

SÉBASTIEN LÉVESQUE

**CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES  
NUCLÉOSIDES TRIPHOSPHATES DIPHOSPHO-  
HYDROLASES (NTPDASES) ET FONCTIONS DE LA  
NTPDASE1 DANS LE MACROPHAGE MURIN**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en Microbiologie-Immunologie  
pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2010

## Résumé

Les nucléotides sont des molécules organiques essentielles à la vie qui participent à diverses fonctions des organismes vivants comprenant le stockage de l'information génétique (ADN), sa transcription (ARN<sub>m</sub>), sa traduction (ARN<sub>r</sub>, ARN<sub>t</sub>) en protéine et la régulation de cette traduction (miARN) ainsi qu'au contrôle de l'activité de certaines protéines comme les protéines kinases (ATP) et au stockage de l'énergie chimique (ATP, GTP). Les nucléotides peuvent aussi être relâchés dans le milieu extracellulaire et servir de signaux autocrines et paracrines en activant des récepteurs P2 spécifiques. Leur concentration est contrôlée par des ecto-nucléotidases qui hydrolysent les nucléotides en nucléosides. Ces enzymes peuvent ainsi influencer l'activation des récepteurs P2.

Dans cette thèse, j'introduirai d'abord de façon globale la signalisation par les nucléotides, les nucléosides et les molécules qui contiennent des nucléotides (c'est-à-dire NAD, FAD, Np<sub>n</sub>N) et décris ensuite de façon plus spécifique l'importance de cette signalisation dans le processus inflammatoire. Par la suite, je présenterai le travail que j'ai entrepris afin de mieux comprendre le rôle joué par les ecto-nucléotidases en approfondissant la caractérisation biochimique des nucléosides triphosphates diphosphohydrolases (NTPDases) et en analysant le rôle de l'une d'entre elles, la NTPDase1, dans le macrophage murin. Ensuite, je présenterai la caractérisation d'une nouvelle ecto-nucléotidase, la NTPDase8 (chapitre 2), et la comparaison des propriétés biochimiques des quatre NTPDases humaines et murines présentes au niveau de la membrane plasmique soit les NTPDase1, 2, 3 et 8 (Chapitre 3). Ces enzymes peuvent contrôler la concentration des différents agonistes des récepteurs P2 de façon fine et distincte. Au chapitre 4, je présenterai la caractérisation de l'ARL 67156, un inhibiteur potentiel de la NTPDase1. Parmi les différentes ecto-nucléotidases hydrolysant l'ATP extracellulaire, cette molécule inhibe de façon compétitive les NTPDase1 et NTPDase3 ainsi que la nucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (NPP1). Finalement, je montrerai que la NTPDase1 est la principale ecto-nucléotidase des macrophages murins où elle contrôle l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> et les fonctions qui lui sont associées telles que la mort induite par l'ATP, l'ouverture d'un pore et la relâche d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18, deux cytokines précoces de l'inflammation.



## Abstract

Life without nucleotides is impossible to imagine as these molecules play essential roles in living cells including the storage (DNA) and transmission (mRNA) of the genetic information and its translation into protein (rRNA, tRNA). Nucleotides also participate in the modulation of protein translation (miRNA), the control of protein activity (ATP, protein kinases) and serve as a source of chemical energy (ATP, GTP). In addition, nucleotides can be released in the extracellular compartment where they can act as autocrine and paracrine signals by activating specific P2 receptors. Ecto-nucleotidases can hydrolyze nucleotides into nucleosides and thereby participate in the control of nucleotide signaling.

This work introduces the complexity of extracellular nucleotides signaling, and molecules containing a nucleotide moiety (i.e. NAD, FAD,  $Np_nN$ ), with a specific focus on this signaling in inflammation. Then it presents the work I undertook to characterize the biochemical properties of NTPDases and to understand the role played by one such ecto-nucleotidases, NTPDase1, in murine peritoneal macrophages. In chapter 2, I present the cloning and characterization of a novel ecto-nucleotidase that we named nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8 (NTPDase8). In chapter 3, I show the comparison of biochemical properties of the four plasma membrane bound NTPDases including this new enzyme (NTPDase1, 2, 3 and 8). We found that these enzymes allowed a distinct control of nucleotide concentration and suggested that it provide a sophisticated regulation of P2 and adenosine receptors signaling. In chapter 4, I characterized the specificity of ARL 67156, a commercial inhibitor of ecto-ATPase. Among all the different ecto-nucleotidase hydrolyzing extracellular ATP, ARL 67156 proved to be a competitive inhibitor of NTPDase1, NTPDase3 and nucleoside pyrophosphatases/phosphodiesterase-1 (NPP1). Finally, I show in chapter 5 that NTPDase1 is the major ecto-nucleotidase present on murine macrophages where it can govern  $P2X_7$  receptor activation and thereby control ATP-induced death, pore formation and IL-1 $\beta$  and IL-18 release, two important cytokines released early in inflammation.

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Dr Jean Sévigny pour m'avoir accueilli dans son jeune laboratoire et de m'avoir permis de participer à toutes les tâches qui incombent à un professeur universitaire. J'ai beaucoup apprécié sa confiance en moi qui s'est traduite par la grande liberté qu'il m'a laissée dans l'élaboration de mon travail de recherche. Cette confiance s'est aussi fait sentir dans les responsabilités qu'il m'a données et dans le nombre d'étudiants qu'il m'a permis de former. Merci pour la chance inouïe d'avoir pu participer à plusieurs congrès dont certains aux États-Unis d'Amérique, en Italie et au Danemark. J'aimerais aussi le remercier pour les discussions sur le sport, la religion et la métaphysique qui ont aidé quelques fois à traverser certains moments plus difficiles.

Merci aux membres du laboratoire (Alain, Cristina, Elizandra, Fariborz, Fethia, Filip, François, Gilles, Joanna, Julie, Mercedes, Michel, Mireia) et les stagiaires qui m'ont permis soit par leur aide technique, leur conseil, leur soutien ou leur amitié de terminer mon doctorat. J'aimerais aussi remercier les étudiants et le personnel de Rhumatologie-Immunologie et de Reproduction qui ont croisé ma route spécialement Arpita, Julie, Hendrix, Marie-Thérèse, Philippe et Sylvain, etc. Sans eux, les moments difficiles auraient été insurmontables et les bons moments beaucoup moins joyeux. Élise, en qui j'ai trouvé la petite sœur que je n'ai jamais eue, sans toi mon doctorat n'aurait pas été le même. J'aimerais aussi remercier mes parents et mes frères pour leur soutien. MERCI !

Une mention spéciale doit être accordée à ma conjointe, Isabelle Duval (maintenant docteure Duval) qui m'a soutenu de façon inconditionnelle et qui a supporté une relation à distance pendant plus de quatre années. Sans toi la vie n'aurait plus le même sens...

Finalement, je tiens également à remercier tous les membres du jury d'évaluation de cette thèse qui ont bien voulu prendre un peu de leur temps précieux pour évaluer mon travail. Je remercie aussi la Faculté de médecine de l'Université Laval de m'avoir permis de poursuivre ma formation de doctorat dans le programme de Microbiologie-Immunologie. Un merci spécial aux organismes subventionnaires qui ont permis l'exécution du travail et le fond Hydro-Québec de la fondation de l'Université Laval ainsi que le FRSQ pour les bourses qu'ils m'ont attribuées.



## **Avant-Propos**

Cette thèse de doctorat décrit mes travaux présentés sous forme de quatre articles évalués ou acceptés dans des journaux scientifiques avec évaluation par des pairs. Dans un premier temps, j'ai travaillé sur la caractérisation d'une nouvelle NTPDase qui venait d'être identifiée et clonée dans notre laboratoire par M. François Bigonnesse, soit la NTPDase8 (Chapitre 2, publié dans « Biochemistry ») et la comparaison des propriétés biochimiques de quatre NTPDases humaines et murines présentes au niveau de la membrane plasmique soient les NTPDase1, 2, 3 et 8 (Chapitre 3, publié dans « Purinergic Signalling »). Dans un deuxième temps, je présente la caractérisation de l'ARL 67156, un inhibiteur potentiel de la NTPDase1 (Chapitre 4, publié dans « British Journal of Pharmacology »). Finalement, j'ai entrepris l'étude du rôle de la NTPDase1 présente à la surface des macrophages (Chapitre 5, accepté dans « European Journal of Immunology »). En parallèle à ces travaux, j'ai participé à plusieurs autres travaux comme co-auteur, la liste est fournie à l'annexe 1. Les détails de ma contribution à chacun des chapitres sont décrits ci-dessous.

### **Chapitre 2 : Clonage et caractérisation de la Nucléoside Triphosphate Diphosphohydrolase-8 de souris.**

En tant que co-auteur principal, ma contribution à ce travail publié en 2004 dans la revue « Biochemistry » [1] a consisté à la rédaction (~45%) et la conception des procédures expérimentales ainsi qu'à la caractérisation biochimique de la NTPDase8 de souris (Figure 12, Table 9). La participation de l'autre co-auteur principal, M. François Bigonnesse, a consisté au clonage, aux analyses d'expression (Figures 8-10) et à l'écriture (~45%). Le Dr Filip Kukulski a effectué les profils d'hydrolyse et l'étude de cinétique enzymatique (Figure 13 et Table 10), Dre Joanna Łęcka a procédé à l'analyse génomique (Figure 11), le Dre Maria J.G. Fernandes a conseillé M. François Bigonnesse pour le clonage de la NTPDase8. Les résultats préliminaires ayant mené à ce travail ont été obtenus par Dr Jean Sévigny sous la supervision du Dr Simon C. Robson. Dr Jean Sévigny a aussi écrit l'introduction de l'article, supervisé et dirigé le travail ayant mené à cette publication.



### **Chapitre 3 : Étude comparative de l'hydrolyse des agonistes des récepteurs P2 par les Nucléosides Triphosphates Diphosphohydrolases 1, 2, 3 et 8.**

En tant que deuxième co-auteur, ma contribution à ce travail publié dans la revue « Purinergic Signalling » en 2005 fut essentiellement au niveau de la conception et de l'expérimentation. J'ai co-conceptualisé l'étude avec l'auteur principale, Dr Filip Kukulski, participé à l'étude des propriétés biochimiques des NTPDases testées dans cet article (Figure 14 et 15, Table 11), procédé à la revue de littérature ayant mené à la Table 13 et participé à la rédaction de l'article (~20%). L'auteur principal, a écrit l'essentiel de l'article (~80%), procédé aux profils d'hydrolyse et à la cinétique enzymatique (Figure 16 et Table 12). Mme Élise G. Lavoie a aidé à la préparation des extraits protéiques, et a cloné les NTPDase2 et 3 de souris. Dre Joanna Łęcka a cloné la NTPDase8 de rat, M. François Bigonnesse a cloné la NTPDase8 de souris, le Dre Aileen F. Knowles a fourni le plasmide encodant la NTPDase2 humaine, le Dr Simon C. Robson les plasmides pour les NTPDase1s de souris et humaine, le Dr Terence L. Kirley le plasmide pour la NTPDase3 humaine. Le Dr Jean Sévigny a supervisé et dirigé le travail.

### **Chapitre 4 : Spécificité d'inhibition de l'ARL 67156 pour les ecto-nucléotidases murines et humaines.**

Ce travail a été publié dans « British Journal of Pharmacology » en 2007. En tant que premier auteur, ma contribution à ce travail fut la quasi-totalité du travail technique et de rédaction. Mme Élise G. Lavoie a aidé à la préparation des extraits de protéines recombinantes et les essais d'inhibition sur cellules intactes (Figure 20), elle a cloné et préparé les plasmides codant pour les NTPDases 2 et 3 de souris utilisé dans ce travail. M. François Bigonnesse a participé aux essais préliminaires et à certaines expériences [ARL] 100: [ATP] 500 présentées dans la Figure 17. Dre Joanna Łęcka a cloné et préparé les plasmides codant pour la NTPDase8 et l'ecto-5'-nucléotidase humaines utilisé dans ce travail et aussi les conditions et conseils qui ont servi au test d'activité de l'ecto-5'-nucléotidase. Le Dr Jean Sévigny a supervisé le travail.

**Chapitre 5 : La NTPDase1 régule les fonctions associées au récepteur P2X<sub>7</sub> des macrophages murins.**

Ce travail est présentement en révision dans la revue « European Journal of Immunology ». Ma contribution à ce travail fut la quasi-totalité du travail technique et de rédaction. Dr Filip Kukulski a effectué l'expérience de poches d'air (Figure 25F) et m'a guidé lors de la rédaction. Le Dr Simon C. Robson a fourni les souris déficientes en NTPDase1 et a apporté des conseils lors de la rédaction de l'article. Le Dr Jean Sévigny a supervisé le travail.

