans des conditions physiologiques normales) car pour induire un effet pré-jonctionnel, de plus fortes concentrations de NPY sont requises.

A savoir si le NPY pourrait être impliqué dans certains problèmes physiologiques au niveau du système respiratoire est une question qui sera probablement débattue d'ici peu. En effet, en 1988, Dahlof et coll. ont rapporté que le taux plasmatique de NPY est plus élevé (d'environ 40%) chez les patients souffrant d'asthme que chez les individus témoins. De plus, ils ont démontré que ce taux plasmatique de NPY augmentait de 2 à 3 fois en période de crise aiguë ou dans des situations de stress (Dahlof et coll., 1988). L'interprétation physiologique de ces observations n'a pas encore été amorcée. Or, il a été démontré depuis que les agonistes β_2 -adrénergiques utilisés couramment comme agents thérapeutiques chez les patients asthmatiques, entraînent la libération de NPY par les terminaisons nerveuses sympathiques via une interaction avec les récepteurs β -adrénergiques présents sur ces terminaisons (Dahlof, 1989). Puisque le NPY a comme propriété d'exercer différents effets (pré- et post-jonctionnels) sur les voies aériennes de cobaye (présente étude), il serait tentant de spéculer (du moins jusqu'à ce qu'une preuve soit apportée) que ce peptide pourrait possiblement être impliqué dans le

phénomène d'hyperréactivité bronchique rencontré chez les patients asthmatiques.

2. Effets du NPY et du PYY sur le côlon descendant de rat:

Nos résultats ont démontré que le NPY et le PYY affectent tous deux l'activité spontanée du muscle lisse longitudinal chez le côlon de rat (Figure # 7, 8). Deux effets majeurs ont été notés: 1) une augmentation de la fréquence des contractions phasiques et 2) une augmentation du tonus de base. Chacune des réponses induites par le NPY et le PYY fut différemment exprimée selon le segment de côlon utilisé. L'augmentation de l'activité phasique a été observée à la fois au niveau du côlon ascendant et du côlon transverse, tandis que l'effet contractile induit par les deux peptides fut principalement notée dans la deuxième moitié du gros intestin. De plus, les réponses contractiles au NPY et au PYY se sont avérées dépendantes de la concentration et ont été majoritairement exprimées par le côlon descendant de rat. Ces observations vont dans le même sens que celles rapportées par Hellstrom et coll. (1985). Ce dernier a démontré que chez le chat, le NPY et le PYY agissent tous deux comme puissants agents contractiles mais surtout au niveau de la portion distal du tractus gastro-intestinal. Suivant une infusion intraveineuse, les deux peptides induisent d'une façon dépendante de la dose, une augmentation du tonus rectal ainsi qu'une augmentation de la pression anale (Hellstrom et coll., 1985).

Cette sensibilité différente des divers segments du côlon au NPY et au PYY, telle qu'observée dans notre étude, est aussi compatible avec les actions régionales variables récemment rapportées pour le NPY au niveau de l'intestin grêle de rat (Krantis et coll., 1988). Ce peptide induit une contraction sur le duodénum, une

réponse biphasique (contraction et relaxation) sur le jéjunum et une relaxation sur l'iléon (Krantis et coll., 1988). Un tel phénomène ne semble pas être unique pour le NPY et le PYY mais apparaît plutôt comme une caractéristique commune de plusieurs autres substances endogènes actives présentes au niveau du côlon. Des effets différents de même que des effets régionaux spécifiques ont été rapportés pour l'angiotensine, la 5-HT et l'acide γ amino butyrique (Daniel, 1968; Krantis et Harding, 1987) au niveau de l'intestin grêle et ce chez diverses espèces de mammifères. Par exemple, Couture et coll. (1982) ont démontré que le muscle lisse longitudinal du côlon descendant de rat était plus sensible à la SP et aux enképhalines que celui du côlon ascendant. Donc, nos résultats confirment et fournissent des évidences additionnelles de l'hétérogénéité des réponses du muscle lisse le long du tractus gastro-intestinal.

Les augmentations de l'activité phasique et du tonus de base induites par le NPY et/ou le PYY au niveau de l'intestin de rat semblent être en contradiction avec les actions rapportées pour ces peptides chez d'autres espèces animales. Des études effectuées à l'aide du PYY ont montré que ce dernier inhibe in vivo la motricité du jéjunum chez le chat (Lundberg et Tatemoto, 1982b) et le chien (Suzuki et coll., 1983), de même que la motricité du côlon chez le chat (Lundberg et Tatemoto, 1982), le chien (Suzuki et coll., 1983) et l'homme (Lundberg et Tatemoto, 1982b; Saria et Beubler, 1985). En ce qui concerne le NPY, son implication dans la régulation des muscles lisses gastro-intestinaux est plus obscure. Par exemple, il a été rapporté que in vitro, le NPY n'exerce aucun effet direct sur le taenia coli, le jéjunum distal et l'iléon proximal de cobaye (Wahlestedt et Hakanson, 1986). Cependant, plusieurs autres groupes ont rapporté que le NPY exerce un effet

inhibiteur sur les muscles lisses de préparations isolées de l'intestin grêle et du côlon de cobaye (Allen et coll., 1987; Wiley et Owyany, 1987). De plus, une infusion intraartérielle de NPY chez le chat entraîne une inhibition de la motilité du côlon (Hellstrom et coll., 1985). Ces divergences de résultats indiquent que, selon des espèces animales, les neurotransmetteurs et les mécanismes impliqués dans le contrôle du tonus des muscles lisses du tractus gastro-intestinal sont probablement différents.

Les analyses pharmacologiques ont révélées que les réponses contractiles du NPY sont insensibles à la présence d'antagonistes pour les récepteurs α et β adrénergiques ni à un prétraitement avec l'indométacine, le méthysergide ou le diphenhydramine. Ceci exclu la NE, les prostaglandines, la sérotonine ou l'histamine comme médiateurs possiblement impliqués dans la réponse du peptide. Cependant, les contractions induites par le NPY ont été totalement abolies en présence de TTX ou d'atropine. Ces résultats suggèrent que les récepteurs pour le NPY sont absents sur les cellules musculaires au niveau du côlon descendant et que l'effet stimulateur du NPY est médié via une transmission cholinergique. A savoir si cet effet du NPY est pré- ou post-ganglionnaire demeure par contre à être déterminé.

A plusieurs reprises, il a été suggéré que le NPY et le PYY pourraient interagir avec un même sous type de récepteur pour générer leurs actions (Wahlestedt et coll., 1987). Selon nos résultats, il apparaît que les contractions induites par le PYY sur le côlon descendant de rat ne sont pas médiées par une libération d'acétylcholine par opposition à celles qui ont été observées pour le NPY. Les réponses générées par le PYY ont été abolies seulement par l'addition de TTX, suggérant ainsi que l'effet du peptide est médié via une stimulation nerveuse. Les

contractions causées par le PYY semblent donc impliquer la libération d'une substance non adrénergique et non cholinergique dont la nature reste à déterminer. Etant donné que les mécanismes d'action du NPY et du PYY se sont avérés différents sur cette préparation tissulaire, ceci nous permet d'énoncer que les deux peptides exercent leur action via des sites récepteurs différents. Cette démonstration indirecte de l'existence probable de récepteurs différents pour le NPY et le PYY est en accord avec des résultats déjà obtenus sur l'intestin grêle de rat. Sur cette préparation, il a été observé que le PYY induit une contraction alors que le NPY n'y exerce aucun effet moteur (Krantis et coll., 1988). De façon similaire, il a été observé qu'une infusion de PYY ralentit la vidange gastrique chez l'homme (Allen et coll., 1984b) alors qu'une infusion de NPY n'a aucun effet.