## Liste des abréviations:

ABC	cassette de liaison à l'ATP (" <u>A</u> TP <u>B</u> inding <u>C</u> assette")
ACR	région conservées de l'apyrase (" <u>A</u> pyrase <u>C</u> onserved <u>R</u> egions")
ACPL2	phosphatase acide-like 2
ADA	adénosine désaminase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
AK	adénylate kinase
AP	phosphatases acides
ALP	phosphatases alcalines
AMP	adénosine monophosphate
AMP <sub>c</sub>	adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
ARL 67156	(ou FPL 67156) 6- <i>N,N</i> -Diéthyl-D-β-γ-dibromométhylène adénosine triphosphate
ARN <sub>m</sub>	acide ribonucléique messenger
ARN <sub>r</sub>	acide ribonucléique ribosomal
ARN <sub>t</sub>	acide ribonucléique de transfert
ARN <sub>db</sub>	acide ribonucléique double brin
ARN <sub>sb</sub>	acide ribonucléique simple brin
Ap <sub>3</sub> A	diadénosine 5',5'''-P <sub>1</sub> ,P <sub>3</sub> -triphosphate
Ap <sub>n</sub> A	diadénosine polyphosphate (où n = nombre de phosphates)
Ap <sub>n</sub> G	adénosine 5'-guanosine polyphosphate
Ap <sub>n</sub> U	adénosine 5'-uridine polyphosphate
ART	mono(ADP-ribosyl)transférase
ASC	protéines speck-like associé à l'apoptose contenant des domaines de recrutement des caspases (" <u>A</u> ppoptosis-associated <u>S</u> peck-like <u>P</u> rotein containing a <u>C</u> aspase <u>R</u> ecruitment <u>D</u> omain")
ATP	adénosine triphosphate
αβ-meADP	αβ-méthylène adénosine diphosphate
βγ-meATP	βγ-méthylène adénosine triphosphate
BMMΦ	macrophages dérivés de la moelle osseuse (" <u>B</u> one <u>M</u> arrow-derived <u>M</u> acrophages")
Bp	pair de bases (" <u>B</u> ase pairs")
BSA	albumine sérique bovine
BzATP	2', 3'-O-(4-benzoylbenzoyle) adénosine triphosphate
°C	degré Celcius
cADPR	adénosine diphosphate ribose cyclique
CAN	nucléotidase activée par le calcium (" <u>C</u> alcium <u>A</u> ctivated <u>N</u> ucleotidase")
CARD	domaine de recrutement des caspases (" <u>C</u> aspase <u>r</u> ecruitment <u>d</u> omains")
CDP	cytidine diphosphate
CFTR	régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystic (" <u>C</u> ystic <u>F</u> ibrosis <u>T</u> ransmembrane <u>C</u> onductance <u>R</u> egulator")
CHX	cycloheximide



CMP	cytidine monophosphates
CNT	transporteur concentrant des nucléosides (“ <u>C</u> oncentrative <u>N</u> ucleoside <u>T</u> ransporter”)
CTL	témoin (“ <u>C</u> ontrol”)
CTP	cytidine triphosphate
CysLT <sub>1</sub>	récepteur aux cystéinyl-leucotriènes-1
CysLT <sub>2</sub>	récepteur aux cystéinyl-leucotriènes-2
cm	centi (10 <sup>-2</sup> ) mètre
cM	centi (10 <sup>-2</sup> ) Morgan
CpG	motif qui correspond à (“ <u>C</u> ytosine-phosphate- <u>G</u> uanine”)
Da	Dalton
dATP	désoxyriboadénosine triphosphate
DC	cellules dendritiques (“ <u>D</u> endritic <u>C</u> ells”)
DMSO	diméthyle sulfoxyde
DMEM	milieu minimal Eagle modifié par Dulbecco/Vogt (“ <u>D</u> ulbecco/ <u>V</u> ogt <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> inimal essential medium”)
dNTP	désoxynucléoside triphosphate
EDCF	facteur contractile dérivé de l'endothélium
EDHF	facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EDTA	acide éthylène diamine tetra acétique
EGTA	acide éthylène glycol tetra acétique
ELISA	dosage immunoenzymatique sur support (“ <u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay”)
ENT	transporteur équilibrant des nucléosides (“ <u>E</u> quilibrative <u>N</u> ucleoside <u>T</u> ransporter”)
ePDE	ecto-phosphodiesterase
ERK	kinases regale par des signaux extracellulaires (“ <u>E</u> xtracellular signal- <u>R</u> egulated <u>K</u> inases”)
EST	« expressed sequence tag »
FAD/FADH <sub>2</sub>	flavine adénine dinucléotide
FBS	sérum bovin fœtale (“ <u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum”)
FdU	5-fluoro-déoxy-2'-uridine
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
FSH	hormone stimulant les follicules (“ <u>F</u> ollicule- <u>S</u> timulating <u>H</u> ormone”)
GAPDH	glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GDP	guanosine diphosphate
GMP	guanosine monophosphates
GPCR	récepteur couplé à une protéine G
GPI	glycosylphosphatidylinositol
Gp <sub>n</sub> A	guanosine 5'-adénosine polyphosphate
Gp <sub>n</sub> G	diguanosine polyphosphate
GPC	glycéro-phosphatidylcholine
GPR	récepteurs couplé à une protéine G orphelin ( <u>G</u> PCR related protein)
GTP	guanosine triphosphate
HPLC	chromatographie liquide à haute performance (“ <u>H</u> igh- <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography”)

HSP	protéine de résistance au choc thermique (“ <u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> rotein”)
HUVEC	cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (“ <u>H</u> uman <u>U</u> mbilical <u>V</u> ein <u>E</u> ndothelial <u>C</u> ells”)
kDa	kilo ( $10^3$ ) Dalton
$K_i$	constante d’inhibition
$K_m$	constant de Michaelis-Menten
$K_m^{app}$	constant de Michaelis-Menten apparent
ICAM	molécule d’adhésion intercellulaire (“ <u>I</u> nter <u>c</u> ellular <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule”)
ICE	enzyme de conversion de l’interleukine-1
IgG	immunoglobuline G
IgM	immunoglobuline M
IL-	interleukine (ex. : IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, etc.)
IMP	inosine monophosphate
IFN	interféron
i.p.	intra péritonéale
Ip <sub>5</sub> I	diinosine 5’ pentaphosphate
IPAF	facteur activateur de l’enzyme de conversion de l’interleukine-1 (“ <u>I</u> ce <u>P</u> rotease- <u>A</u> ctivating <u>F</u> actor”)
KC	chimio-cytokine dérivé des kératinocytes (CXCL1)
KN-62	1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-méthyl-L-tyrosyl]-4-phénylpiperazine
L	litre
LDH	lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27)
LPC	lyso-phosphatidylcholine
LPS	lipopolysaccharide
LTC <sub>4</sub>	leucotriène C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	leucotriène D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	leucotriène E <sub>4</sub>
M	molaire
MAPK	« <u>M</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase »
MCP-1	protéine chimio-attractante monocytique-1 (“ <u>M</u> onocyte <u>C</u> hemotractant <u>P</u> rotein-1”)
MDP	dipeptide muramyle
MES	acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique
miARN	micro acides ribonucléiques, ou petit ARN interférant
mL	milli ( $10^{-3}$ ) litre
$\mu$ L	micro ( $10^{-6}$ ) litre
mm	milli ( $10^{-3}$ ) mètre
mM	milli ( $10^{-3}$ ) molaire
$\mu$ m	micro ( $10^{-6}$ ) mètre
$\mu$ M	micro ( $10^{-6}$ ) molaire
min	minutes
MIP-2	protéine inflammatoire des macrophages-2 (“ <u>M</u> acrophage <u>I</u> nflammatory <u>P</u> rotein-2”)



MRP	protéines de multi-résistances aux drogues (“ <u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance <u>P</u> roteins”)
ms	milli-seconde
NAD/NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP/NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBTI	nitrobenzylthioinosine
NCBI	centre national américain d’informations biotechnologiques (“ <u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation”)
NDP	nucléoside diphosphate
NDPK	nucléoside diphosphokinase
NO	monoxide d’azote (“nitric oxide”)
NOD	protéine avec un domaine de liaison aux nucléotides
ng	nano ( $10^{-9}$ ) gramme
NK	cellules « natural killer »
NKT	cellules « natural killer » T
NLR	protéine contenant un domaine de liaison aux nucleotides et une région de leucines répétées (ou récepteur « NOD-like »)
nm	nano ( $10^{-9}$ ) mètre
N <sub>p</sub> <sub>n</sub> N	dinucléotide polyphosphate (où n = nombre de phosphates)
NPP	nucléotides pyrophosphatase/phosphodiesterase
NTP	nucleoside triphosphate
NTPDase	nucléoside triphosphate diphosphohydrolase
oATP	ATP oxidé (“oxidized ATP”)
PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide (“ <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis”)
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	lipopeptide synthétique tripalmitoylé (cystéine-sérine-tretralysine)
PAMP	motif moléculaire associé aux agents pathogènes (“ <u>P</u> athogen- <u>A</u> ssociated <u>M</u> olecular <u>P</u> attern”)
Panx-1	pannexine-1
PAP (TM-PAP)	phosphatase acide prostatique (transmembranaire)
PCR	réaction de polymérisation en chaîne (“polymerase chain reaction”)
PE	R-phycoérythrine
PFA	tampon <u>P</u> B <u>S</u> 1X, 1% <u>F</u> B <u>S</u> , 0.1% <u>a</u> zidure de sodium
pg	pico ( $10^{-12}$ ) gramme
PGI <sub>2</sub>	prostacycline (ou prostaglandine I <sub>2</sub> )
P <sub>i</sub>	phosphate inorganique (PO <sub>4</sub> )
pIC <sub>50</sub>	potentiel concentration inhibitrice 50
PMA	phorbol-12-myristate-13-acétate
PMSF	fluorure de phénylméthylsulphonyle
PP <sub>i</sub>	pyrophosphate inorganique ((PO <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ))
pH	potentiel hydrogène
PLC	phospholipase C
pnp	para-nitrophénol
pnp-TMP	para-nitrophényle thymidine 5’-monophosphate
qPCR	réaction de polymérisation en chaîne quantitatif



RANTES	chimiokine CCL5 (“ <u>R</u> egulated upon <u>A</u> ctivation, <u>N</u> ormal <u>T</u> -cell <u>E</u> xpressed, and <u>S</u> ecreted”)
Ras	protéine impliquée dans la prolifération cellulaire découverte dans les sarcomes de rat (“ <u>R</u> at <u>s</u> arcoma”)
RB2	bleu réactif numéro 2 (“Reactive blue-2”)
ROS	dérivés réactifs de l’oxygène (“ <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies”)
RT	transcription inverse (“ <u>R</u> everse <u>T</u> ranscription”)
s.c.	sous cutanée
SPC	phosphatidylcholine saturé
SSC buffer	tampon chlorure de sodium/citrate de sodium (“ <u>S</u> odium chloride- <u>S</u> odium <u>C</u> itrate <u>b</u> uffer”)
TBA	tétrabutyle ammonium
TDP	thymidine diphosphate
TLR	récepteur « Toll-like »
TNF $\alpha$	facteur nécrotique des tumeurs alpha (“ <u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor alpha”)
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TTP	thymidine triphosphate
U	unité
UDP	uridine diphosphate
UDP-Glc	uridine diphosphate-galactose
UDP-Glu	uridine diphosphate-glucose
UMP	uridine monophosphate
Up $_4$ A	P(1)-(uridine 5’)-P(4)-(adénosine 5’)tétraphosphate
Up $_4$ dC	P(1)-(uridine 5’)-P(4)-(2’-déoxycytidine 5’)tétraphosphate, sel de tétrasodium
Up $_n$ A	uridine 5’-adénosine 5’ polyphosphate
UTP	uridine triphosphate
UV	lumière ultra violette
VCAM	molécule d’adhésion des cellules vasculaires (“ <u>V</u> ascular <u>C</u> ell <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule”)
V $_{max}$	vélocité maximale
XMP	xanthine monophosphate
YVAD	térapeptide synthétique (Tyrosine-Valine-Alanine-Asparagine)
zVAD	tripeptide synthétique (Benzyloxycarbonyl-Valine-Alanine-Asparagine)

*À tous ceux et celles qui croient que toute la  
vérité mérite d'être dite, ou écrite, ainsi qu'à  
tous ceux et celles qui ont cru en moi.  
Particulièrement à ma conjointe Isabelle,  
mes collègues et ma famille...*

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Remerciements.....	iii
Avant-Propos.....	iv
Liste des abréviations:.....	vii
Préambule.....	1
1 Introduction.....	3
1.1 Un bref historique.....	3
1.2 Un peu de nomenclature.....	5
1.3 Nucléotides extracellulaires : contexte général.....	6
1.3.1 Sources de nucléotides extracellulaires.....	8
1.3.1.1 Relâche des nucléotides.....	8
1.3.1.2 Génération de nucléotides par les dinucléotides et autres molécules contenant des nucléotides.....	11
1.3.1.3 Interconversion de nucléotides par des ecto-kinases.....	12
1.3.2 Récepteurs aux nucléotides extracellulaires.....	13
1.3.2.1 Récepteurs P2Y.....	13
1.3.2.2 Récepteurs P2X.....	16
1.3.2.3 Récepteurs aux cystéinyl-leucotriènes et aux nucléotides uridyliques.....	18
1.3.2.4 Expression des récepteurs aux nucléotides.....	18
1.3.3 Élimination des nucléotides extracellulaires par des ecto-nucléotidases.....	20
1.3.3.1 Nucléosides triphosphates diphosphohydrolases (NTPDases).....	20
1.3.3.2 Nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (NPPs).....	26
1.3.3.3 Ecto-5'-nucléotidase (CD73).....	29
1.3.3.4 Phosphatases alcalines (ALP).....	29
1.3.3.5 Phosphatases acides (AP).....	30
1.3.3.6 Autres ecto-nucléotidases potentielles.....	31
1.3.4 Nucléosides extracellulaires.....	32
1.3.4.1 Récepteurs aux nucléosides P1.....	32
1.3.4.2 Récepteurs à l'adénine.....	34
1.3.4.2 Élimination des nucléosides extracellulaires.....	35
1.3.4.2.1 Adénosine désaminase (ADA; EC 3.5.4.4).....	36
1.3.4.2.2 Nucléosides puriques phosphorylase (PNP ; EC 2.4.2.1.).....	36
1.3.4.2.3 SLC29 ou « equilibrative nucleoside transporter ».....	37
1.3.4.2.4 SLC28 ou « concentrative nucleoside transporter ».....	38
1.4 Nucléotides extracellulaires : inflammation.....	39
1.4.1 La réponse immune.....	39
1.4.2 L'inflammation.....	41
1.4.3 Les leucocytes et l'inflammation.....	42
1.4.4 Rôles du macrophage.....	44
1.4.5 Récepteurs « Toll-like » (TLR).....	46
1.4.6 Récepteurs « NOD-like » (NLR).....	49
1.4.7 Interleukine-1.....	51
1.4.8 Ecto-nucléotidases et inflammation.....	53



1.4.9 Pathologies inflammatoires.....	55
1.5 Hypothèses et objectifs de recherche.....	56
Chapitre 2 : Clonage et caractérisation de la Nucléoside Triphosphates Diphosphohydrolase-8 de souris.....	58
2.1 Abstract.....	61
2.2 Introduction.....	62
2.3 Experimental Procedures.....	63
2.3.1 Materials.....	63
2.3.2 RT-PCR Cloning.....	63
2.3.3 Northern Blot Analysis.....	64
2.3.4 Genomic Characterization of Entpd8.....	65
2.3.5 Cell Transfection and Protein Preparation.....	65
2.3.6 NTPDase Activity Measurement.....	66
2.3.7 Separation and Quantification of Nucleotides by HPLC.....	67
2.4 Results.....	67
2.4.1 Cloning and Characterization of Mouse NTPDase8 cDNA.....	67
2.4.2 Genomic Characterization of Entpd8.....	71
2.4.3 Biochemical Characterization of NTPDase8.....	72
2.5 Discussion.....	77
2.6 Acknowledgments.....	79
Chapitre 3 : Étude comparative de l'hydrolyse des agonistes des récepteurs P2 par les Nucléosides Triphosphates Diphosphohydrolases 1, 2, 3 et 8.....	80
3.1 Abstract.....	83
3.2 Introduction.....	84
3.3 Materials and Methods.....	85
3.3.1 Materials.....	85
3.3.2 Plasmids.....	85
3.3.3 Cell transfection and protein preparation.....	86
3.3.4 NTPDase activity measurement.....	87
3.3.5 Separation and quantification of nucleotides by HPLC.....	88
3.4 Results.....	89
3.4.1 Biochemical characterization of plasma membrane bound NTPDases.....	89
3.4.2 Kinetics of nucleotide hydrolysis by plasma membrane bound NTPDases.....	93
3.5 Discussion.....	100
3.6 Acknowledgements.....	105
Chapitre 4 : Spécificité d'inhibition de l'ARL 67156 pour les ecto-nucléotidases murines et humaines.....	106
4.1 Abstract.....	108
4.2 Introduction.....	109
4.3 Material and Methods.....	112
4.3.1 Plasmids.....	112
4.3.2 Cell transfection and preparation of membrane fraction.....	112
4.3.3 Enzymatic assays.....	113
4.3.4 Evaluation of ARL 67156 as a potential substrate for human NTPDases and NPPs.....	114
4.3.5 Separation and quantification of nucleotides and dinucleotides by HPLC.....	115