Finalement, nous avons comparé l'activité myotrope du NPY et du PYY à celle d'une multitude d'agents endogènes bien connus comme étant actifs sur cette préparation. En se basant sur l'amplitude maximale des contractions obtenues avec des agonistes, nos résultats ont révélé que les deux peptides tout comme la PGE_2 , le carbamylcholine et la 5-HT induisent une augmentation du tonus de base sur le côlon descendant de rat. Les valeurs des EC_{50} ont indiqué par contre que sur une base molaire, le NPY, le PYY et la PGE_2 sont de puissance équivalente tout en étant beaucoup plus puissants que le carbachol et la 5-HT pour induire une contraction sur ces tissus (Tableau # 6). Ces résultats suggèrent donc que les deux peptides sont impliqués dans la régulation du tonus musculaire chez le rat. L'importance physiologique ou pathologique de la présence de même que des effets pharmacologiques (Furness et coll., 1983; Lundberg et coll., 1982d, 1983; notre étude) de ces deux peptides n'a pas encore été réellement analysé. Récemment, il a

été rapporté que chez les patients souffrant de diarrhée (Adrian et coll., 1986) et chez ceux présentant des problèmes de réabsorption des graisses suivant une résection iléale (Adrian et coll., 1985b), les concentrations plasmatiques respectives de NPY et de PYY étaient anormalement élevées. Ceci pourrait donc suggérer que les deux peptides (NPY et PYY) pourraient avoir un ou des rôle (s) particulier (s) à jouer en ce qui concerne le contrôle du transit gastro-intestinal et la réabsorption des graisses et/ou des électrolytes.

3. Etude de structure activité du NPY.

De façon globale, les résultats de nos études de structure activité ont montré que les récepteurs du NPY étaient sensibles aux changements introduits dans la molécule mère (Tableau # 7). Par exemple, le retrait d'un seul acide aminé soit la Tyr¹ a résulté en une perte presque totale de l'activité biologique du NPY sur les voies aériennes de cobaye alors que cela n'a causé une perte que d'environ 2 fois dans la puissance du NPY sur le côlon de rat. Sur cette préparation, la courbe concentration-réponse au NPY(2-36) s'est avérée parallèle à celle du NPY mais la réponse obtenue avec le fragment fut 50% plus faible que celle du peptide naturel. Un raccourcissement plus grand de la molécule a résulté en la formation de peptides proportionnellement moins actifs et moins puissants que le NPY. Finalement, le fragment N-terminal (1-24) s'est avéré inactif sur les deux préparations. Dans l'ensemble, nos résultats supportent donc le concept que les groupements chimiques importants pour l'induction de l'effet biologique du NPY sont retrouvés dans la partie C-terminale de la molécule tandis que ceux responsables de l'affinité du peptide pour ses récepteurs seraient probablement localisés dans la portion N-

terminale (Donoso et coll., 1988; Rioux et coll., 1986; Danho et coll., 1988; Boublik et coll., 1989; Mackerell et coll., 1989).

Une analyse plus détaillée de toutes ces données révèle que malgré ce besoin apparent d'une séquence entière en acides aminés pour que le NPY puisse produire une activité biologique complète (Donoso et coll., 1988; Rioux et coll., 1986; Danho et coll., 1988; Boublik et coll., 1989; Mackerell et coll., 1989), les prérequis structuraux des récepteurs du NPY pour l'obtention de cette activité (i.e. même efficacité) semblent varier selon les essais biologiques utilisés et/ou l'origine des tissus. Par exemple, les résultats d'expériences similaires où l'on a mesuré in vitro l'effet cardiaque du NPY (Rioux et coll., 1986), l'effet inhibiteur du NPY sur le canal déférent de rat (Donoso et coll., 1988) ou le déplacement de NPY radioactif par le NPY ou des fragments plus courts (Quirion et coll., communication personnelle) ont montré que les fragments (2-36), (5-36), (11-36), (16-36) et même (19-36) se comportaient comme des agonistes complets quoique moins puissants que le NPY. Dans nos essais biologiques, nous avons observé que ces mêmes fragments agissent comme des agonistes partiels sur le côlon de rat et qu'ils sont pratiquement dépourvus d'activité biologique sur les voies aériennes de cobaye. Par opposition à l'hypothèse émise par Donoso et coll (1988), nous pouvons donc suggérer que les récepteurs pour le NPY, tant périphériques que centraux, ne sont pas identiques mais pourraient être sensibles à des arrangements moléculaires spécifiques et peut être même sélectifs en plus d'être sensibles à la molécule naturelle. Des données accumulées lors de nos travaux, en plus de celles découlant d'autres études (Linch et coll., 1989; Potter et coll., 1989; Walker et Miller. 1988) où différents fragments et analogues du NPY ont été utilisés supportent une telle possibilité (voir plus loin).

Des études réalisées pour mettre en lumière la structure tridimensionnelle de la molécule de NPY ont révélé que ce peptide aurait une conformation moléculaire de type "épingle à cheveux" (MacKerell et coll., 1989) (Figure # 19). Cette structure serait assurée entre autre par un rapprochement des noyaux aromatiques de la tyrosine en position 27 et de la tyrosine en position 1. Il a été proposé que le retrait de cette tyrosine en position N-terminale aurait comme conséquence de déstabiliser la structure moléculaire du peptide rendant ainsi plus imparfaite son interaction avec les récepteurs et moins efficace son effet biologique (Boublik et coll., 1989). Nos résultats abondent quelque peu en ce sens car chez les deux essais biologiques, une baisse d'activité a été observée avec le fragment (2-36). Des observations similaires ont été rapportées par Jolicoeur et coll. (communication personnelle, 1990) lors de la mesure de différents paramètres neuro-comportementaux. Cependant tel que nous l'avons rapporté dans nos deux essais biologiques, les conséquences du retrait de cette tyrosine 1 n'ont pas été les mêmes. Par ailleurs, d'autres études effectuées chez le rat indiquent que les effets moteurs du NPY (la catalepsie) ont été diminués suite à la seule élimination du premier acide aminé tandis que les effets du peptide sur l'ingestion de nourriture et sur la température corporelle n'ont pas été altérés et ce même suite à l'élimination de plus de 10 acides aminés de la portion N-terminale de la molécule (Jolicoeur et coll., 1990: communication personnelle; Boublik et coll., 1989). En somme, ces résultats suggèrent fortement que les prérequis structuraux des récepteurs du NPY pour la reconnaissance du ligand et l'expression complète de l'activité biologique du peptide peuvent varier d'un tissu cible à un autre.

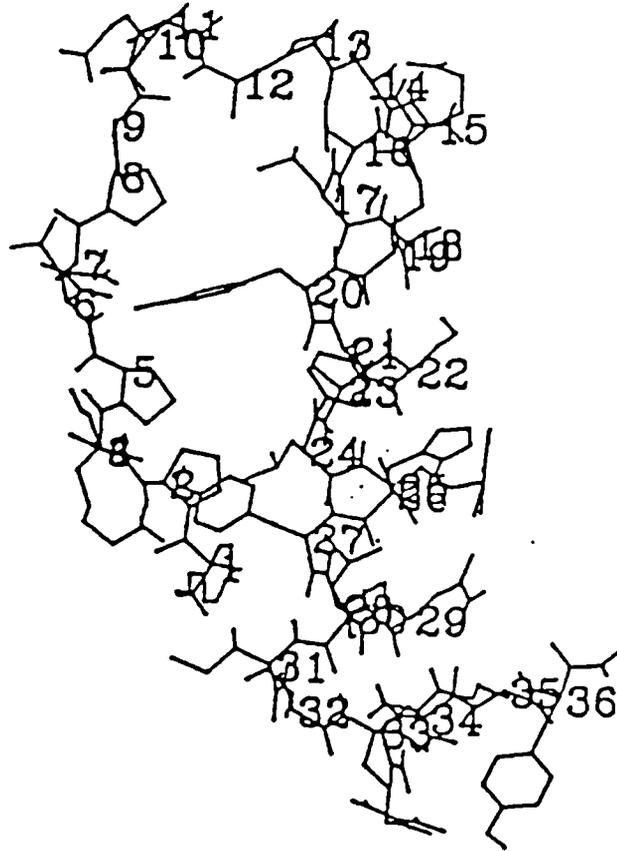


FIGURE # 19: Modèle hypothétique de la conformation tridimensionnelle du NPY.