4.3.6 Reagents.....	116
4.4 Results.....	116
4.4.1 ARL 67156 is a non-hydrolysable ATP analogue.....	116
4.4.2 Effect of ARL 67156 on ecto-NTPDases.....	117
4.4.3 Effect of ARL 67156 on NPP1 and NPP3 activity.....	122
4.4.4 Effect of ARL 67156 on ecto-5'-nucleotidase.....	122
4.5 Discussion.....	124
4.6 Acknowledgements.....	127
4.7 Statement of conflicts of interest.....	127
Chapitre 5 : La NTPDase1 régule les fonctions associées au récepteur P2X <sub>7</sub> des macrophages murins.....	128
5.1 Abstract.....	130
5.2 Introduction.....	131
5.3 Material and methods.....	132
5.3.1 Reagents:.....	132
5.3.2 Animals:.....	132
5.3.3 Isolation of Peritoneal Macrophages:.....	133
5.3.4 Isolation of BMMΦ.....	133
5.3.5 Nucleotidase Activity Assays:.....	133
5.3.6 RT and Quantitative PCR.....	134
5.3.7 Western Blot.....	135
5.3.8 Flow Cytofluorometry.....	135
5.3.9 ATP-induced Cell Death Assays.....	137
5.3.10 IL-1β and IL-18 ELISA.....	137
5.3.11 Air Pouch Model.....	138
5.3.12 Statistical Analysis.....	138
5.4 Results.....	139
5.4.1 NTPDase1 (CD39) is the dominant ecto-nucleotidase on peritoneal macrophages .....	139
5.4.2 Regulation of P2X <sub>7</sub> functions by NTPDase1 (CD39).....	142
5.4.2.1 NTPDase1 deficient peritoneal macrophages are more susceptible to ATP- induced death.....	142
5.4.2.2 NTPDase1 regulates P2X <sub>7</sub> -induced IL-1β and IL-18 secretion.....	144
5.4.3.3 Entpd1 <sup>-/-</sup> peritoneal macrophages exhibit increased pore formation.....	150
5.5. Discussion.....	152
5.5.1 NTPDase1 is the dominant ecto-nucleotidase on macrophages.....	152
5.5.2 NTPDase1 regulates P2X <sub>7</sub> receptor functions.....	152
5.5.3 NTPDase1 may impact inflammation by controlling P2X <sub>7</sub> receptor activation. .....	155
5.6 Conclusions and perspectives.....	155
5.7 Acknowledgements.....	156
5.8 Conflict of interest.....	156
6 Conclusion.....	157
6.1 Clonage et caractérisation de la NTPDase8 de souris.....	158
6.2 Comparaison de l'hydrolyse des agonistes des récepteurs P2 par les NTPDase1, 2, 3 et 8.....	159



6.3 Spécificité d'inhibition de l'ARL 67156 pour les ecto-nucléotidases murines et humaines.....	160
6.4 NTPDase1 régule les fonctions associées au récepteur P2X <sub>7</sub> des macrophages murins.....	161
Annexe 1 Liste des publications.....	204
Annexe 2 Liste des présentations.....	206
Orales:.....	206
Affiches:.....	207

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Récepteurs P2Y.....	15
Tableau 2 : Récepteurs P2X.....	17
Tableau 3 : Récepteurs « mixtes ».....	19
Tableau 4 : Nucléosides triphosphates diphosphohydrolases.....	22
Tableau 5 : Nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases.....	27
Tableau 6 : Récepteurs aux nucléosides ou récepteurs P1.....	34
Tableau 7 : Récepteurs « Toll-like ».....	48
Tableau 8 : Famille de l'interleukine-1 (IL-1F).....	53
Table 9 : Substrate specificity of mouse NTPDase8 on transiently transfected intact cells <sup>a</sup> 74	
Table 10 : Kinetic constants of NTPDase8 <sup>a</sup> .....	75
Table 11 : NTP/NDP ratios of human and murine plasma membrane bound NTPDases. ....	91
Table 12 : Kinetic parameters of human and murine NTPDases. ....	93
Table 13 : Biochemical and kinetic parameters of recombinant and purified plasma membrane NTPDases. <sup>a</sup> .....	101
Table 14 : Comparative effect of ARL 67156 on the biochemical activity of human NTPDases.....	120
Table 15 : Primer pairs for PCR and products size.....	136
Table 16 : Expression of P2 receptors and ecto-nucleotidases as determined by RT-PCR	141



## Liste des figures

Figure 1 : Structure générale des nucléotides et molécules contenant des nucléotides. ....	7
Figure 2 : Structure des récepteurs aux nucléotides. ....	13
Figure 3 : Structure et activité des nucléosides triphosphates diphosphohydrolases. ....	23
Figure 4 : Structure tridimensionnelle des NTPDases. ....	25
Figure 5 : Structure et activité des nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases. ....	28
Figure 6 : Représentation de l'activité nucléosides puriques phosphorylase (EC 2.4.2.1.). ...	37
Figure 7 : L'inflammasome. ....	49
Figure 8 : Nucleotide and predicted amino acid sequences of mouse NTPDase8 cDNA. ....	69
Figure 9 : Phylogenetic analysis of amino acid sequences of selected NTPDases and related proteins. ....	70
Figure 10 : Tissue distribution of mouse NTPDase8 mRNA. ....	71
Figure 11 : Schematic representation of the genomic organization of mouse <i>Entpd8</i> . ....	72
Figure 12 : Biochemical characterization of mouse NTPDase8. ....	73
Figure 13 : Kinetics and profiles of nucleotide hydrolysis of mouse NTPDase8. ....	76
Figure 14 : Substrate specificity of plasma membrane bound NTPDases. ....	90
Figure 15 : The effect of pH on plasma membrane NTPDases. ....	92
Figure 16 : Profiles of nucleotide hydrolysis by plasma membrane NTPDases. ....	99
Figure 17 : Molecular structure of ARL 67156. ....	109
Figure 18 : Effect of ARL 67156 on human and mouse NTPDases. ....	118
Figure 19 : Determination of the kinetic parameters for the inhibition of human NTPDase1 and NTPDase3 by ARL 67156. ....	119
Figure 20 : Effect of ARL 67156 on ATP hydrolysis by NTPDases expressing cells. ....	121
Figure 21 : Effect of ARL 67156 and ATP on pnp-TMP hydrolysis by human NPP1 and NPP3. ....	123
Figure 22 : NTPDase1 is the major ecto-nucleotidase on mouse peritoneal macrophages elicited with thioglycollate. ....	140
Figure 23 : NTPDase1 deficiency does not impact P2X <sub>7</sub> receptor expression by peritoneal macrophages. ....	142
Figure 24 : <i>Entpd1</i> <sup>-/-</sup> macrophages are highly susceptible to ATP-induced death. ....	143
Figure 25 : NTPDase1 modulates P2X <sub>7</sub> -dependant IL-1 $\beta$ release from macrophages. ....	147
Figure 26 NTPDase1 modulates P2X <sub>7</sub> -dependent IL-18 release from peritoneal macrophages. ....	149
Figure 27 NTPDase1 deficiency increases IL-1 $\beta$ production in inflammatory air pouches. ....	149
Figure 28 : NTPDase1 deficiency increases P2X <sub>7</sub> -associated Yo-Pro-1 uptake by macrophages. ....	151

## Préambule

À l'origine il y a eu le « Big Bang », puis l'Univers est né et pendant plusieurs milliards d'années, la matière s'est organisée jusqu'à donner naissance à la vie. Certains y voient l'œuvre de Dieu, d'autres le fruit du hasard. Néanmoins, depuis l'apparition de notre espèce sur la Terre, la conscience qui l'habite l'a poussée à comprendre cet Univers et à savoir comment et pourquoi la vie existe.

De cette quête millénaire, au fur et à mesure du développement de nouveaux outils dont l'humanité s'est dotée, tous et chacun essaient d'y ajouter sa contribution. Aujourd'hui, après l'explosion des découvertes en biologie du 20<sup>e</sup> siècle, l'espèce humaine a réussi l'identification du patrimoine génétique de plusieurs micro-organismes ainsi que de plusieurs espèces animales et végétales. Elle a aussi réussi à contrôler et éradiquer certaines bactéries et virus causant des maladies infectieuses. De plus, les connaissances acquises ont permis de prolonger la vie et d'en améliorer globalement sa qualité. Cependant, la compréhension du fonctionnement, des interactions, de la coopération, de la communication entre les cellules et leurs composantes ainsi que la perception de leur environnement demeure largement incomplète et fragmentaire. Loin de prétendre répondre à toutes les questions, cet ouvrage présente ma petite contribution aux bagages de connaissances de l'humanité sur la vie.

Depuis le début de mes études universitaires, je suis captivé par l'origine de la vie et par les principes physiques et chimiques qui permettent aux diverses molécules et macromolécules d'interagir et de permettre la vie. Les travaux de Stanley Miller, qui montrant que la synthèse de molécules organiques était possible dans les conditions retrouvées sur la Terre primitive [1, 2], m'ont fasciné et ont dirigé mon intérêt en science vers la biochimie. La découverte de polymères d'acides ribonucléiques (ARN) capable à la fois de contenir de l'information génétique et de servir de catalyseur (ribozymes), qui a mené à l'hypothèse du « RNA world »<sup>1</sup> (pour une revue détaillée voir [3, 4]) m'a aussi poussé vers les nucléotides

---

<sup>1</sup> La théorie du « RNA world » stipule que la vie sur Terre aurait débutée avec les acides ribonucléiques comme premières molécules organiques. Ces molécules d'ARN jouaient



pour mes études de 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> cycle. L'hypothèse d'une « signalisation purinergique » émise par Geoffrey Burnstock au début des années 70, qui fut depuis vérifiée par de nombreux travaux [5-14], a ouvert un nouveau champ d'étude sur les nucléotides, soit un rôle de signal entre les cellules. Cette signalisation par les nucléotides semble être primitive [15] et pourrait aller de paire avec le « RNA world » dans un contexte où le nombre de molécules organiques primitives était limité.

Cet intérêt grandissant pour l'étude des nucléotides s'est traduit d'abord par une maîtrise en biologie à l'Université de Sherbrooke où je me suis familiarisé avec la biochimie et le développement d'inhibiteurs de la nucléoside triphosphate diphosphohydrolase majeure de la rate de bœuf (NTPDase1), une ecto-nucléotidase qui est par définition une enzyme membranaire avec un site catalytique extracellulaire capable de déphosphoryler les nucléotides. Ensuite, j'ai consacré mes études doctorales à la caractérisation plus large des nucléotidases appelées NTPDases et NPP présentes au niveau de la membrane plasmique et des fonctions d'une de ces enzymes, la NTPDase1 chez le macrophage.

---

alors le rôle de répertoire génétique et de catalyseur des réactions métaboliques des organismes vivants primitifs. Ils auraient été remplacés par l'ADN plus stable pour stocker l'information génétique et par les protéines plus polyfonctionnelles et efficaces comme catalyseurs des réactions métaboliques.

# 1 Introduction

Les acides nucléiques, ou nucléotides, sont parmi les molécules organiques les plus étudiées en biologie. Leurs rôles sont importants à différents niveaux de l'organisation du vivant, et ils peuvent facilement être considérés comme une pierre angulaire de la vie. En effet, l'information génétique est stockée sous forme de longs polymères d'acides nucléiques, les acides désoxyribonucléiques (ADN). Cette information est transmise et traduite grâce à des acides ribonucléiques ( $ARN_m$ ,  $ARN_r$ ,  $ARN_t$ ) dont certains peuvent aussi participer à la régulation de cette traduction de l'information génétique en protéine (miARN) [16, 17]. De plus, l'activité de plusieurs protéines et complexes protéiques dépend des nucléotides soit comme source d'énergie chimique, soit comme pourvoyeur de phosphates par l'intermédiaire de protéines kinases ou soit de cofacteur nécessaire à certaines enzymes [18, 19]. Finalement, certains nucléotides, nucléosides ou molécules contenant des nucléotides peuvent servir de signal, autocrine et/ou paracrine, pour plusieurs types cellulaires lorsqu'ils sont relâchés dans le milieu extracellulaire comme nous le verrons dans ce travail.

## 1.1 Un bref historique

Le premier nucléotide, l'adénosine triphosphate (ATP), fut découvert en 1929 par le chimiste Karl Lohmann [20]. Au cours de la même année Drury et Szent-Gyorgyi démontrèrent qu'un nucléoside, l'adénosine, pouvait avoir des effets hypotenseurs et bradycardiques [21, 22]. Ces deux découvertes importantes ont pavé la route aux travaux de Vladimir Engelhart qui observa en 1935 que l'ATP est nécessaire à la contraction des muscles squelettiques et de Fritz Lipmann qui montra que l'ATP est la source principale de stockage de l'énergie chimique de la cellule grâce à ses « liaisons phosphates riches en énergie » [18, 23]. D'autres travaux ont apporté des exemples de rôles importants joués par les nucléotides, tels que la transmission de signaux de l'environnement cellulaire vers l'intérieur grâce aux protéines G qui ont besoin de guanosine triphosphate (GTP), ou encore la forme cyclique de l'adénosine monophosphate (AMPc) qui joue un rôle de second messenger [24].