Des évidences additionnelles à cette présence de plusieurs types de récepteurs pour le NPY ont été fournis avec les analogues de synthèse évalués au cours de notre étude. Une attention particulière a été donnée au doublet de tyrosine en position 20 et 21 car il a été démontré que pour des peptides tels la neurotensine (Quirion et coll., 1980), la SP (Regoli et coll., 1987), l'angiotensine II (Regoli et coll., 1974) et la bradykinine (Regoli et Barabé. 1980), les résidus tyrosines sont souvent très importants pour la reconnaissance et la liaison des molécules à leurs récepteurs. De façon générale, nous avons vu que des substitutions des tyrosines en position 20 et 21 par une cyclohexylalanine (Cha), un tryptophane (Trp), une D-Tyrosine (D-Tyr), un D-Tryptophane (D-Trp) ou par l'addition d'un groupement méthyl sur l'anneau benzyl (Tyr-O-Me) résultent en la formation d'analogues qui présentent d'importantes différences tant en ce qui regarde la puissance que l'activité biologique des peptides (Tableau # 8). Par exemple, la substitution de la Tyr²¹ par chacun des groupements mentionnés ci-haut a résulté en la formation d'analogues pratiquement inactifs au niveau des voies aériennes de cobaye. Cependant, malgré une légère perte de puissance (entre 2 et 10 fois) lorsque comparé à celle du NPY, ces analogues ont présenté une forte activité biologique sur le côlon de rat. La substitution de la Tyr²⁰ par les mêmes composés a résulté en la formation d'analogues qui se sont avérés similairement moins puissants (entre 2 et 10 fois) que le NPY sur les deux types de préparations tissulaires. C'est donc dire que la Tyr²¹ serait très importante pour que le NPY puisse induire une réponse biologique sur les voies aériennes de cobaye mais non sur le côlon de rat. Une particularité similaire a déjà été rapporté par le groupe de Krstenansky en 1989. Ces derniers ont démontré à l'aide d'une série d'analogues que chez les préparations membranaires

de cerveau de souris, la tyrosine en position 20 serait préférentiellement nécessaire pour assurer la liaison de la molécule à ses récepteurs. Sur le canal déférent de rat, de même que sur les membranes cellulaires obtenues de cerveau de rat, il a été démontré (Martel et coll., 1990, communication personnelle) que ni l'une ni l'autre des deux tyrosines n'est réellement essentielle pour le maintien de l'affinité ou l'activité biologique du peptide. Ces données confirment donc l'existence possible de récepteurs hétérogènes pour le NPY.

Nous pouvons remarquer que les divergences de résultats obtenus à l'aide de ces analogues du NPY semblent être directement reliées avec la conformation tridimensionnelle du peptide. Par exemple, lorsque l'on remplace de la Tyr²⁰ ou Tyr²¹ par une phénylalanine (Phe²⁰ ou Phe²¹), on conserve toujours le noyau aromatique mais on enlève le groupement hydrophobe du noyau benzyl. Ceci a pour conséquence de rendre le peptide plus hydrophobe mais n'altère pas comme telle son activité biologique sur les deux préparations tissulaires. Cependant, si l'on remplace la tyrosine par un tryptophane (Trp²⁰ ou Trp²¹), on perd ce noyau aromatique. La molécule devient alors plus hydrophobe et on remarque au niveau des deux tissus une perte d'activité biologique et de puissance et ceci plus particulièrement au niveau des voies aériennes de cobaye où le Trp²¹ est inactif. Le tryptophane est une molécule de plus gros volume que la tyrosine. On peut donc imaginer un réarrangement de la configuration tridimensionnelle du peptide qui aurait comme conséquence de réduire l'affinité du peptide à se lier à son récepteur. Le même phénomène est observé si l'on remplace la tyrosine par une cyclohexylalanine (Cha) ou encore par une Tyr-O-Me, qui sont deux molécules plus volumineuses que la tyrosine.

Un autre exemple serait l'importance de l'orientation spatiale de l'acide aminé utilisé lors des substitutions. Si l'on remplace la Tyr²⁰ ou Tyr²¹ par une D-Tyrosine ou encore par un D-Tryptophane au lieu d'un L-Tryptophane (voir plus haut), on note également des diminutions autant de la puissance que dans l'activité du peptide mais qui ne sont pas identique pour les deux préparations. Ceci confirme encore une fois, la grande sensibilité des différents sous types des récepteurs pour le NPY au moindre changements apportés à la molécule mère. Un autre point intéressant fut observé lors de la substitution des deux noyaux aromatiques par une chaîne latérale aliphatique (Leu^{20,21}). Cet analogue s'est révélé plus actif que le peptide mère sur les deux préparations biologiques utilisés. Il est intéressant de souligner que cet analogue est le seul à induire une forte augmentation de l'activité biologique relative (A.R. = 2.6) et de la puissance du peptide sur les voies aériennes de cobaye. Ceci suggère qu'une diminution de la rigidité de la molécule de NPY pourrait favoriser une augmentation de l'affinité du peptide pour certaines sous classes de récepteurs. En accord avec cette observation, le développement d'une molécule plus rigide (cyclo^{2,31}[Asp², Lys³¹]) a eu comme conséquence de diminuer sa capacité de liaison à ses récepteurs.

Finalement, dans le but de freiner la dégradation enzymatique possible du peptide, nous avons testé un dernier analogue où le lien peptidique entre la tyrosine en position 1 et la proline en position 2 fut modifiée (Tyr¹-ψ-CH₂NH-Pro²). Ceci a entraîné une perte presque totale de l'activité biologique du peptide sur les voies aériennes de cobaye mais non sur le côlon descendant de rat. Ces résultats suggèrent que la moindre altération de la molécule de NPY peut perturber l'activité et/ou l'affinité du peptide pour ses récepteurs; supportant ainsi le concept de

l'hétérogénéité des récepteurs pour le NPY (Chang et coll., 1985, 1988; Martel et coll., 1990: communication personnelle; Potter et coll., 1989; Linch et coll., 1989; Walker et Miller. 1988).

Une autre observation intéressante dérivant de notre étude fut la propriété agoniste assez particulière offerte par le fragment (13-36). Sur le côlon de rat, ce fragment a induit une réponse contractile similaire (Tableau # 7) à celle générée par le NPY. Chez les voies aériennes de cobaye, ce fragment s'est avéré environ 100 fois moins puissant que le NPY mais plus de deux fois plus actif que le peptide naturel (Figure # 13). De plus, le mécanisme d'action par lequel le fragment (13-36) induit son action s'est avéré différent de celui responsable de la contraction causée par le NPY. Ce ne fut pas tout à fait le même cas sur le côlon de rat où les deux peptides (NPY et le fragment 13-36) ont généré leur réponse via un même mécanisme d'action. De nos expériences, il n'est pas possible de déterminer si les deux types de récepteurs pour le NPY et le fragment (13-36) représentent deux différentes espèces moléculaires de récepteurs ou seulement deux états différents d'un même récepteur. Cependant, le fait qu'une même action (contraction) causée par deux peptides intimement reliés par leur structure peuvent être médié différemment chez les voies aériennes de cobaye mais non sur le côlon de rat suggèrent que les récepteurs du NPY existent probablement sous plusieurs variantes plutôt que sous deux types de récepteurs distincts tels que proposés par le groupe de Wahlestedt en 1986.

L'observation qu'un fragment du NPY puisse présenter une action différente du peptide ne constitue pas une première en soi. Boublik et coll. (1989) ont à cet effet rapporté chez le rat, que les fragments (17-36) et (18-38) causent tous deux

une hypotension contrairement à l'effet hypertenseur induit par le NPY. Martel et coll. (1990; communication personnelle) ont aussi observé que le fragment du NPY (1-24 CONH₂) est capable d'augmenter l'effet induit par une stimulation électrique sur le canal déférent de rat. Les mécanismes par lesquels les fragments NPY (17-36), le NPY (18-36) et le NPY (1-24 CONH₂) exercent des effets opposés au peptide naturel n'ont pas encore été élucidés. Cependant, ces observations suggèrent encore une fois l'existence de plusieurs sous classes de récepteurs pour le NPY.

Il a été suggéré que les sites de liaisons pour le NPY se présentent sous deux formes soit Y₁ et Y₂. Ce qui a permis de distinguer les deux types de récepteurs fut la capacité de liaison et l'activité biologique du fragment en position C-terminal du NPY (13-36), lequel se lie seulement au récepteur Y₂. Les récepteurs Y₂ du NPY sont pré-synaptiques alors que les récepteurs Y₁ sont post-synaptiques (Wahlestedt et coll., 1985; 1987).

Au niveau du système nerveux central, on retrouve majoritairement des récepteurs de type Y₂ (Danho et coll., 1988). Au niveau du système nerveux périphérique, les deux sous classes de récepteurs pour le NPY ont été retrouvées. Par exemple, sur le canal déférent de rat, les récepteurs pour le NPY seraient de type Y₂ alors que sur les vaisseaux sanguins (la veine iléaque de cobaye et l'artère fémorale de lapin), ils seraient de types Y₁ (Wahlestedt et coll., 1987).

Selon la classification proposée par Wahlestedt et coll. (1987), les récepteurs pour le NPY présents sur le côlon de rat seraient de type Y₂. Ils sont d'abord pré-jonctionnels et reconnaissent le fragment C-terminal 13-36. Sur la trachée de cobaye, la bronchoconstriction induite par le NPY résulterait de l'activité d'un récepteur post-jonctionnel. Cependant, à l'encontre des critères déjà établis (Wahlestedt et

coll., 1987), la préparation est demeurée sensible au fragment (13-36). De plus, l'intensité de la contraction induite par le fragment (13-36) et le mécanisme responsable de cette réponse diffèrent de ceux induits par le NPY. Cette disparité de réponse entre les deux composés ne nous permet pas de conclure quant à la sous classe de récepteurs présents sur les voies aériennes de cobaye selon la classification proposée par Wahlestedt en 1987.

CONCLUSION

- 1- Le NPY induit une contraction dépendante de la dose sur les voies aériennes de cobaye. Cet effet nécessite l'activation de la cyclooxygénase.
- 2- Les réponses de la NE, du VIP, de la 5-HT et de la SP sont inhibées en présence de NPY sur les voies aériennes de cobaye. Le mécanisme sous jacent à cet effet est inconnu. Il serait possible que cet effet soit médié par les PGs tant contractiles que les relaxantes.
- 3- Le NPY et le PYY induisent tous deux une contraction dépendante de la dose sur le côlon descendant de rat.
- 4- Le NPY et le PYY agissent via des mécanismes d'actions différents pour induire leurs effets sur le côlon descendant de rat.
- 5- Le NPY et le PYY agissent via des récepteurs différents sur les préparations isolées de côlon de rat.
- 6- Les études de structure activité ont démontré l'importance des deux portions N- et C- terminales du NPY. Les résidus retrouvés dans la portion C-terminale de la molécule de NPY contiendraient le message pour le déclenchement de la réponse biologique alors que ceux retrouvés dans la portion N-terminale seraient possiblement responsables de l'affinité de la molécule.
- 7- Le fragment C-terminal du NPY (le NPY 13-36) induit une contraction par un mécanisme différent que celui du NPY sur les voies aériennes de cobaye mais non sur le côlon descendant de rat.

8- Selon les critères d'une première classification suggérée par Wahlestedt en 1987, les récepteurs pour le NPY présents chez le côlon de rat seraient de type Y_2 . Cependant, les résultats obtenus à l'aide du NPY sur les voies aériennes de cobaye ne nous permettent pas de conclure au sujet des sous types de récepteurs activés sur ces préparations.

9- L'ensemble des résultats obtenus des études de structure activité réalisées à l'aide d'analogues et de fragments synthétiques nous permet de suggérer que les prérequis structuraux des récepteurs pour le NPY diffèrent d'un tissu à un autre; ce qui supporte le concept de l'hétérogénéité des récepteurs pour le NPY.

REMERCIEMENTS

Je remercie le directeur de mes travaux de maîtrise, le Dr Alain Cadieux, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le remercie pour ses précieux conseils, sa patience et pour la confiance qu'il m'a témoigné tout le long de la réalisation de ce projet.

Je remercie également:

le Dr Alain Fournier et le Dr Serge St-Pierre pour leur grande collaboration,

mes collègues de laboratoire: M^{lle} Chantal Lanoue, M^{lle} Janice Albert et M François Pomerleau, qui par leurs conseils et leur amitié m'ont encouragé dans la poursuite de ce travail,

M Marc Lauzière pour sa précieuse aide en informatique,

et je tiens plus particulièrement à remercier M^{lle} Daniela Jukic et M^{lle} Dalila Ghadfa pour leur amitié et leur support moral,

finalement, je tiens sincèrement à remercier les membres du jury qui ont accepté de reviser ce mémoire de maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

- AARLUS, L.L., SHEPHERD, J.T., TYCE, G.M., VERBEUREN, T.J. et VANHOUTTE, P.M. Contraction of canine vascular smooth muscle cells caused by ouabain are due to release of norepinephrine from adrenergic nerve endings. *Circ. Res.* 51: 501-507 (1983).
- ABEL, P.W. URQUILLA, P.R., GOTO, K., WESTFALL, D.P., ROBINSON, R.L. et FLEMING, W.W. Chronic reserpine treatment alters sensitivity and membrane potential of the rabbit saphenous artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217: 430-439 (1981).
- ADRIAN, T.E., ALLEN, J.M., BLOOM, S.R., GHATEI, M.A., ROSSOR, M.N., ROBERTS, G.W., CROW, T.J., TATEMOTO, K. et POLAK, J.M. Neuropeptide Y distribution in the human brain. *Nature* 306: 584-586 (1983).
- ADRIAN, T.E., FERRI, G.L., BACARESE-HAMILTON, A.J., FUSSEL, H.S., POLAK, J.M. et BLOOM, S.R. Human distribution and release of a putative new gut hormone; peptide YY. *Gastroenterology* 89: 1070-1077 (1985a).
- ADRIAN, T.E., SAVAGE, A.P., BACARESE-HAMILTON, A.J., FUESSL, H.S., BESTERMAN, H.S. et BLOOM, S.R. Increased peptide YY release in patients with ileal resection. *Abstract. Gut.* 26: 550 (1985b).
- ADRIAN, T.E., SAVAGE, A.P., BACARESE-HAMILTON, A.J., WOLFE, K., BESTERMAN, H.S. et BLOOM, S.R. Peptide YY abnormalities in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 90: 379-384 (1986).
- ALLEN, J.M. et BLOOM, S.R. Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. *Neurochem. Int.* 8: 1-8 (1986).

- ALLEN, J.M. BIRCHAM, P.M., BLOOM, S.R. et EDWARDS, A.V. Release of Neuropeptide Y in response to splanchnic nerve stimulation in the conscious calf. *J. Physiol. (London)* 357: 401-408 (1984a).
- ALLEN, Y.S., CROW, T.J. et POLAK, J.M. Co-storage of a novel peptide, neuropeptide Y, with catecholamines in rat locus ceruleus. *J. R. Micros Soc.* 18: 77 (1983).
- ALLEN, J.M., ADRIAN, T.E., TATEMOTO, K., POLAK, J.M., HUGHES, J. et BLOOM, S.R. Two novel related peptides, neuropeptide Y (NPY) and peptide YY (PYY), inhibit the contraction of electrically stimulated mouse vas deferens. *Neuropeptides* 3: 33-41 (1982).
- ALLEN, J.M., FITZPATRICK, M.L., YEATS, J.C., DARCY, K., ADRIAN, T.E. et BLOOM, S.R. Effects of peptide YY and neuropeptide Y on gastric emptying in man. *Digestion* 30: 255-262 (1984b).
- ALLEN, J.M., HUGHES, J. et BLOOM, S.R. Presence, distribution and pharmacological effects of neuropeptide Y in mammalian gastrointestinal tract. *Digest. Dis. Sci.* 32: 506-512 (1987).
- ALLEN, J.M., RAINE, A.E.G., LEDINGHAM, J.G.G. et BLOOM, S.R. Neuropeptide Y: a novel renal peptide with vasoconstrictor and natriuretic activity. *Clin. Sci.* 68: 373-377 (1985a).
- ARIENS, E.J. Théories sur les récepteurs et relations entre structure et activité dans le domaine des substances cholinergiques et anti-cholinergiques. Dans actualités pharmacologiques, 22^e série, eds. Cheymol, J., Boissier, J.R., Lechat, P., Masson et compagnie, Paris, 1964, pp 261-292.