C'est probablement à cause de ces fonctions primordiales à l'intérieur de la cellule que les travaux sur les effets physiologiques des nucléotides adényliques à l'extérieur de la cellule passèrent pratiquement inaperçus. Effectivement, des effets hypotenseurs et bradycardiques ainsi que de l'œdème cardiaque et des changements respiratoires furent décrits lors d'injections d'ATP [25]. Bien que ces travaux ne permettent pas d'exclure un effet potentiel de l'adénosine résultant de la dégradation de l'ATP, d'autres travaux montrèrent une libération d'ATP lors de la stimulation des nerfs sensitifs de l'oreille de lapin [26, 27]. Ces travaux et quelques autres menèrent Geoffrey Burnstock, au début des années 1970, à émettre l'hypothèse d'une signalisation purinergique où l'ATP jouerait un rôle de neurotransmetteur au même titre que l'acétylcholine et qui pourrait être éliminé de la même façon dans la synapse nerveuse par des ecto-enzymes [28]. Malgré le rythme impressionnant de publications du Dr. Burnstock et les travaux de plusieurs autres groupes, il a fallu attendre le début du clonage des récepteurs capables de répondre aux nucléotides, pour que l'ATP, et aussi d'autres nucléotides tels l'ADP, l'UTP et l'UDP, soient considérés comme signaux intercellulaires [8]. En parallèle, les travaux portant sur l'adénosine, qui suivirent ceux de Drury et Szent-Gyorgyi, ont aussi mené à la découverte de nombreux effets physiologiques de ce nucléoside et de quatre récepteurs spécifiques :  $A_1$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$ ,  $A_3$  [29]. Nonobstant, encore aujourd'hui la plupart des manuels de biologie et de biochimie omettent de mentionner la présence de nucléotides/nucléosides dans le milieu extracellulaire et la signalisation par ces molécules.

C'est pourquoi je présenterai d'abord la nomenclature des nucléotides/nucléosides et des molécules formées en partie d'un nucléotide. Dans un deuxième temps, j'aborderai brièvement chacun des joueurs impliqués dans les différents aspects de la signalisation par les nucléotides et les nucléosides extracellulaires afin de mieux cerner cette voie de signalisation. Dans un troisième temps, j'illustrerai l'importance de cette voie de signalisation en m'attardant sur le rôle des nucléosides/nucléotides dans le processus inflammatoire et en portant une attention particulière au macrophage, une cellule impliquée dans ce processus. Ensuite, je décrirai mes hypothèses de recherche, les différents objectifs que nous nous sommes fixés et les résultats obtenus sous forme d'articles.

## 1.2 Un peu de nomenclature

Tout d'abord, afin de bien comprendre la suite de ce travail voici quelques définitions et détails structuraux. Les nucléosides sont constitués d'un sucre cyclisé à cinq carbones (ribofuranose ou désoxyribofuranose) et d'une base azotée (purine ou pyrimidine) tel que décrit à la Figure 1 et sont produits dans le cytoplasme de la plupart des cellules. Ces molécules peuvent être phosphorylées au niveau du sucre dans la mitochondrie lors du processus de respiration cellulaire. Alternativement, de un à quatre phosphate(s) inorganique(s) ( $\text{PO}_4^{3-}$  ou  $\text{P}_i$ ) peuvent s'ajouter par liaison phosphodiester et former une chaîne. Dans ce cas nous parlons de nucléotides (exemple de nucléotide triphosphates à la Figure 1A). Le nombre de phosphate compris dans cette chaîne est souvent critique dans la détermination du rôle physiologique d'un nucléotide. Par exemple, l'adénosine triphosphate (ATP), et non diphosphate (ADP) ou monophosphate (AMP), peut servir à la phosphorylation de diverses protéines par des protéines kinases, enzymes qui transfèrent le phosphate  $\gamma$  de l'ATP sur des acides aminés sérine/thréonine ou tyrosine [19]. La notation utilisée pour l'identification des phosphates se fait en partant du sucre soit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et plus rarement  $\delta$  (Figure 1A). Les nucléosides/nucléotides sont divisés en purines (adénine, guanine et inosine) et en pyrimidines (cytosine, thymine et uracile) dépendamment de la nature de leur base azotée (Figure 1B).

Dans la nature, il existe aussi des molécules formées à partir d'un ou deux nucléotide(s). En effet, d'autres molécules peuvent s'attacher par un lien phosphoester à la chaîne de phosphates d'un nucléotide et former des molécules plus complexes. Parmi ces molécules on retrouve les couples de molécules oxido-réductrices de la chaîne de respiration cellulaire, NAD/NADH, NADP/NADPH et FAD/FADH<sub>2</sub>, qui sont respectivement formées soit d'une molécule de nicotinamide, d'un 2'-phospho-adénosine-5'-diphosphates ou de flavine et qui sont attachées à la chaîne de phosphates de l'adénosine diphosphate (ADP ; Figure 1C). Il existe aussi certains hexoses comme le glucose et le galactose qui peuvent s'attacher au nucléotide UDP et former l'UDP-glucose (Figure 1C) ou l'UDP-galactose qui servent à la glycogénèse, synthèse du glycogène. Enfin deux nucléotides, purines ou pyrimidines, peuvent se joindre au niveau de leur chaîne de phosphates et former des

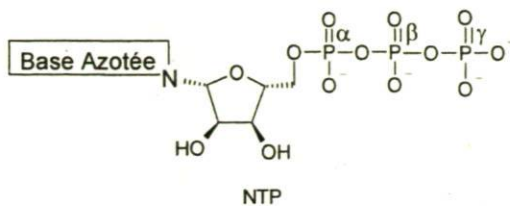


dinucléotides polyphosphates ( $Np_nN$ ) où le nombre de phosphates varie de deux à sept (Figure 1F). Les dinucléotides polyphosphates les plus courants sont les  $Ap_nA$  [30, 31], mais les dinucléotides  $Up_nA$ ,  $Gp_nA$  et  $Gp_nG$  ont aussi été décrits [30, 32]. Les molécules contenant des nucléotides sont surtout produites dans le cytoplasme, et dans certains cas dans le noyau [30, 33, 34].

### 1.3 Nucléotides extracellulaires : contexte général

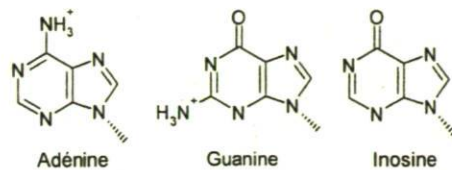
Plusieurs des molécules décrites ci-dessus peuvent être relâchées dans le milieu extracellulaire et participer directement (en activant des récepteurs spécifiques) ou indirectement (en servant de source de nucléosides/nucléotides) à la signalisation par les nucléosides/nucléotides. De façon générale, les nucléosides triphosphates et diphosphates tels que l'ATP, l'UTP, l'ADP et l'UDP peuvent être relâchés [35] ou produits dans le milieu extracellulaire [31, 36], mais ils ne peuvent pas réintégrer la cellule par simple diffusion à travers la membrane plasmique vu l'importante charge négative associée à leur chaîne de phosphates [35, 37]. Par conséquent, une fois à l'extérieur de la cellule, ces nucléotides participent à plusieurs processus physiologiques [7] par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs qui répondent aux nucléotides, soit des récepteurs spécifiques P2Y et P2X, ainsi que des récepteurs « mixtes » qui répondent à la fois aux cystéinyl-leucotriènes et aux nucléotides [5, 14, 38-40]. En parallèle, les nucléotides extracellulaires peuvent être déphosphorylés en nucléosides par des nucléotidases solubles ou des ecto-nucléotidases, enzymes attachées à la membrane plasmique et qui possèdent un site actif du côté externe [12, 41, 42]. Les nucléosides résultant de la déphosphorylation des nucléotides peuvent à leur tour activer des récepteurs spécifiques, dans le cas de l'adénosine, ou encore introduire à nouveau la cellule via deux familles de transporteurs SLC28 (CNT) et SLC29 (ENT) [43, 44]. Une fois réintégrés dans la cellule, les nucléosides pourront être phosphorylés et participer aux fonctions cellulaires ou être relâchés à nouveau. Regardons maintenant plus spécifiquement chacune des étapes de la signalisation par les nucléotides.

### A) Nucléotides

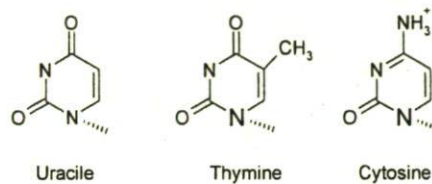


### B) Bases Azotées

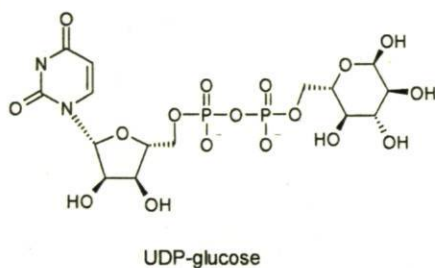
#### Purines



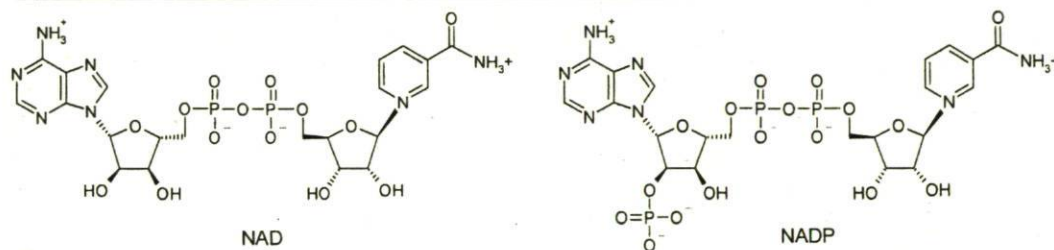
#### Pyrimidines



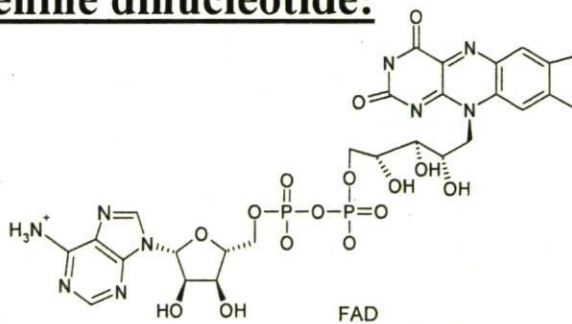
### C)



### D) Nicotinamide adénine dinucléotide:



### E) Flavine adénine dinucléotide:



### F) Dinucléotides:

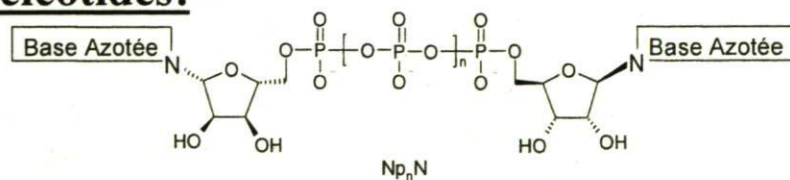


Figure 1 : Structure générale des nucléotides et molécules contenant des nucléotides.



### 1.3.1 Sources de nucléotides extracellulaires

Évidemment, pour que les nucléotides puissent servir de signaux autocrines ou paracrines, ils doivent être présents dans le milieu extracellulaire. Divers moyens de générer un nucléotide à l'extérieur de la cellule sont envisageables soit par 1- la relâche des nucléotides contenus dans le cytoplasme de la cellule, 2- la production de ceux-ci suite au clivage des dinucléotides polyphosphates ( $Np_nN$ ) ou d'autres molécules contenant des nucléotides (voir Figure 1), qui peuvent aussi être relâchées, 3- l'interconversion des nucléotides déjà présents dans le milieu via des ecto-kinases. Un exemple de cette dernière possibilité est la production d'un ATP et d'un AMP à partir de deux molécules d'ADP par l'enzyme adénylate kinase. Regardons d'un peu plus près chacune des possibilités mentionnées ci-dessus afin de bien comprendre les différentes sources de nucléotides extracellulaires.

#### 1.3.1.1 Relâche des nucléotides

Toutes les cellules vivantes contiennent d'importantes quantités de nucléotides dans leur cytosol [45, 46], mais on en retrouve aussi dans le plasma sanguin et à l'extérieur des cellules [35, 47-52]. Lors d'un choc traumatique, d'un dommage tissulaire ou d'une nécrose, une quantité importante de nucléotides peut ainsi se retrouver à l'extérieur d'une cellule [35, 50, 53]. Cependant, cette relâche de nucléotides est non-spécifique et demeure une source relativement restreinte de nucléotides extracellulaires. Des mécanismes non-lytiques de relâche de nucléotides existent et permettent à divers types cellulaires de communiquer. La relâche par la cellule de nucléotides tels que l'ATP peut paraître un gaspillage d'énergie chimique étant donné la présence de liaisons phosphodiester énergétiquement riches [18]. Cependant, il ne faut pas oublier que la synthèse d'un signal peptidique comme une cytokine, bien que plus spécifique, nécessite la dépense de deux nucléotides soit une molécule d'ATP et de GTP par acide aminé sans compter les modifications post-traductionnelles, donc d'une quantité beaucoup plus importante d'énergie chimique qu'un nucléotide [54]. À ce jour la plupart des études sur la relâche des nucléotides ont porté sur les nucléotides adényliques (ATP et ADP).

Les cellules excitables telles que les neurones, les cellules chromaffines, les cellules acinaires pancréatiques et les plaquettes sanguines peuvent relâcher, par exocytose, des granules sécrétoires (aussi nommés vésicules synaptiques, granules chromaffines ou corps denses). Cette relâche est dépendante du calcium et se produit lors de l'activation de ces cellules [35, 55]. Les granules sécrétoires contiennent d'importantes quantités d'ATP et d'ADP, dans certains cas du GTP et certains dinucléotides, en plus de divers médiateurs tels que des neurotransmetteurs, des neuropeptides et de l'histamine [30, 31, 55-58]. Elles constituent ainsi un moyen efficace de relâcher des nucléotides, ou des dinucléotides, dans le milieu extracellulaire.

Les cellules non-excitables incluant les cellules épithéliales [59-61], les cellules endothéliales [51, 62-64], les fibroblastes [65, 66], les hépatocytes [67, 68], les kératinocytes [69, 70], les cellules gliales [71], ainsi que diverses cellules hématopoïétiques telles que les érythrocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages [50, 72-75] peuvent aussi relâcher des nucléotides suite à divers stimuli. En effet, une relâche de nucléotides a été observée chez l'un ou l'autre de ces types cellulaires suite à l'application de forces de cisaillement, de conditions hypoxiques, d'un choc hypotonique, ou d'une pression hydrostatique, ainsi qu'en réponse à la bradykinine, la sérotonine et autres agents capables de mobiliser le calcium [35, 51, 55, 63, 74, 76]. Les mécanismes exacts de cette relâche demeurent encore débattus à ce jour. Cependant, il semble qu'il existe des mécanismes distincts pour une relâche constitutive par certaines cellules et une relâche associée aux stress mentionnés précédemment. Les cellules possédant des granules de sécrétion ou autres vésicules comme pour les cellules excitables (ex. : les astrocytes et cellules endothéliales) peuvent relâcher des nucléotides par exocytose [51, 77]. D'autres mécanismes de relâche ont été proposés, c'est-à-dire une diffusion facilitée par des transporteurs ABC tels que le facteur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR), les protéines de multi-résistances aux drogues (MRP) et les transporteurs d'anions organiques multiples [55, 78], ou via une libération par des hémicanaux (pannexine-1, connexine-43, connexine-36 ou connexine-26).



[73, 78-80]. À ce jour, les résultats les plus probants seraient en faveur d'un hémicanal pannexine-1 [77, 78, 81] ; sans toutefois exclure complètement les autres candidats.

Le nucléotide uridylique UTP peut aussi être relâché hors des cellules en réponse à des stress mécaniques. Sa relâche s'effectue en parallèle avec l'ATP avec une cinétique similaire et une relâche qui semble refléter le ratio de concentration intracellulaire d'ATP/UTP. Ceci est aussi vrai pour le GTP [58] et suggère que l'UTP et le GTP sont relâchés par des mécanismes semblables à ceux de l'ATP [82]. Cependant, il existe peu d'études à cet égard [58, 82, 83]. L'UDP a aussi été détecté dans le milieu extracellulaire simultanément avec l'UTP [84, 85]. Ce nucléotide peut provenir de la dégradation de l'UTP [86], donc il n'est pas clair encore s'il s'agit d'une véritable relâche ou simplement un produit de dégradation. Finalement, à ma connaissance aucune étude n'a rapportée la relâche de nucléotides cytidiniques, mais l'équipe du Dr Éric Rousseau a rapporté un effet de ce nucléotide sur les fibres du Purkinje de mouton en 2001 [87]. Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité d'une signalisation par les nucléotides cytidiniques.

L'AMPc, un second messenger important dans la cellule, peut aussi sortir via un efflux [88-90] par des transporteurs ABC tels que MRP4 [91-93], MRP5 [93-95] et MRP8 [96]. Cependant, à ma connaissance, aucun récepteur répondant à ce nucléotide n'a encore été détecté. Néanmoins, des ecto-phosphodiésterases (e-PDE) présentes dans plusieurs tissus comme le foie [97, 98], les reins [99, 100], le tissu adipeux [101], et les muscles squelettiques [90] peuvent transformer l'AMPc en AMP à l'extérieur de la cellule qui pourra à son tour générer de l'adénosine, comme nous le verrons plus loin. L'AMPc semble plutôt jouer un rôle de source d'adénosine plutôt qu'un rôle de signal extracellulaire à part entière.

En résumé, plusieurs nucléotides peuvent être relâchés de diverses façons dans le milieu extracellulaire selon le type cellulaire et le contexte physiologique. Ceci représente probablement la source majeure de nucléotides dans le milieu extracellulaire. Cependant, d'autres sources potentielles de nucléotides extracellulaires pourraient exister comme la dégradation de molécules contenant des nucléotides (ex. :  $N_pN$ , NAD, UDP-glucose, etc.).

### 1.3.1.2 Génération de nucléotides par les dinucléotides et autres molécules contenant des nucléotides

Comme nous venons de le voir, les cellules excitables contiennent des diadénosines polyphosphates ( $A_{p_n}A$ ) et autres dinucléotides ( $A_{p_n}G$ ,  $G_{p_n}G$ ,  $A_{p_n}U$ , etc.) dans leurs granules sécrétoires qui peuvent être relâchées lors de l'activation de ces cellules [30-32]. Il n'est pas clair si les dinucléotides peuvent aussi être relâchés par les cellules non-excitables. D'autres molécules contenant des nucléotides comme les nicotinamides dinucléotides (NAD/NADH) et les nucléotides-hexoses ont été détectées dans le milieu extracellulaire [30, 31, 102-104]. Par exemple, l'UDP-glucose peut être relâchée en partie via des vésicules d'origine golgienne [105], alors que le  $NAD^+$  pourrait être relâché soit par exocytose de vésicules [102] ou par un hémicanal de connexine-43 [103].

Il n'existe aucune preuve expérimentale directe de la sécrétion des autres molécules contenant des nucléotides (NADH, NADP/NADPH, FAD/FADH<sub>2</sub>) par des cellules intactes. Cependant, des effets physiologiques ont aussi été montrés pour presque toutes les molécules qui contiennent des nucléotides lorsqu'elles sont ajoutées *in vitro* ou injectées *in vivo*, laissant entrevoir la possibilité qu'elles soient toutes relâchées. En effet, plusieurs études montrent que divers types cellulaires répondent aux dinucléotides [106-109], sans qu'aucun récepteurs qui répondent uniquement à ces molécules n'aient encore été clairement identifiés. Cependant, certaines études montrent une capacité d'activer ou d'inhiber des récepteurs aux nucléotides [110-114] qui seront abordé à la section 1.3.2 du présent ouvrage. Des effets ont aussi été observés pour le NAD/NADH [115], le NADP/NADPH [116] et le FAD/FADH<sub>2</sub> [117, 118].

La famille des nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (NPPs), décrite ultérieurement, est théoriquement capable d'hydrolyser ces molécules et de générer des nucléotides [36, 106]. Dans le cas du  $NAD^+$ , les enzymes CD38, CD157 et les mono(ADP-ribosyl)transférases (ART) ont été identifiées à la surface de la membrane plasmique [119-124] et sont capables soit d'hydrolyser le NAD en ADP-ribose cyclique (cADPR) et en nicotinamide ou d'ajouter un groupement ADP-ribose à des protéines membranaires telles



que le récepteur P2X<sub>7</sub> [104]. Malheureusement peu d'études montrent la contribution relative des dinucléotides dans la génération de nucléotides dans le milieu extracellulaire.

### 1.3.1.3 Interconversion de nucléotides par des ecto-kinases.

Une troisième possibilité d'influencer la concentration de nucléotides dans le milieu extracellulaire est l'inter-conversion de nucléotides, c'est-à-dire la conversion d'un nucléotide en un autre, par des ecto-kinases présentes à la surface de certaines cellules. Ces enzymes peuvent favoriser l'accumulation ou prolonger la présence d'un nucléotide donné et influencer ainsi la signalisation par les nucléotides. Parmi ces enzymes, on retrouve l'adénylate kinase (AK ;  $ATP + AMP \rightleftharpoons 2ADP$ ) et la nucléoside diphosphate kinase (NDPK;  $NDP + N'TP \rightleftharpoons NTP + N'DP$ ) [55].

L'adénylate kinase est une enzyme généralement située dans le cytosol (AK1), l'espace inter-membranaire des mitochondries (AK2), la matrice mitochondriale (AK3) et au niveau du noyau (AK6). Une isoforme de la forme cytosolique de cette enzyme, AK1 $\beta$  est présente dans la membrane plasmique de différents tissus. Des études récentes montrent aussi une activité ecto-AK au niveau des cellules épithéliales pulmonaires, des cellules endothéliales vasculaires, des lymphocytes, des hépatocytes et des kératinocytes [55].

La NDPK, quant à elle, est une enzyme ubiquiste que l'on retrouve aussi à la membrane plasmique. Bien qu'on la retrouve aussi à l'intérieur de la cellule, cette enzyme possède une activité extra-cytosolique [55]. L'expression d'une ecto-NDPK a été montrée dans plusieurs types cellulaires (érythrocytes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, hépatocytes, lymphocytes et kératinocytes). Par contre, très peu d'études ont examiné l'influence que pouvaient avoir ces enzymes sur la concentration finale de nucléotides. Récemment quelques équipes ont commencé à étudier le métabolisme (conversion et dégradation) des nucléotides extracellulaires dans son ensemble [125, 126], mais il est encore difficile de connaître l'influence exacte de ces enzymes sur la concentration des nucléotides présents dans le milieu extracellulaire dans un système physiologique ou pathologique donné.

### 1.3.2 Récepteurs aux nucléotides extracellulaires

Comme nous venons de le voir, différents nucléotides, et molécules contenant des nucléotides, peuvent se retrouver à l'extérieur de la cellule. Il existe des récepteurs qui lient spécifiquement ces molécules et initient une réponse cellulaire. Quinze de ces récepteurs ont été clonés depuis le début des années 1990 et sont classés en deux grandes familles selon leur topologie membranaire, soit les récepteurs P2Y et les récepteurs P2X (Figure 2). À ces récepteurs spécifiques se sont récemment ajoutés trois récepteurs pouvant être activés à la fois par les cystéinyl-leucotriènes et les nucléotides uridyliques que je qualifierai de récepteurs « mixtes » (Figure 2).

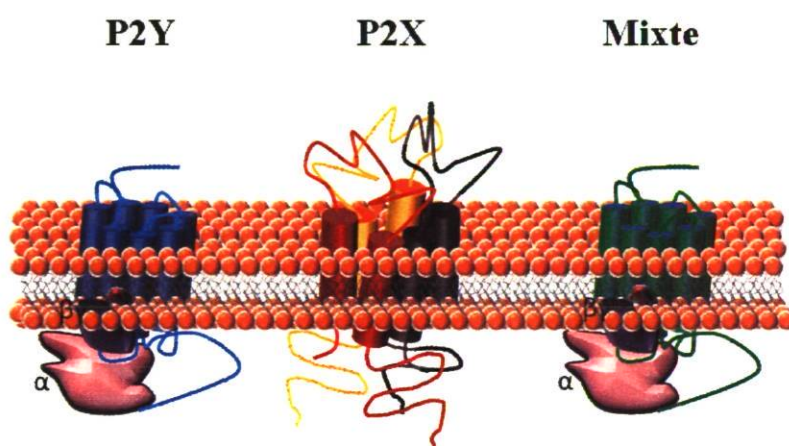


Figure 2 : Structure des récepteurs aux nucléotides.

#### 1.3.2.1 Récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y sont des récepteurs couplés à des petites protéines G trimériques (Figure 2) qui peuvent répondre à un nucléotide adénylique (ATP ou ADP) ou uridyliques (UTP ou UDP) [5]. La/les voie(s) de signalisation initiée(s) suite à l'activation des récepteurs P2Y varient en fonction du récepteur et impliquent les protéines  $G_q/G_{11}$ ,  $G_i/G_0$  ou  $G_s$  (voir tableau 1).



Actuellement huit de ces récepteurs ont été clonés chez les mammifères, soit les récepteurs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> et P2Y<sub>14</sub> (Tableau 1) [5]. Le récepteur P2Y<sub>11</sub> a été cloné et caractérisé seulement chez l'humain [127] et semble être absent chez les rongeurs [128]. Un récepteur ayant une certaine homologie de séquence a été proposé comme l'orthologue chez la grenouille *Xenopus* [129], mais ceci reste à être démontré. Les numéros manquants sont des orthologues d'un des récepteurs mentionnés ci-dessus (P2Y<sub>3</sub> est un orthologue aviaire de P2Y<sub>6</sub> et P2Y<sub>8</sub> un orthologue de grenouille de P2Y<sub>4</sub> [130, 131]), soit des récepteurs homologues mais qui ne répondent pas aux nucléotides dans des essais fonctionnels (P2Y<sub>5</sub>, P2Y<sub>7</sub>, P2Y<sub>9</sub>, P2Y<sub>10</sub>) [132-137]. Le récepteur P2Y<sub>11</sub> est préférentiellement activé par l'ATP, les récepteurs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>13</sub> par l'ADP, le récepteur P2Y<sub>4</sub> par l'UTP, le récepteur P2Y<sub>6</sub> par l'UDP et le récepteur P2Y<sub>2</sub> par l'ATP et l'UTP (Tableau 1). Certains de ces récepteurs peuvent aussi répondre à des dinucléotides [110]. Récemment, la capacité des récepteurs P2Y de former des hétéro-oligomères les uns avec les autres ainsi qu'avec les récepteurs P1 (décrit ultérieurement) a été décrite. Par exemple, le récepteur P2Y<sub>1</sub> peut former un homodimère ou des hétérodimères avec le récepteur P2Y<sub>11</sub> ainsi qu'avec les récepteurs à adénosine A<sub>1</sub> et A<sub>2a</sub> [138-142]. Des interactions entre P2Y<sub>2</sub>-A<sub>1</sub> et P2Y<sub>4</sub>-P2Y<sub>6</sub> ont aussi été décrites [143, 144]. Récemment, une étude de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) a montré que les récepteurs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> ainsi que A<sub>1</sub> et A<sub>2a</sub> peuvent être à proximité et suggèrent une potentielle interaction entre plusieurs récepteurs P1 et P2Y [142]. Ces interactions génèrent des récepteurs avec des propriétés modifiées, soit en termes d'affinité pour son ligand, de vitesse de désensibilisation ou d'interaction avec la protéine G sous-jacente [139, 141, 144]. Cependant, l'impact physiologique de ces interactions reste encore à être élucidé.

Tableau 1 : Récepteurs P2Y

Récepteur	Anciens noms	Agonistes	Antagonistes	Voies de signalisations	Références
P2Y <sub>1</sub>	P2Y	ADP, Ap <sub>3</sub> A, MRS2365	MRS2179 MRS2279 MRS2500	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; PLCβ	[9, 111, 145-151]
P2Y <sub>2</sub>	P2U	ATP, UTP Up <sub>4</sub> dC	suramine > RB2 ARC126313	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; possiblement G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> ; PLCβ	[9, 10, 152-155]
P2Y <sub>4</sub>	—	UTP	RB2 > suramine	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; possiblement G <sub>i</sub> ; PLCβ	[9, 156-159]
P2Y <sub>6</sub>	—	UDP (souris : UTP)	MRS2578	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; PLCβ	[9, 159-162]
P2Y <sub>11</sub>	—	ATP ARC67085	Suramine > RB2 NF157	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; G <sub>s</sub> ; PLCβ	[9, 127, 163]
P2Y <sub>12</sub>	P2T <sub>AC</sub> HORK3 SP1999	ADP LTE <sub>4</sub>	CANGRELOR ‡CLOPIDOGREL PRASUGREL INS50589 ARC67085 PSB0413 CT50547	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> ; ↓AMP <sub>c</sub>	[9, 164-173]
P2Y <sub>13</sub>	GPR86 GPCR94	ADP	MRS2211	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	[9, 174, 175]
P2Y <sub>14</sub>	GPR105	UDP-glucose UDP-galactose	UDP <sup>1</sup>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	[9, 176-179]

CANGRELOR™ (ARC6993 1MX) est produit par AstraZeneca; CLOPIDOGREL™ (Plavix) est produit et distribué par Bristol-Myer Squibb et Sanofi-Synthélabo (France) ; PRASUGREL™ (AZD6140) est produit et distribué par Daiichi Sankyo Co. et Eli Lilly; INS50589 est produit par Inspire.