- ARIENS, E.J., SIMONIS, A.M. et VAN ROSSUM, J.M. Dans E.J. Ariens ed. Molecular Pharmacology, vol. 1 Academic press, New York, 119-286 1964.
- ARIENS, E.J., VAN ROSSUM, J.M. et SIMONIS, A.M. Affinity, intrinsic activity and drug interactions. *Pharmacol. Rev.* 9: 218-236 (1957).
- BARNES. P.J., CUSS. F.M. et PALMER. J.B. The effect of airways epithelium on smooth muscle contractility in bovine trachea. *Br. J. Pharmacol.* 86; 692. (1985).
- BEAL, M.F. et MARTIN, J.B. Neuropeptides in neurological disease. *Ann. Neurol.* 20: 547-567 (1986).
- BEAL, M.F., CHATTHA, G.K. et MARTIN, J.B. A comparison of regional somatostatin and neuropeptide Y distribution in rat striatum and brain. *Brain Res.* 377: 240-245 (1986).
- BÉAL, M.F., CHATTHA, G.K. et MARTIN J.B. A comparison of somatostatin and neuropeptide Y distribution in monkey brain. *Brain Res.* 405: 213-219 (1987).
- BOUBLIK, J.H., SCOTT, N.A., BROWN, M.R. et RIVER, J.E. Synthesis and hypertensive activity of neuropeptide Y fragments and analogs with modified N- or C- termini or D- substitution. *J. Med. Chem.* 32: 597-601 (1989).
- CERIONE, R.A., GIERSCHIK, P., STANISZEWSKI, C., BENOVIC, J.L., CODINA, J., SOMERS, R., BIRNBAUMER, L., SPIEGEL, A.M., LEFKOWITZ, R.J. et CARON, M.G. Functional differences in β γ complexes of transducin and the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *Biochemistry* 26: 1485-1491 (1987).
- CEREIONE, R.A., STANIDZEWSKI, C., GIERSCHIK, P., CODINA, J., SOMERS, R., BIRNBAUMER, L., SPIEGEL, A.M., CARON, M.G., et LEFKOWITZ, R.J.

- Mechanism of guanine nucleotide regulatory protein-mediated inhibition of adenylate cyclase - studies with isolated subunits of transducin in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.* 261: 9514-9520 (1986).
- CHAN-PALAY, V. Somatostatin immunoreactive neurons in the human hippocampus and cortex shown by immunogold silver intensification on vibratom sections : coexistence with neuropeptide Y neurons and effects in Alzheimer-type dementia. *J. Comp. Neurol.* 206: 201-223 (1987).
- CHANG, R.S.L., LOTTI, V.J et CHEN, T.B. Specific [³H] propionylneuropeptide Y (NPY) binding in rabbit aortic membranes : comparison with binding in rat and biological responses in rat vas deferens. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 151: 1213-1219 (1988).
- CHANG, R.S.L., LOTTI, V.J., CHEN, T.B., CERINO, D.J. et KLING, P.J. Neuropeptide Y (NPY) binding sites in rat brain labeled with ¹²⁵I-Bolton-Hunter NPY: Comparative potencies of various polypeptides on brain NPY binding and biological responses in rat vas deferens. *Life Sci.* 37: 2111-2122 (1985).
- CHRONWALL, B.M., CHASE, T.N. et O'DONOHUE, T.L. Coexistence of neuropeptide Y and somatostatin in rat and human cortical and rat hypothalamic neurons. *Neurosci. Lett.* 52: 213-217 (1984).
- CONSTANTINE. J.W. The spirally cut tracheal strip preparation. *J. Pharmacol.* 17: 384-385 (1965).
- CORDER, R., LOWRY, P.M., WILKINSON, S.J. et RAMAGE, A.G. Comparison of the haemodynamic actions of neuropeptide Y, angiotensin II and noradrenaline in anaesthetized cats. *Eur. J. Pharmacol.* 121: 25-30 (1986).

- COUTURE, R., MIZRAHI, J., CARANIKAS, S., REGOLI, D. Acute effects of peptides on the rat colon. *Pharmacology* 24: 230-242 (1982).
- DAHLOF, P. L. Modulatory interactions of neuropeptide Y (NPY) on sympathetic neurotransmission. *Acta Physiol. Scand.* 586: 1-85 (1989).
- DAHLOF, C., DAHLOF, P. et LUNDBERG, J.M. Neuropeptide Y (NPY): enhancement of blood pressure increase upon α -adrenoreceptor activation and direct pressor effects in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* 109: 289-292 (1985a).
- DAHLOF, C., DAHLOF, P., LUNDBERG, J.M. et STROMBOM, U. Elevated plasma concentration of neuropeptide Y and low level of circulating adrenaline in elderly asthmatics during rest and acute severe asthma. *Pulm. Pharmacol.* 1: 3-6 (1988).
- DAHLOF, C., DAHLOF, P., TATEMOTO, K. et LUNDBERG, J.M. Neuropeptide Y (NPY) reduces field stimulation-evoked release of noradrenaline and enhances force of contraction in the rat portal vein. *N. S. Arch. Pharmacol.* 328: 327-330 (1985b).
- DALY, R. N. et HIEBLE, J. P. Neuropeptide Y modulates adrenergic neurotransmission by an endothelium dependent mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 138: 445-446 (1987).
- DANGER, J.M., TONON, M.C., LAMACZ, M., MARTEL, J.C., ST-PIERRE, S., PELLETIER, G. et VAUDRY, H. Melanotropin release inhibiting activity of neuropeptide Y: structure-activity relationships. *Life Sci.* 40: 1875-1880 (1987).
- DANHO, W., TRISCARI, J., VINCENT, G., NAKAJIMA, T., TAYLOR, J. et KAISER, E.T. Synthesis and biological evaluation of pNPY fragments. *Int. J.*

- Peptide Protein Res. 32: 496-505 (1988).
- DANIEL, E.E. Pharmacology of the gastrointestinal tract. In: Handbook of physiology, sect. 6, vol. 4. Alimentary canal. Am. Physiol. Soc. Washington D.C., pp 2267-2324 (1968).
- DeQUIDT, M.E., RICHARDSON, P.J. et EMSON, P.C. Subcellular distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in guinea-pig neocortex. Brain Res. 335: 354-359 (1985).
- DONOSO, V., SILVA, M., ST-PIERRE, S., et HUIDOBRO-TORO, J.M. Neuropeptide Y (NPY) an endogenous presynaptic modulator of adrenergic neurotransmission in the rat vas deferens : structural and functional studies. Peptides 9: 545-553 (1988).
- DOROTHY. J. et McCAIG, D.J. Electrophysiology of neuroeffector transmission in the isolated, innervated trachea of the guinea pig. Br. J. Pharmacol. 89: 793-801 (1986).
- DRUMHELLER, A., RIVEST, R., MICHAUD, J.N., St-PIERRE et JOLICOEUR, F.B. The profile of neurobehavioral effects produced by neuropeptide Y, Soc. Neurosci. (Abstract) 14: 287-no 114- 114.10 (1988)
- EDVINSSON, L., EKBALD, F., HAKANSON, R., et WAHLESTEDT, C. Neuropeptide Y potentiates the effect of various vasoconstrictor agents on rabbit blood vessels. Br. J. Pharmacol. 83: 519-525 (1984b).
- EDVINSSON, L., EMSON, P.C., McCULLOCH, J., TATEMOTO, K., et UDDMAN, R. Neuropeptide Y: cerebrovascular innervation and vasomotor effects in the cat. Neurosci. Lett. 43: 79-84 (1983).