<sup>1</sup>L'UDP semble agir comme agoniste et non comme antagoniste pour le récepteur P2Y<sub>14</sub> humain transfecté dans des cellules HEK293 et le récepteur endogène des cellules promyeloleucémique HL-60.

‡Le CLOPIDOGREL doit être métabolisé par le foie, il est donc seulement efficace *in vivo*.



### 1.3.2.2 Récepteurs P2X

Le second groupe de récepteurs aux nucléotides est composé de récepteurs canaux cationiques avec une perméabilité identique pour le sodium ( $\text{Na}^+$ ) et le potassium ( $\text{K}^+$ ) ainsi qu'une perméabilité significative pour d'autres cations tels le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Les récepteurs P2X sont composés de sous-unités ayant chacune deux domaines transmembranaires avec des extrémités N- et C- terminales intracellulaires et d'une boucle extracellulaire riche en résidus cystéines (11-14 cystéines conservées) possédant plusieurs sites de N-glycosylation [14, 38]. Les canaux fonctionnels semblent exister surtout sous une forme trimérique tel qu'illustré à la Figure 2 [180-182].

Sept récepteurs P2X sont connus, soit les récepteurs P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2X<sub>7</sub> (Tableau 2) [14, 38]. Contrairement aux récepteurs P2Y, ces récepteurs répondent surtout à l'ATP [14, 38] à l'exception de P2X<sub>7</sub> qui semble être capable de répondre à l'ADP et l'AMP suite à une première stimulation avec l'ATP [183]. Tous les récepteurs P2X peuvent former des homotrimères, ainsi que plusieurs hétérotrimères dont P2X<sub>1-2</sub> [181, 184], P2X<sub>1-3</sub> [180, 184], P2X<sub>1-4</sub> [185], P2X<sub>1-5</sub> [184, 186-188], P2X<sub>2-3</sub> [184, 189, 190], P2X<sub>2-6</sub> [184, 191], P2X<sub>4-5</sub>[184], P2X<sub>4-6</sub> [184, 192], P2X<sub>5-6</sub> [184] et P2X<sub>4-7</sub> [193], mais l'importance physiologique de ces hétéromères reste à établir.

Les récepteurs P2X<sub>1</sub> et P2X<sub>3</sub> sont rapidement désensibilisés (100-300 ms) alors que d'autres récepteurs P2X ont une sélectivité ionique différente selon le temps d'exposition à l'ATP [194, 195]. L'exemple le plus frappant de cette différence de sélectivité ionique est le récepteur P2X<sub>7</sub>. En effet, ce récepteur possède une réponse diphasique, où il laisse passer les ions  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  dans un premier temps, mais lorsqu'il est en présence prolongée d'ATP (1-2 minutes) il devient perméable aux molécules ayant une taille jusqu'à 900 Da [196, 197]. Des études récentes montrent que le récepteur P2X<sub>7</sub> interagit avec une protéine capable de former des hémicanaux, soit la pannexine-1, qui serait responsable du pore de 900 Da suite à une stimulation prolongée du récepteur P2X<sub>7</sub> [198, 199] et expliquerait cette réponse diphasique. Une étude a montré que P2X<sub>7</sub> pouvait aussi répondre à l'ADP et l'AMP lors de stimulation successive du récepteur [183].

Tableau 2 : Récepteurs P2X

Récepteur	Anciens noms	Agonistes	Antagonistes	Références
P2X <sub>1</sub>	P2X	ATP	TNP-ATP NF023 NF279 NF449 IpsI	[9, 200-206]
P2X <sub>2</sub>	—	ATP, Ap <sub>4</sub> A	PPADS, RB2 NF770	[9, 111, 207-209]
P2X <sub>3</sub>	—	ATP	TNP-ATP A-317491 NF110 IpsI	[9, 190, 210-214]
P2X <sub>4</sub>	—	ATP	TNP-ATP —	[9, 215, 216]
P2X <sub>5</sub>	—	ATP	Suramine PPADS —	[9, 217-219]
P2X <sub>6</sub>	P2X <sub>L1</sub> P2X <sub>M</sub>	ATP	—	[9, 220, 221]
P2X <sub>7</sub>	P2Z	ATP, BzATP, LL37	KN-62, KN-04 A438079 AZ11645373 GSK314181A MRS2427	[9, 196, 222-227]



### 1.3.2.3 Récepteurs aux cystéinyl-leucotriènes et aux nucléotides uridyliques

Récemment, des récepteurs « mixtes » capables de répondre aux nucléotides uridyliques (UDP, UDP-Glu ou UDP-Glc) ainsi qu'aux cystéinyl-leucotriènes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, etc.) ont été décrits [39, 40]. Ce groupe possédant une grande homologie avec les récepteurs P2Y [228] comprend les récepteurs CysLT<sub>1</sub>, CysLT<sub>2</sub> et le récepteur orphelin GPR17 (Tableau 3). La grande homologie avec les récepteurs P2Y pourrait expliquer la désensibilisation du récepteur CysLT<sub>1</sub> par l'ATP et l'UDP [229] ainsi que la capacité du MONTELUKAST™ et du PRANLUKAST™, deux antagonistes du récepteur CysLT<sub>1</sub>, de pouvoir bloquer les récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>6</sub> [230]. Finalement, le récepteur P2Y<sub>12</sub> humain, connu comme un récepteur à l'ADP, serait en mesure de mobiliser le calcium en présence du cystéinyl-leucotriène E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) et du 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate (PRPP) [171]. Ceci suggère que certains autres récepteurs P2Y pourraient être inclus dans cette catégorie de récepteurs « mixtes ». Finalement, bien que plusieurs types cellulaires expriment des récepteurs aux cystéinyl-leucotriènes dont les éosinophiles (CysLT<sub>1</sub> et CysLT<sub>2</sub>), les macrophages (CysLT<sub>1</sub> et CysLT<sub>2</sub>), les neutrophiles (CysLT<sub>1</sub>) et les leucocytes du sang périphérique (CysLT<sub>2</sub>) [228], la détermination de la contribution de ces derniers à la signalisation par les nucléotides reste difficile avec les connaissances actuelles. Particulièrement dans un contexte *in vivo* où différents médiateurs sont présents simultanément.

### 1.3.2.4 Expression des récepteurs aux nucléotides

L'expression des récepteurs aux nucléotides est ubiquiste. En effet, toutes les cellules animales étudiées à ce jour expriment l'un ou l'autre de ces récepteurs et peuvent donc répondre aux nucléotides présents dans leur environnement. De plus, la majorité des cellules animales expriment simultanément plusieurs récepteurs aux nucléotides. Par exemple, les macrophages les expriment presque tous (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>14</sub>, CysLT<sub>1</sub> et CysLT<sub>2</sub>), alors que d'autres cellules en expriment moins, comme les plaquettes qui n'expriment que les récepteurs P2X<sub>1</sub>, P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> [14, 50, 228, 231-235]. Il semble que les autres organismes vivants (végétaux et

microorganismes) peuvent aussi répondre aux nucléotides [236], mais les récepteurs impliqués demeurent essentiellement inconnus [15, 237].

La grande variété d'oligomérisation et d'hétéro-oligomérisation possible entre les récepteurs P2 [138-141, 143, 144, 184] ainsi que la présence de formes d'épissages alternatifs pour plusieurs récepteurs P2 [38, 238-240] suggèrent une sophistication de la perception des nucléotides dans le milieu. Cependant, nous ne savons pas quel impact peuvent avoir ces mécanismes ni s'il existe des différences d'un type de cellules à l'autre.

Tableau 3 : Récepteurs « mixtes »

Récepteur	Autres noms	Agonistes	Antagonistes	Références
CysLTR1	LTD <sub>4</sub> -R HG55	LTC <sub>4</sub> LTD <sub>4</sub> LTE <sub>4</sub> UDP	MONTELUKAST ZAFIRLUKAST PRANLUKAST BAY u9773 MK-571	[241-247]
CysLTR2	HG57 hGPCR21	LTC <sub>4</sub> LTD <sub>4</sub> LTE <sub>4</sub> UDP	BAY u9773	[247-251]
GPR17	—	LTC <sub>4</sub> LTD <sub>4</sub> UDP-Glu UDP-Glc	CANGRELOR MRS2179	[39, 252, 253]

MONTELUKAST™ (L-706,631; MK-0476; SINGULAIR™) est produit par Merck; ZAFIRLUKAST™ (ICI 204,219; ACCOLATE™) et CANGRELOR™ (ARC69931MX) sont produits par AstraZeneca; PRANLUKAST™ (Onon; ONO-RS-411; ONO-1078; SB 205312; ULTAIR™) est produit par Ono Pharmaceutical Co.



### **1.3.3 Élimination des nucléotides extracellulaires par des ecto-nucléotidases**

La grande diversité de récepteurs aux nucléotides présents chez une même cellule comme c'est le cas du macrophage, ou la présence du même récepteur sur deux cellules voisines suggère une régulation fine de cette signalisation. L'expression de certains récepteurs aux nucléotides peut être modulée dans le temps [254, 255] ou par certains agents [255-259]. Ces mécanismes peuvent contrôler le niveau de signalisation par les nucléotides, mais sont relativement lents. C'est probablement pourquoi il existe aussi plusieurs enzymes capables de déphosphoryler les nucléotides extracellulaires ou ecto-nucléotidases, et ainsi éliminer ou modifier rapidement les agonistes de récepteurs P2.

L'existence des ecto-nucléotidases a été décrite presque en même temps que les nucléotides [260]. Pendant longtemps, on croyait qu'il existait trois enzymes distinctes, l'ecto-ATPase, l'ecto-ADPase et la 5'-nucléotidase (AMPase), qui hydrolysait respectivement l'ATP, en ADP, en AMP puis en adénosine. Aujourd'hui, plusieurs enzymes hydrolysant la chaîne de phosphate des nucléotides ont été caractérisées. Ces enzymes sont soit présentes au niveau de la membrane plasmique ou soit sous forme soluble et peuvent être séparées en cinq grandes familles, soit les ecto-nucléosides triphosphates diphosphohydrolases (NTPDases), les nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (NPPs), l'ecto-5'-nucléotidase, les phosphatases alcalines (ALP) et les phosphatases acides (AP). La structure, la spécificité de substrat et l'activité biochimique de ces enzymes sont très différentes d'une famille à l'autre.

#### **1.3.3.1 Nucléosides triphosphates diphosphohydrolases (NTPDases)**

La famille des NTPDases (EC 3.6.1.5) est apparentée aux apyrases découvertes chez la pomme de terre au milieu des années 1940 [261, 262]. Le terme NTPDase est réservé aux enzymes de mammifères, mais on retrouve des enzymes de la même famille chez plusieurs autres organismes vivants tels que les vertébrés, les invertébrés, les plantes, et certains

organismes monocellulaires comme les levures et les protozoaires [263-265], mais elles sont appelées apyrase dans ce cas.

La première NTPDase fut découverte en 1980 dans les grains de zymogènes du pancréas de porc et fut nommée adénosine triphosphate diphosphohydrolase (ATPDase) [266]. Des études subséquentes ont montré sa présence dans divers tissus de mammifères [266-273]. À peu près à la même époque, une ecto-ATPase des tubules T des muscles squelettiques et du foie a été identifiée [274-277] et correspond à la NTPDase2. Au fur et à mesure du séquençage des génomes de différentes espèces, plusieurs autres NTPDases ont pu être identifiées (Tableau 4). En 1999, la nomenclature reconnue actuellement fut mise en place [278] et aujourd'hui, nous savons que la plupart des effets décrits pour l'ecto-ATPDase et l'ecto-ATPase correspondent à la NTPDase1 et NTPDase2, respectivement. Cependant, ces effets auraient pu aussi correspondre à un autre membre de la famille des NTPDases (Tableau 4) [12, 279]. Au début de mes études doctorales, six de ces enzymes avaient été décrites soit les NTPDase1 à NTPDase6 [265].

Les NTPDases sont des enzymes membranaires présentant un site catalytique extracytosolique et hydrolysant de façon séquentielle les phosphates  $\gamma$  et  $\beta$  des nucléosides tri- et diphosphates (Figure 3) [86, 279-281]. Ces enzymes possèdent plusieurs caractéristiques communes. Premièrement, cinq régions conservées ACR, « apyrase-conserved region », sont présentes [12]. Ces régions conservées sont aussi retrouvées chez d'autres membres de la famille ne provenant pas de mammifères comme l'apyrase de pomme de terre par exemple [282]. Les régions conservées ACR1 et ACR4 contiennent un site de liaison des phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  avec la séquence consensus  $([I/L/V]X[I/L/V/C]DXGG[T/S/G] [T/S/G]XX[R/K/C])$  de type « actine-Hsp70-hexokinase » [12, 282-284]. De plus, ces enzymes requièrent des cations divalents calcium ( $Ca^{2+}$ ) ou magnésium ( $Mg^{2+}$ ) pour leur activité catalytique [86, 279]. Il n'est pas encore clair si pour toutes les NTPDases, ces ions se lient directement à l'enzyme ou s'ils se lient au substrat comme le suggérait une des premières études cinétiques qui avait montré que l'ATPDase porcine, principalement la NTPDase1, utilise l'ATP sous sa forme divalente



Ca-ATP<sup>2-</sup> ou Mg-ATP<sup>2-</sup> [280]. Cependant, la cristallisation récente de la NTPDase2 semble supporter un site actif pour le Ca-ATP [285].