- EDVINSSON, L., EMSON, P.C. McCULLOCH, J., TATEMOTO, K., et UDDMAN, R. Neuropeptide Y: immunocytochemical localization to and effects upon feline pial arteries and veins in vitro and in situ. *Acta Physiol. Scand.* 122: 155-163 (1984a).
- EDVINSSON, L, HAKANSON, R., STEEN, S., SUNDLER, F. UDDMAN, R. et WAHLESTEDT, C. Innervation of human omental arteries and veins and vasomotor responses to noradrenaline, neuropeptide Y, substance P and vasoactive intestinal peptide. *Regul. Pept.* 12: 67-79 (1985).
- EKBLAD, E., EDVINSSON, L., WAHLESTEDT, C., UDDMAN, R., HAKANSSON, R. et SUNDLER, F. Neuropeptide Y co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers. *Regul. Pept.* 8: 225-235 (1984a).
- EKBLAD, E., HAKANSON, R. et SUNDLER, F. VIP and PHI coexist with an NPY-like peptide in intramural neurons of the small intestine. *Regul. Pept.* 10: 47-55 (1984c).
- EKBLAD, E., WAHLESTEDT, C., EKELUND, M., HAKANSON, R., et SUNDLER, F. Neuropeptide Y in the gut and pancreas : distribution and possible vasomotor function. *Front. Horm. Res.* 12: 85-90 (1984b).
- FLAVAHAN. M.A., AARLUS. L.L., RIMELE. T.J. et VANHOUTTE. P.M. Respiratory epithelium inhibits bronchial smooth muscle tone. *J. Appl. Physiol.* 58: 834-838 (1985).
- FOLEY, D.H. Diminished arterial smooth muscle response to adenosine during Na-K pump inhibition. *Pflugers Arch.* 400: 88-95 (1984).

- FRIED, G., LUNDBERG, J.M. et THEODORSSON-NORHEIM, E. Subcellular storage and axonal transport of neuropeptide Y (NPY) in relation to catecholamines in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 125: 145-154 (1985a).
- FRIED, G., TERENIUES, L., HOKFELT, T et GOLDSTEIN, M. Evidence for differential localization of noradrenaline and neuropeptide Y (NPY) in storage vesicles isolated from rat vas deferent. *J. Neurosci.* 5: 450-458 (1985b).
- FURCHGOTT, R. F. et ZAWADZKI. J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376 (1980).
- FURNESS, J.B., COSTA, M. et KEAST, J.R. Choline acteyltransferase and peptide immunoreactivity of submucous neurons in the small intestine of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 237: 329-336 (1984).
- FURNESS, J.B. COSTA, M., EMSON, P.C., HAKANSON, R., MOGHIMZADEH, E., SUNDLER, F., TAYLOR, I.L. et CHANCE, R.E. Distribution pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide - Y - and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea-pig digestive tract. *Cell Tissue Res.* 234: 71-92 (1983).
- FUXE, K., AGNATI, L.F., HARFSTRAND, A., ZINI, I., TATEMOTO, K., PICH, E.M., HOKFELT, T., MUTT, V. et TERENIUS, L. Central administration of neuropeptide Y induces hypotension bradypnea and EEG synchronization in the rat. *Acta Physiol. Scand.* 118: 189-192 (1983).
- GHATEI. M.A., SPRINGALL. D.R., RICHARDS, I.M., OOTSTVEEN, J.A., GRIFFIN, R.L., CADIEUX, A., POLAK, J.M. et BLOOM. S.R. Regulation peptides in the respiratory tract of Macaca Fascicularis. *Thorax* 42: 431-439

(1987).

- GILMAN, A.G. G proteins : transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649 (1987).
- GLOVER, W.E. Increased sensitivity of rabbit ear artery to noradrenaline following perivascular nerve stimulation may be response to neuropeptide Y release as a cotransmitter. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 12: 227-231 (1985).
- GRAY, T.S. et MORLEY, J.E. Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Life Sci.* 38: 389-401 (1986a).
- GRAY, T.S. et MORLEY, J.E. NPY distribution and functions (Review). *Life Sci.* 38: 389-401 (1986b).
- GRUNDEMAR. L. WIDMARK. E. WALDECK. B. et HAKANSON. R. Neuropeptide Y: prejunctional inhibition of vagally induced contractions in the trachea. *Regul. Pept.* 23: 309-313 (1988).
- GRUNDITZ, T., HAKANSON, R., RERUP, C., SUNDLER, F. et UDDMAN, R. Neuropeptide Y in the thyroid gland : Neuronal localization and enhancement of stimulated thyroid hormone secretion. *Endocrinology* 115: 1537-1542 (1984).
- GU, J., POLAK, J.M., ADRIEN, T.E., ALLEN, J.M., TATEMOTO, K. et BLOOM S.R. Neuropeptide tyrosine (NPY)- a major cardiac neuropeptide. *Lancet I*: 1008-1010 (1983).
- GU. J., POLAK, J.M., ALLEN, J.M., HUANG, W.M., SHEPPARD, M.N., TATEMOTO, K., et BLOOM S.R. High concentrations of a novel peptide, NPY, in the innervation of mouse and rat heart. *J. Histochem. Cytochem.* 32:

- 467-472 (1984).
- GUSTAFSON, E.L. et MOORE, R.Y. Noradrenaline and neuropeptide Y innervation of the rat hypothalamus are differentially affected by 6-hydroxydopamine. *Neurosci. Lett.* 83: 53-58 (1987).
- HAKANSON. R., WAHLESTED. C., EKBLAD. E., EDVINSSON. L. et SUNDLER. F. Neuropeptide Y: coexistence with noradrenaline, functional implications. *Prog. Brain Res.* 68: 279-287 (1986).
- HAN, C. et ABEL, P.W. Neuropeptide Y potentiates contraction and inhibits relaxation of rabbit coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9: 675-681 (1987).
- HANKO, J.H., TORNEBRANDT, K., HARDEBO, J.E., KAHRSTROM, J., NOVIN, A., et OWMAN, CH. Neuropeptide Y induces and modulates vasoconstriction in intracranial and peripheral vessels of animals and man. *J. Auton. Pharmacol.* 6: 117-124 (1986).
- HARFSTRAND, A. Intraventricular administration of neuropeptide Y (NPY) induces hypotension bradycardia and bradypnoea in the awake unrestrained male rats. Counteraction by NPY, induced feeding behaviour. *Acta Physiol. Scand.* 128: 121-123 (1986).
- HAY. D.W.P., ROBINSON. V.A., FLEMMING. W.W. et FEDAN. J.S. Role of the epithelium (Epi) in contractile responses of guinea-pig isolated trachea (GPT). *Fed. Proc.* 44: 506 (1985).
- HELLSTROM, P.M., OLERUP, O. et TATEMOTO, K. Neuropeptide Y may mediate effects of sympathetic nerve stimulation on colonic motility and blood flow in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 124: 613-624 (1985).

- HENDREY, S.H.C., JONES, E.C. et EMSON, P.C. Morphology, distribution and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *J. Neurosci.* 4: 2497-2517 (1984).
- HOKFELT, T., LUNDBERG, J.M. TATEMOTO, K., MUTT, V., TERENIUS., L. POLAK, J.M. BLOOM, S.R., SASEK, C., ELDE, R. et GOLDSTEIN, M. NPY and FMRF amide neuropeptide-like immunoreactivities in catecholamine neurons of rat medullo oblongata. *Acta Physiol. Scand.* 117: 315-318 (1983).
- HUBEL. K. A. et RENQUIST. K. S. Neuropeptide Y selectively increase chloride absorption. *Gastroenterology* 88: 1423 (Abstract) (1985).
- JANSEN, I., UDDMAN, R., HOCHERMAN, M., EKMAN, R., JENSEN, K., OLESSEN, J., STIERNHOLM, P. et EDVINSSON, L. Localization and effects of neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide, substance P and calcitonin gene-related peptide in human temporal arteries. *Ann. Neurol.* 20: 496-501 (1986).
- KATADA, F., BOKOCH, G.M., SMIGEL, M.D., UI, M., GILMAN, A.G. The inhibitory guanine nucleotide - binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and the inhibition of adenylate cyclase in S 49 lymphoma cyc-and wild types membranes. *J. Biol. Chem.* 259: 3586-3595 (1984).
- KRANTIS, A. et HARDING, R.K. Gaba-related actions in isolated in vitro preparations of the rat small intestine. *Eur. J. Pharmacol.* 141: 117-123 (1987).
- KRANTIS, A., POTVIN, W. et HARDING, R.K. Peptide YY (PYY) stimulates intrinsic enteric motor neurons in the rat small intestine. *N. S Arch.*