Tableau 4 : Nucléosides triphosphates diphosphohydrolases

Enzyme (gène)	Autres noms	Substrats	Localisation cellulaire	Référence
NTPDase1 ( <i>Entpd1</i> )	CD39 ATPDase ecto-apyrase	NTP ≈ NDP	membrane plasmique	[286-289]
NTPDase2 ( <i>Entpd2</i> )	CD39L1 ecto-ATPase	NTP	membrane plasmique	[290-293]
NTPDase3 ( <i>Entpd3</i> )	CD39L3 HB6	NTP > NDP	membrane plasmique	[294-296]
NTPDase4 ( <i>Entpd4</i> )	UDPase LALP70	NDP > NTP (UDP>CDP=UTP>TDP> GDP>TTP=GTP) <i>pas nucleotides adénylés</i>	membrane golgi, lysosome	[297, 298]
NTPDase5 ( <i>Entpd5</i> )	CD39L4 ER-UDPase PCPH	NDP (UDP>GDP>CDP>ADP)	membrane plasmique, membrane vésiculaire forme soluble	[294, 299-301]
NTPDase6 ( <i>Entpd6</i> )	CD39L2	NDP (GDP>UDP>ADP)	membrane plasmique, membrane vésiculaire forme soluble	[294, 302-304]
NTPDase7 ( <i>Entpd7</i> )	LALP1	NTP (UTP=GTP=CTP>CDP)	membrane vésiculaire	[305]
NTPDase8 ( <i>Entpd8</i> )	Liver canicular ecto-ATPase hATPDase	NTP > NDP	membrane plasmique	[306-308]

La structure des NTPDases (Figure 3A) révèle un ancrage dans la membrane plasmique grâce à une ou deux régions transmembranaire(s). Les NTPDase1, 2, 3 et 8 possèdent deux régions transmembranaires aux extrémités N- et C- terminales avec un site actif orienté vers le milieu extracellulaire (Chapitre 2; [279, 289-291, 295, 307, 309]). Les autres NTPDases (NTPDase4-7) sont soit ancrées dans la membrane de vésicules intracellulaires par un (NTPDase5 et 6) ou deux (NTPDase4 et 7) domaine(s) transmembranaire(s), avec leur site actif dirigé vers la lumière des vésicules [299, 300, 302-305]. Les NTPDase5 et -6 peuvent également être clivées par des protéases et relâchées dans le milieu extracellulaire [299, 300, 302, 303].

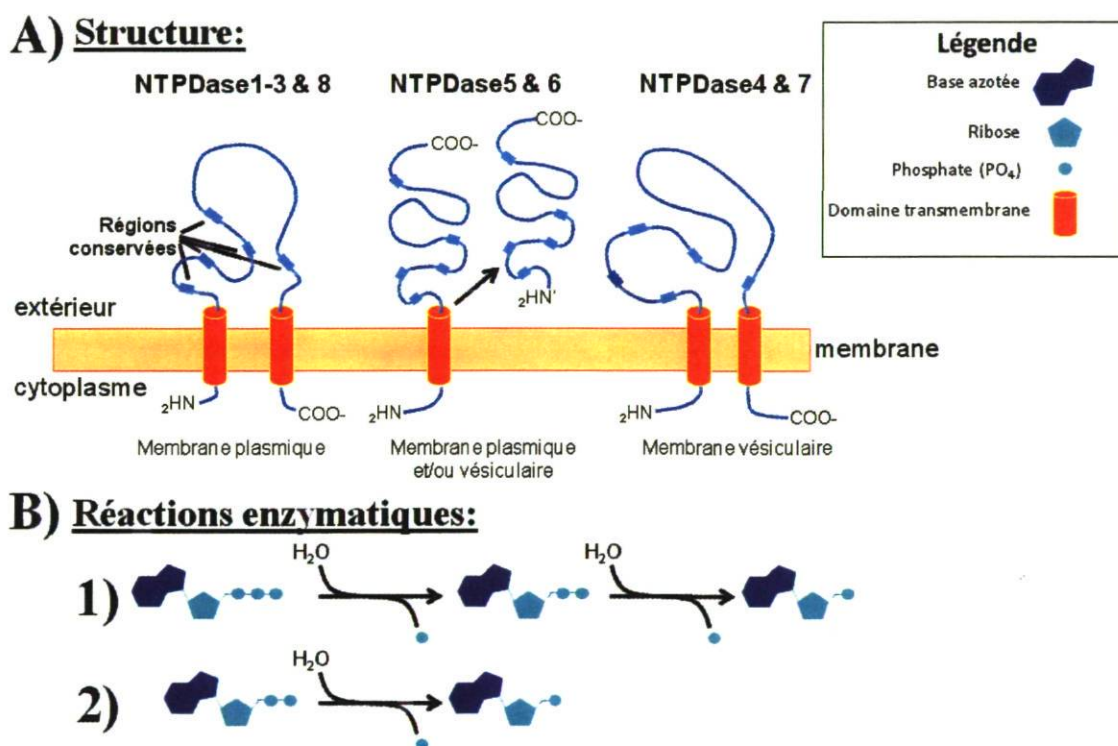


Figure 3 : Structure et activité des nucléosides triphosphates diphosphohydrolases.

A) Inspiré de l'article publié dans Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol en 2000 par Herbert Zimmermann [310].



Les diverses NTPDases peuvent hydrolyser les nucléosides triphosphates et diphosphates séquentiellement en nucléosides monophosphate (Figure 3B), mais la capacité d'hydrolyser un nucléotide précis varie d'une NTPDase à l'autre comme on peut le voir au Tableau 4. Par exemple, la NTPDase2 préfère les nucléotides triphosphates tels que l'ATP et n'hydrolyse que très lentement les nucléotides diphosphates (Chapître 3). Les NTPDase4-6 préfèrent les nucléotides diphosphates alors que la NTPDase1 peut hydrolyser aussi bien les nucléosides triphosphates que diphosphates. Ces différences de spécificité de substrats ne sont pas encore complètement expliquées, mais plusieurs études ont permis d'identifier des acides aminés importants pour l'activité [311-313], de mettre en évidence l'importance des régions transmembranaires [312, 314-316] et de l'environnement membranaire [317] pour l'activité catalytique des NTPDases. Récemment, la cristallisation du domaine extracellulaire de la NTPDase2 de rat [285] et la caractérisation d'un anticorps monoclonal bloquant l'activité de la NTPDase3 humaine ont permis de proposer une structure en trois dimensions des NTPDases (Figure 4). Cependant, cette structure ne tient pas compte de l'importance des domaines membranaires et de l'environnement membranaire dans l'activité de ces enzymes. La formation d'une structure quaternaire homo-dimérique à homo-tétramérique a été montrée pour les NTPDase1-3 et semble être importante pour l'activité de ces enzymes [12, 309, 318, 319].

Plusieurs modifications post-traductionnelles ont été rapportées pour l'une ou l'autre des NTPDases retrouvées dans la membrane plasmique dont la N-glycosylation [287, 288, 319, 320], la palmitoylation [321], l'oxydation de résidus méthionines et tyrosines [322], la phosphorylation [323], l'acétylation [324] et le clivage protéolytique [312, 325]. De plus, des épissages alternatifs ont été rapportés pour la NTPDase1 [279, 326], la NTPDase2 [279, 327, 328] et la NTPDase3 [329]. L'impact physiologique des épissages et des modifications post-traductionnelles au niveau de l'activité ou de la signalisation par les nucléotides reste à être établi.

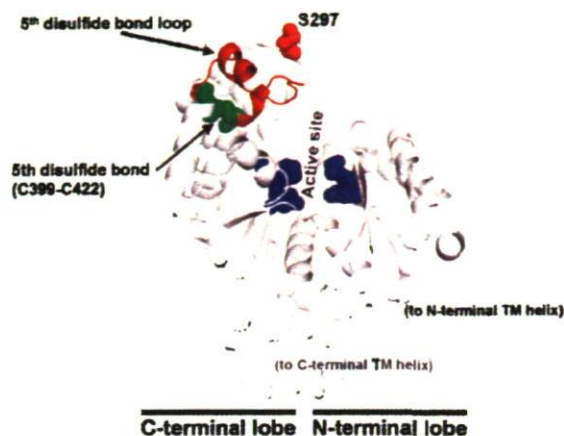


Figure 4 : Structure tridimensionnelle des NTPDases.  
Reproduction de Munkonda et al. [330]

Les NTPDases sont exprimées de façon constitutive dans plusieurs tissus, mais quelques études montrent une régulation transcriptionnelle des NTPDase1 et NTPDase2 dans certains contextes physiologiques ou pathologiques [12]. Par exemple, l'expression de la NTPDase1 est augmentée dans les mélanomes en différenciation [331] ou dans les cellules épithéliales pigmentaires de la rétine suite à l'activation du récepteur P2Y<sub>1</sub> [332]. La NTPDase1 est modulée à la baisse en présence de glucocorticoïdes [333]. La NTPDase2 peut être induite par le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine dans une lignée d'hépatocytes de souris et par la FSH et l'AMPC dans les cellules de Sertoli chez le rat [334-336]. Récemment une étude a décrit la réduction de l'expression de la NTPDase2 par l'IL-6, une cytokine retrouvée lors de cirrhose biliaire. Cette diminution de la transcription de la NTPDase2 serait possible grâce à trois éléments de réponse à l'IL-6 retrouvés en amont du site d'initiation de la transcription [337]. Cependant, la régulation transcriptionnelle et la régulation de l'expression des NTPDases demeure encore essentiellement inconnue.

La présence des NTPDases à la surface cellulaire est considérée comme d'importance majeure dans la modulation de la signalisation par les nucléotides puisqu'elle permet de contrôler la disponibilité des agonistes des récepteurs P2. Malheureusement, très peu d'études démontrent la capacité directe de moduler la signalisation par les nucléotides [12]. Toutefois la génération de souris déficiente en NTPDase1 [338, 339] a permis de montrer que cette enzyme prévient la désensibilisation du récepteur P2Y<sub>1</sub> qui est important pour



que cette enzyme prévient la désensibilisation du récepteur P2Y<sub>1</sub> qui est important pour l'hémostase primaire [338, 339] et le tonus vasculaire [340] ainsi que celle du récepteur P2X<sub>1</sub> [341]. Il commence à avoir des études qui montrent, avec ces mêmes souris, l'implication physiologique de la NTPDase1 dans le contrôle d'autres récepteurs aux nucléotides. Ainsi chez la souris, dans les muscles lisses vasculaires où elle est l'ecto-nucléotidase majeure, la NTPDase1 module l'activation du récepteur P2Y<sub>6</sub> [342] et participe au contrôle du récepteur P2Y<sub>2</sub> de l'endothélium vasculaire [340]. Dans le cas de la NTPDase2, qui est exprimée par des cellules adventitielles des vaisseaux et par les péricytes, cette enzyme favoriserait l'activation de l'agrégation plaquettaire lors d'un bris vasculaire. En effet, l'ajout d'ATP en présence de cette enzyme cause une accumulation d'ADP et l'augmentation de l'agrégation plaquettaire [343]. Cependant le manque d'outils disponibles n'a pas encore permis de montrer l'influence exacte des autres NTPDases sur la signalisation par les nucléotides. En effet, bien que l'inhibition des NTPDases ait été décrite, la plupart des molécules qui réduisent l'activité de ces enzymes affectent aussi les récepteurs P2 [12, 344] et l'interruption génique des autres NTPDases n'a toujours pas été décrite.

Finalement, les NTPDases pourraient avoir des fonctions distinctes de leur activité catalytique. Récemment, une interaction avec la protéine échafaud RanBPM (ou RanBP9) capable d'interagir avec plusieurs protéines cytoplasmiques et membranaires a été décrite [345]. Il semble que grâce à cette interaction, la NTPDase1 soit capable de moduler la voie de signalisation par les protéines ERK et Ras [12].

### **1.3.3.2 Nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (NPPs)**

Une deuxième famille importante d'ecto-nucléotidases est constituée des nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (EC 3.1.4.1; EC 3.6.1.9; EC 3.6.1.8). Ces enzymes possèdent un seul domaine transmembranaire avec une extrémité N-terminale intracellulaire (Figure 5), mais des formes solubles de NPP1 et NPP2 ont été décrites [346-348].

Il existe sept membres de cette famille, soient les NPP1-7 (Tableau 5), mais seules les NPP1, NPP2 et NPP3 peuvent hydrolyser les nucléotides et molécules contenant des nucléotides [13, 55, 268, 349, 350]. En effet, ces enzymes peuvent libérer des nucléosides monophosphate d'une variété de nucléotides, de nucléotides couplés à un hexose (glucose ou galactose) et de dinucléotides (Figure 5 ;[13, 349]). Par exemple, ces enzymes catalysent l'hydrolyse de l'ATP en AMP et en pyrophosphate (PP<sub>i</sub>), de l'UDP-glucose en UMP et glucose-phosphate, de l'Ap<sub>3</sub>A en AMP et en ADP, etc. (voir Figure 5). Comparativement aux NPP1 et 3, la NPP2 est une faible phosphodiesterase [350], et possède plutôt une activité lysophospholipase-D [346] comme pour les NPP6 et 7. Les substrats des NPP4 et 5 demeurent inconnus. Finalement, la NPP2 est un zymogène, c'est-à-dire une pré-pro-enzyme clivée par une protéinase de type furine, qui est sécrété plutôt que d'être une protéine membranaire [346].

Tableau 5 : Nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases

Enzyme	Autres noms	Substrats	Localisation cellulaire	Références
NPP1	PC-1, PDNP1, CD203a	N <sub>p</sub> <sub>n</sub> N NTP	Membrane plasmique	[36, 351-353]
NPP2	PD-1α, PDNP2, autotaxin, CD203b	N <sub>p</sub> <sub>n</sub> N NTP LPC	Forme soluble (sécrétée)	[36, 346, 350, 354, 355]
NPP3	PD-1β, PDNP3, gp130 <sup>RB13-6</sup> , CD203c	N <sub>p</sub> <sub>n</sub> N NTP	Membrane plasmique	[36, 356, 357]
NPP4	—	—	Membrane plasmique	[358]
NPP5	—	—	Membrane plasmique	[358]
NPP6	—	LPC GPC SPC	Membrane plasmique	[359]
NPP7	Alk-SMase	LPC	—	[360]



Les NPP1-3 participent à un large éventail de fonctions physiologiques incluant le recyclage des nucléotides, la modulation de la signalisation P2, la régulation des niveaux de pyrophosphate extracellulaire (PP<sub>i</sub>; important dans la minéralisation osseuse) et la motilité cellulaire [361]. Une expression aberrante des NPPs semble provoquer plusieurs pathologies dont une minéralisation osseuse altérée et l'invasion tumorale [361]. Ceci n'est pas surprenant car les NPP1-3, avec leur activité catalytique (Figure 5), peuvent servir de pourvoyeur de nucléotides suite à l'hydrolyse de dinucléotides, de source de pyrophosphate, d'enzyme hydrolysant les nucléotides triphosphates et de source d'AMP. L'AMP peut à son tour être hydrolysé en adénosine par d'autres enzymes et servir de signal comme nous le verrons ultérieurement. Cependant très peu d'études tiennent compte de cette multifonctionnalité des NPPs dans un contexte physiologique ou pathologique, ce qui explique peut-être que la fonction exacte des NPPs demeure essentiellement inconnue à ce jour.