- Pharmacol. 338: 287-292 (1988).
- LABURTHE, M., CHENUT, B., ROUYER-FESSARD, C., TATEMOTO, K., COUVINEAU, A., SERVIN, A., AMIRANOFF, B. Interaction of peptide YY with rat intestinal epithelial plasma membranes: binding of the radioiodinated peptide. *Endocrinology* 118: 1910-1917 (1986).
- LARHAMMAR, D., ERICSSON, A. et PERSSON, H. Structure and expression of the rat neuropeptide Y gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 2068-2072 (1987).
- LARSSON, L.I., SUNDLER, F., HAKANSON, R. Immunohistochemical localization of human pancreatic polypeptide (hPP) to a population of islet cells. *Cell Tissue Res.* 156: 167-171 (1975).
- LARSSON, L.I., SUNDLER, F., HAKANSON, R. Pancreatic polypeptide: a postulated new hormone - identification of its cellular storage site by light and electromicroscopic immunocytochemistry. *Diabetologia* 12: 211-226 (1976).
- LEBLANC, G.G., TRIMMER, B.A., et LANDIS, S.C. Neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat cranial parasympathetic neurons : coexistence with vasoactive intestinal peptide and choline acetyltransferase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 3511-3515 (1987).
- LEYS, K., SCHACHTER, M. et SEVER, P. Autoradiographic localization of NPY receptors in rabbit kidney: comparison with rat, guinea-pig and human. *Eur. J. Pharmacol.* 134: 233-237 (1987).
- LIN, T. M. et CHANCE, R. M. Candidate hormones of the gut. Bovine pancreatic polypeptide (BPP) and avian pancreatic polypeptide APP). *Gastroenterology* 67: 737-736 (1974).

- LULICH, K.M., MITCELL, H.W. et SPARROW, M.P. The cat lung strip as an in vitro preparation of peripheral airways: a comparison of α -adrenoceptor agonists, autacoids and anaphylactic challenge on the lung strip and trachea. *Br. J. Pharmacol.* 58: 71-79 (1976).
- LUNDBERG, J.M. et STARNE, L. Neuropeptide Y (NPY) depresses the secretion of ^3H -noradrenaline and the contractile response evoked by field stimulation, in rat vas deferens. *Acta. Physiol. Scand.* 120: 477-479 (1984).
- LUNDBERG, J.M. et TATEMOTO, K. Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade. *Acta. Physiol. Scand.* 116: 393-402 (1982a).
- LUNDBERG, J.M. et TATEMOTO, K. Vascular effects of the peptides PYY and PHI: Comparison with APP and VIP. *Eur. J. Pharmacol.* 83: 143-146 (1982).
- LUNDBERG, J.M., ANGGARD, A., PERNOW, J., et HOKFELT, T. Neuropeptide Y, substance P- and VIP - immunoreactive nerves in cat spleen in relation to autonomic vascular and volume control. *Cell Tissue Res.* 239: 9-18 (1985a).
- LUNDBERG, J.M. HEMSEN, A., LARSSON, O., RUDEHILL, A., SARIA, A. et FREDHOLM, B.B. Neuropeptide Y receptor in pig spleen: binding characteristics, reduction of cyclic AMP formation and calcium antagonist inhibition of vasoconstriction. *Eur. J. Pharmacol.* 145: 21-29 (1988).
- LUNDBERG, J.M., HUA, X.Y., et FRANCO-CERECEDA, A. Effects of neuropeptide Y on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deferens and urinary bladder of the guinea-pig. *Acta Physiol. Scand.* 121: 325-332 (1984b).

- LUNDBERG, J.M., MARTINSSON, A., HEMSEN, A., THEODORSSON-NORHEIM, E., SVEDENHAG, J., EKBLUM, B. et HJEMDAHL, P. Corelease of neuropeptide Y and catecholamines during physical exercise in man. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 133: 30-36 (1985).
- LUNDBERG, J.M., PERNOW, J., TATEMOTO, K. et DAHLOF, C. Pre- and post-junctional effects of NPY on sympathetic control of rat femoral artery. *Acta Physiol. Scand.*, 123: 511-513 (1985b).
- LUNDBERG, J.M., TATEMOTO, K. TERENIUS, L., HELLSTROM, P.M., MUTT, V., HOKFELT, T., et HAMBERGER, B. Localization of peptide YY (PYY) in gastrointestinal endocrine cells and effects on intestinal blood flow and mobility. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79: 4471-4475 (1982d).
- LUNDBERG, J.M., TERENIUS, L., HOKFELT, T., et GOLDSTEIN, M. High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci. Lett.* 42: 167-172 (1983).
- LUNDBERG, J.M., TERENIUS, L., HOKFELT, T., MARTLING, C.R., TATEMOTO, K., MUTT, V., POLAK, J.M., BLOOM, S.R. et GOLDSTEIN, M. Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol. Scand.* 116: 477-480 (1982b).
- LUNDBERG, J.M., TERENIUS, L., HOKFELT, T. et TATEMOTO, K. In "Catecholamines: Neuropharmacology and Central Nervous System. Theoretical Aspects". (E. Usdin et al., Eds). Liss, New York, (1984a) pp 179-189.
- LUSCHER, T.F. et VAN HOUTTE, P.M. Endothelium-dependent responses to platelets and serotonin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 8

- (supl. II): 55- 60 (1986).
- LINCH, D.R., WALTER, M.W., MILLER, R.J. et SNYDER, S.H. Neuropeptide Y receptor binding sites in rat brain: Differential autoradiographic localization with [¹²⁵I] peptide YY and [¹²⁵I] neuropeptide Y imply receptor heterogeneity. *J. Neurosci.* 9: 2607-2619 (1989).
- MABE, Y., TATEMOTO, K. et HUIBODRO-TORO, P. Neuropeptide Y-induced pressor responses : activation of a non-adrenergic mechanism, potentiation by reserpine and blockade by nifedipine. *Eur. J. Pharmacol.* 116: 33-39 (1985).
- MACCARRONE, C. et JARROTT, R. Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter (critique). *Neurochem. Int.* 8: 13-22 (1986).
- MACKERELL, A.D., HEMSEN, A., LACROIX, J.S. et LUNDBERG, J.M. Analysis of structure-function relationships of neuropeptide Y using molecular dynamics simulations and pharmacological activity and binding measurements. *Regul. Pept.* 25: 295-313 (1989).
- MARTEL, J.C., ST-PIERRE, S. et QUIRION, R. Neuropeptide Y receptors in rat brain: autoradiographic localization. *Peptides* 7: 55-60 (1986).
- MARTEL, J.C., ST-PIERRE, S., BEDARD, P.J., QUIRION, R. Comparison of [¹²⁵I] Bolton-Hunter neuropeptide Y binding sites in the forebrain of various mammalian species. *Brain Research.* 419: 403-407 (1987).
- MATRAN. R., MARTLING. C.R. et LUNDBERG. J.M. Inhibition of cholinergic and non-adrenergic, non-cholinergic bronchoconstriction in the guinea pig mediated by neuropeptide Y and α_2 -adrenoceptors and opiate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 163: 15-23 (1989).

- McDONALD, J.K. NPY and related substances (Review) - Crit. Rev. Neurobiol. 4: 97-135 (1988).
- McDONALD, J.K. LUMPKIN, M.D., SAMSON, W.K. et McCANN, S.M. Neuropeptide Y effects secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized rats. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 561-564 (1985).
- MINTH, C.D., BLOOM, S.R., POLAK, J.M. et DIXON, J.E. Cloning, characterization and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81: 4577-4581 (1984).
- NAKAJIMA, T., YASHIMA, Y. et NAKAMURA, K. Quantitative autoradiographic localization of neuropeptide Y receptors in the rat lower brainstem. Brain Res. 380: 144-150 (1986).
- NEILD, T.O. Actions of neuropeptide Y on innervated and denervated rat tail arteries. J. Physiol. (London) 386: 19-30 (1987).
- O'DONOHUE, T.L., CHRONWALL, B.M., PRUSS, R.M., MEZEY, E., KISS, J.Z., EIDEN, L.E., MASSARI, V.J. TESSELS, R.E., PICKEL, V.M., DIMAGGIO, D.A., HOTCHKISS, A.J., CROWLEY, W.R., et ZUKOWSKA-GROJEC, Z. NPY and PYY neuronal and endocrine systems (Review). Peptides 6: 755-768 (1985).
- OHASHI, I. et JACOBOWITZ, D.M. The effects of pancreatic polypeptides and neuropeptide Y on the vas deferens. Peptides 4: 381-386 (1983).
- OVERBECK, H. W., PAMNANI, M. B., AKERA, T., BRODY, T. M. et HADDY, F. Y. Depressed function of a ouabain-sensitive sodium-potassium pump in blood vessels from renal hypertensive dogs. Circ. Res. 38: 48-52 (1976).

- PARROTT, R.F., HEAVENS, R.P. et BALDWIN, B.A. Stimulation of feeding in the satiated pig by intracerebroventricular injection of neuropeptide Y. *Physiol. Behaviour* 36: 523-525 (1986).
- PATTERSON, R. et ARBOR. A.M. The tracheal strip: observations on the response of tracheal muscle. *J. Allergy*. 3: 165-172 (1958).
- PERNOW, J. Co-release and functional interactions of neuropeptide Y and noradrenaline in peripheral sympathetic vascular control. *Acta. Physiol. Scand. suppl.* (568), 1-56 (1988).
- PERNOW, J. et LUNDBERG, J.M. Neuropeptide Y induces potent contraction of arterial vascular smooth muscle via an endothelium-independent mechanism. *Acta Physiol. Scand.* 134: 157-158 (1988).
- PETTY, M.A., DIETRICH, R. et LANG, R.E. The cardiovascular effects of neuropeptide Y. *Clin. Exp. Hypertens. Part. A. Theory Pract* 6: 1889-1892 (1984).
- PICCONE. M., LITZLI. H., KRUPIN. T., STONE. R. A., DAVIS. M. et WAX. M.B. Effects of neuropeptide Y on the isolated rabbit iris dilatatory muscle. *Invest. Ophthalmol. Vi. Sci.* 29: 330-332 (1988).
- POLAK, J.M. et BLOOM, S.R. Regulatory peptides the distribution of two novel newly discovered peptides : PHI and NPY. *Peptides* 5: 79-89 (1984).
- POTTER, E.K. Neuropeptide Y as an autonomic neurotransmitter. *Pharmacol. Ther.* 37: 251-274 (1988).
- POTTER, E.K., MITCHELL, L., Mc CLOSKEY, M.J.D., TSENG, A., GOODMAN, A.E., SHINE, J. et McCLOSKEY, D.I. Pre- and postjunctional actions of neuropeptide Y and related peptides. *Regul. Pept.* 25: 167-177 (1989).

- QUIRION, R., REGOLI, D., RIOUX, F. et ST-PIERRE, S. The stimulatory effects of neurotensin and related peptides in rat stomach strips and guinea pig atria. *Br. J. Pharmacol.* 68: 83-91 (1980).
- REGOLI, D. et BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32: 1-46 (1980).
- REGOLI, D., PARK, W.K. et RIOUX, F. Pharmacology of angiotensin. *Pharmacol. Rev.* 26: 69-123 (1974).
- REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S. et D'ORLEAN-JUSTE, P. Recent developments in neurokinin pharmacology. *Life Sci.* 40: 100-117 (1987).
- REYNOLDS, E.E. et YOKOTA, S. Neuropeptide Y receptor - effector coupling mechanisms in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 151: 919-925 (1988).
- RIOUX, F., BACHELARD, H., MARTEL, J.C. et ST-PIERRE, S. The vasoconstrictor effect of neuropeptide Y and related peptides in the guinea-pig isolated heart. *Peptides* 7: 27-31 (1986).
- SARIA, A. et BEUBLER, E. Neuropeptide Y (NPY) and peptide YY (PYY) inhibits prostaglandin E₂-induced intestinal fluid and electrolyte secretion in rat jejunum in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 119: 47-52 (1985).
- SARIA, A., THEODORSSON-NORHEIM, E. et LUNDBERG, J.M. Evidence for specific neuropeptide Y-binding sites in the rat brain synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 107: 105-107 (1984).
- SCHWARTZ, T.W., SHEIKH, S. P. et O'HARE, M. T. Receptors on pheochromocytoma cells for two members of the PP-fold family-NPY and-PP. *FEBS Lett.* 225: 209-214 (1987).

- SHEPPARD, M.N., POLAK, J.M. ALLEN, J.M. et BLOOM, S.R. Neuropeptide tyrosine (NPY): a newly discovered peptide is present in the mammalian respiratory tract. *Thorax* 39: 326-330 (1984).
- SILLARD, R., ABERBERTH, P., MUTT, V. et JORNVALL, H. Sheep neuropeptide Y. A third structural type of highly conserved peptide. *FEBS Lett.* 258: 263-266 (1989).
- STANLEY, B.G. et LEIBOWITZ, S.F. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus : a powerful stimulant of feeding behaviour. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82: 3940-3943 (1985).
- STRETTON, C.D. et BARNES, P.J. Modulation of cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea by neuropeptide Y. *Br. J. Pharmacol.* 93: 672-678 (1988).
- SUNDLER, F., HAKANSON, R., EKBLAD, E., UDDMAN, R. et WAHLESTEDT, C. Neuropeptide Y in the peripheral adrenergic and enteric nervous systems. *Int. Rev. Cytol.* 102: 243-269 (1988).
- SUNDLER, F., MOGHIMZADEH, E., HAKANSON, R., EKELUND, M. et EMSON, P. Nerve fibers in the gut and pancreas of the rat displaying neuropeptide Y immunoreactivity. *Cell Tissue Res.* 230: 487-493 (1983).
- SUZUKI, T., NAKAYA, M., ITOH, Z., TATEMOTO, K. et MUTT, V. Inhibition of interdigestive contractile activity in the stomach by peptide YY in Heidenhain pouch dogs. *Gastroenterology.* 85: 114-121 (1983).
- TATEMOTO, K. Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79: 5485-5489 (1982).
- TATEMOTO, K. et MUTT, V. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 285:

- 417-418 (1980).
- TAYLOR, I.L. Distribution and release of peptide YY in dog measured by specific radioimmunoassay. *Gastroenterology* 88: 731-737 (1985).
- UDDMAN, R., SUNDLER, F. et EMSON, P. Occurrence and distribution of neuropeptide Y immunoreactive nerves in the respiratory tract and middle ear. *Cell Tissue Res.* 237: 321-327 (1984).
- UDDMAN, R., EKBLAD, E., EDVINSSON, L., HAKANSON, R. et SUNDLER, f. Neuropeptide Y-like immunoreactivity in perivascular nerve fibers of the guinea-pig. *Regul. Pept.* 10: 243-257 (1985).
- UNDEN, A., TATEMOTO, K., MUTT., V. et BARTFAI, T. Neuropeptide Y receptor in the brain. *Eur. J. Biochem.* 145: 525-530 (1984).
- WAHLESTEDT, C. et HAKANSON, R. Effects of neuropeptide Y (NPY) on the sympathetic neuroeffector junction - can pre-, post- junctional receptors be distinguished? *Med. Biol.* 64: 85-88 (1986).
- WAHLESTEDT, C., YANAIHARA, N. et HAKANSSON, R. Evidence for pre-and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul. Pept.* 13: 307-318 (1986).
- WAHLESTEDT, C., EDVINSSON, L., EKBLAD, E. et HAKANSON, R. Neuropeptide Y potentiates noradrenaline-evoked vasoconstriction - mode of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234: 735-741 (1985).
- WAHLESTEDT, C., EDVINSSON, L., EKBLAD, E. et HAKANSON, R. Effects of neuropeptide Y at sympathetic neuroeffector junctions: existence of Y1- and Y2-receptors -neuronal messengers in vascular function. A. Nobin, C. Owman and B. Arneklo-Nobin (Eds) (1987), pp. 231-242.

- WALKER, M.W. et MILLER, R.J. ^{125}I -Neuropeptide Y and ^{125}I -Peptide YY bind to multiple receptor sites in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34: 779-792 (1988).
- WATSON, S et ABBOT, A. Receptor nomenclature supplement. *TIPS.* 8: 1-30 (1990).
- WILEY, J. et OWYANY, C. Neuropeptide Y inhibits cholinergic transmission in the isolated guinea pig colon: mediation through alpha-adrenergic receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 2047-2051 (1987).