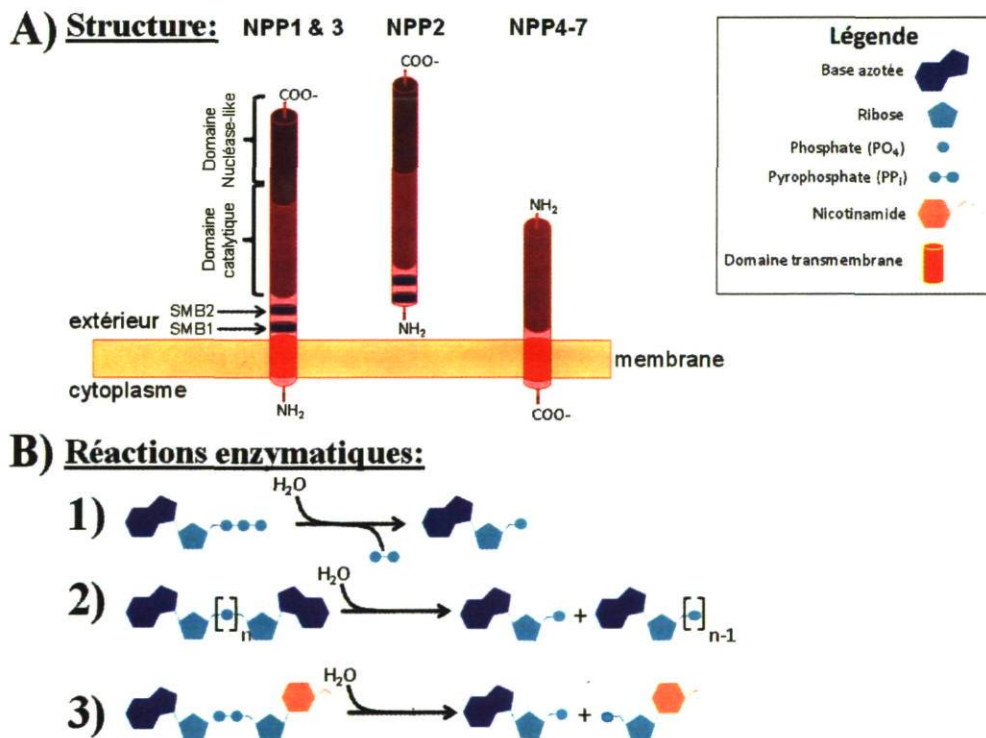


Figure 5 : Structure et activité des nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases.

A) inspiré de l'article publié dans la revue « Purinergic signalling » en 2006 par Cristiana Stefan. [13]

### 1.3.3.3 Ecto-5'-nucléotidase (CD73)

Les 5'-nucléotidases composent une famille de nucléotidases décrite pour la première fois en 1934 [260] et comportant sept membres chez l'humain [55]. Ces enzymes sont surtout localisées dans le cytosol à deux exceptions près, l'une est présente dans la matrice mitochondriale et l'autre est ancrée dans la membrane plasmique par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) à l'extrémité C-terminale de la protéine [362]. Cette dernière est connue sous le nom d'ecto-5'-nucléotidase (EC 3.1.3.5), ou CD73. Il s'agit d'une métalloenzyme liant le zinc ( $Zn^{2+}$ ) constituée d'un dimère de deux glycoprotéines liées par des interactions non-covalentes [363] et hydrolysant l'AMP en adénosine avec un  $K_m$  de l'ordre du micromolaire ( $\mu M$ ) [279, 362, 364]. L'AMP est un produit de dégradation de l'ATP par des NTPDases et des NPPs, mais peut également provenir de la dégradation de l'AMP<sub>c</sub> comme nous l'avons vu précédemment.

L'activité de l'ecto-5'-nucléotidase est une source importante d'adénosine extracellulaire dans plusieurs tissus [279, 365-367]. En effet, des études récentes, utilisant des souris déficientes en cette enzyme (CD73<sup>-/-</sup>), ont montré une altération de certaines fonctions physiologiques associées à l'activation d'un récepteur à l'adénosine telles que le contrôle de la boucle de rétroaction nécessaire aux fonctions rénales, le maintien de la perméabilité vasculaire lors de l'hypoxie, la protection de l'intégrité pulmonaire dans des modèles de lésions du poumon et la modulation de la réponse immune [55, 368-370]. L'ecto-5'-nucléotidase semble donc servir de point de contrôle à la production d'adénosine à partir d'AMP extracellulaire. Cependant deux autres familles d'enzymes sont aussi capables d'hydrolyser les nucléosides monophosphates soit les phosphatases alcalines et les phosphatases acides.

### 1.3.3.4 Phosphatases alcalines (ALP)

Les phosphatases alcalines (EC 3.1.3.1) sont une famille d'enzymes ubiquistes présentes dans plusieurs organismes vivants et capables de déphosphoryler une variété de composés organiques possédant des liaisons phosphomonoesters et autres composés phosphorylés



incluant les glucoses phosphates, les pyrophosphates,  $\beta$ -glycérol-phosphates et les nucléosides phosphates (ATP, ADP et AMP) pour relâcher un phosphate inorganique [371, 372]. Ces enzymes ont une activité optimale à des pH alcalins chez les mammifères (8-11), d'où leur nom [372]. À ce jour, nous connaissons quatre de ces enzymes chez l'humain et six chez la souris. La plupart de ces enzymes sont exprimées spécifiquement dans un tissu où elles se retrouvent liées à la membrane plasmique (ex. foie et rein, intestin ou placenta) via un ancre GPI, comme c'est le cas pour l'ecto-5'-nucléotidase. Cependant, une de ces enzymes la phosphatase alcaline non-spécifique à un tissu (*TNAP* ou *ALPL* chez l'humain ou *akp-2* chez la souris) est exprimée par plusieurs cellules de plusieurs tissus [372]. Cette enzyme peut participer à la génération d'adénosine comme cela a été montré dans les voies respiratoires [366] et certains autres tissus [372]. L'importance des phosphatases alcalines dans le métabolisme des nucléotides dans un contexte physiologique demeure largement inexplorée.

### 1.3.3.5 Phosphatases acides (AP)

Les phosphatases acides (EC 3.1.3.2), au nombre de sept, sont surtout retrouvées au niveau des lysosomes et peuvent hydrolyser les liaisons phosphomonoesters comme les phosphatases alcalines décrites précédemment, mais à des pH acides. Bien qu'il n'existe aucune étude montrant clairement lesquelles de ces enzymes participent à la dégradation des nucléotides extracellulaires, deux d'entre elles possèderaient une région extracellulaire, soit la phosphatase acide prostatique (PAP) [373] et la phosphatase acide-like 2 (ACPL2). Cette dernière a seulement été décrite dans des études génomiques et aucune démonstration de son activité ecto-nucléotidasique n'a encore été publiée [374, 375]. Des études récentes ont montré que la phosphatase acide prostatique (PAP), un marqueur soluble du cancer de la prostate, pouvait être exprimée par plusieurs autres types cellulaires [376] et possédait une forme épissée attachée à la membrane plasmique (TM-PAP) capable d'hydrolyser l'AMP extracellulaire en adénosine [377].

La forme sécrétée de cette enzyme (PAP), peut déphosphoryler le  $\beta$ -glycérophosphate, l'acide lysophosphatidique, les acides aminés phosphorylés et les nucléotides

5'-monophosphates (voir références dans [377]) avec une activité optimale dans une large fourchette de pH (entre 3 et 8). De même, la forme membranaire (TM-PAP) peut hydrolyser une grande variété de nucléotides monophosphate tels que l'AMP, le CMP, le GMP, l'IMP, l'UMP et le XMP, mais aussi d'autres esters monophosphates tels que les phospho-tyrosines, les phospho-sérines, le  $\beta$ -glycerophosphate, ou le glucose-6-phosphate [373, 378, 379]. Contrairement aux phosphatases alcalines, cette enzyme, qu'elle soit soluble ou membranaire, n'hydrolyse pas l'ATP ou l'AMPc [373, 378, 379]. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de connaître la distribution exacte des phosphatases acides et leur importance relative dans le métabolisme des nucléotides extracellulaires. Une étude récente suggère qu'elle participe bien à la production d'adénosine car en présence de PAP ils ont observé une diminution de la douleur grâce à l'activation augmentée d'un récepteur à l'adénosine [377].

#### **1.3.3.6 Autres ecto-nucléotidases potentielles**

En plus des cinq grandes familles d'ecto-nucléotidases présentées ci-dessus, mentionnons aussi les nucléotidases activées par le calcium (CAN) [380] qui sont des enzymes récemment découverte chez le rat [381] et l'humain [382] et qui sont homologues aux apyrases salivaires d'insectes hématophages, comme les tiques, les puces, les moucheron et la mouche des sables. Ces enzymes peuvent hydrolyser les nucléosides diphosphates (UDP > GDP >>> ADP et CTP) en présence de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et sont extrêmement stables [380]. Chez le rat, cette enzyme semble être localisée au réticulum endoplasmique [381] alors qu'elle pourrait être présente au niveau de la membrane plasmique chez l'humain [382], mais cela reste à être démontré. De plus, aucune étude n'a pu montrer l'implication de cette enzyme dans la signalisation par les nucléotides, bien que l'utilisation d'une forme soluble soit envisagée pour prévenir l'agrégation plaquettaire dépendante de l'ADP et la formation de thrombus chez l'humain [380]. Finalement la  $F_1F_0$  ATP synthétase généralement trouvée au niveau des mitochondries, a été observée au niveau de la membrane plasmique de certaines cellules tumorales mais il n'y a encore aucune preuve de sa participation dans la synthèse d'ATP extracellulaire ou dans la signalisation par les nucléotides [55].



### 1.3.4 Nucléosides extracellulaires

Comme nous venons de le voir, les nucléotides relâchés dans le milieu extracellulaire peuvent être rapidement métabolisés en nucléosides en présence de certaines ectonucléotidases. Lorsque le nucléoside adénosine est généré, il peut à son tour activer quatre récepteurs spécifiques, les récepteurs de la famille P1. Les nucléosides peuvent aussi être métabolisés par des ecto-enzymes ou encore réintégrer la cellule via des transporteurs ENTs ou CNTs. Les transporteurs de nucléosides passifs ou équilibrants (ENT) peuvent aussi permettre la libération d'adénosine dans le milieu extracellulaire.

#### 1.3.4.1 Récepteurs aux nucléosides P1

Quatre récepteurs capables de répondre à l'adénosine ont été clonés et caractérisés, soient les récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$  et  $A_3$  (Tableau 6). La nomenclature des récepteurs P1 est encore peu utilisée car seulement des récepteurs répondant à l'adénosine ont été caractérisés. Ces récepteurs peuvent soit activer, via la protéine  $G_s$  ( $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$ ), ou inhiber, via la protéine  $G_i$  ( $A_1$ ,  $A_3$ ), la voie de l'AMPc. Le récepteur  $A_{2b}$  est aussi associé à la protéine  $G_q$  et peut transmettre le signal via d'autres voies impliquant la phospholipase C (PLC), la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et les « mitogen-activated protein kinases » (MAPK) [11].

Il n'est pas impossible que des récepteurs orphelins ou des récepteurs déjà connus puissent aussi répondre à d'autres nucléosides mais il n'en existe aucune démonstration à ce jour. Cependant, certains effets physiologiques de d'autres nucléosides comme l'inosine et la guanosine ont été rapportés. L'inosine qui résulte principalement de la dégradation de l'adénosine par l'adénosine désaminase (ADA) aurait un effet protecteur [383-385]. Cet effet protecteur serait probablement dû à une certaine capacité de l'inosine à activer des récepteurs à l'adénosine tels que  $A_1$  [386, 387] et  $A_3$  [384, 387, 388]. Néanmoins, l'inhibition de l'ADA augmente l'activation des récepteurs à l'adénosine [389, 390] et l'affinité de l'adénosine supérieure à celle de l'inosine pour les mêmes récepteurs [387] suggèrent que l'inosine serait inactive, ou peu active. En condition ischémique ou lors d'un

choc septique les concentrations d'inosine peuvent atteindre 1 mM dans certains tissus [384]. À ces fortes concentrations, l'inosine joue probablement un rôle non négligeable. L'inosine pourrait aussi jouer son rôle protecteur en réintégrant la cellule via des transporteurs [385]. De même, quelques études montrent un effet trophique et prolifératif du guanosine extracellulaire [391] qui proviendrait probablement de la déphosphorylation du GTP relâché dans le milieu extracellulaire. Encore une fois, il manque de preuve permettant d'affirmer l'importance physiologique du guanosine extracellulaire et d'infirmer la possibilité d'un rôle intracellulaire comme pour l'inosine. En effet, les seuls indices à notre disposition sont une diminution des effets du guanosine extracellulaire par l'ajout d'antagonistes des récepteurs P1 et une absence de réponse à l'inhibition des ENTs par le NBTI et le dipyridamole [391].

L'importance des récepteurs P1 répondant à l'adénosine dans une panoplie de fonctions physiologiques et dans diverses pathologies a fait l'objet d'une littérature imposante [29, 392-395]. L'adénosine est surtout associée à des fonctions de protection, de régénération des tissus [29] et de répression de la réponse immune [392]. En effet, l'adénosine peut, entre autres, augmenter le rapport de l'oxygène fourni sur l'oxygène consommé, protéger des dommages causés par l'ischémie, initier une réponse anti-inflammatoire et promouvoir l'angiogenèse [29]. Ces effets sont généralement en opposition avec ceux décrits pour les nucléotides. Ce dernier fait est intéressant car il suggère une balance entre l'effet des nucléotides relâchés et de l'adénosine provenant en bonne partie de l'hydrolyse de ces nucléotides par certaines ecto-nucléotidases. En absence de certaines de ces enzymes, les effets dépendants de l'adénosine sont réduits ou absents dans plusieurs tissus [366, 370, 372, 377, 396].



Tableau 6 : Récepteurs aux nucléosides ou récepteurs P1

Récepteur	Autres noms	Agonistes	Antagonistes	Références
A <sub>1</sub>	RDC7	Adénosine NECA CHA CCPA	caféine CGS 15943A DPCPX PSB-36 SLV320 BG9928 ROLOFYLLINE	[397-407]
A <sub>2a</sub>	RDC8	Adénosine NECA CGS 21680 2-CN-Ado	caféine CGS 15943 ZM 241385 SCH 412348 SCH-442416 KW-6002 MSX-3	[402, 405, 407-411]
A <sub>2b</sub>	RFL9	Adénosine NECA CGS 21680 BAY 60-6583	caféine CGS 15943 MRS1706 PSB1115	[405, 407, 408, 412-414]
A <sub>3</sub>	GPCR2	Adénosine NECA CL-IBMECA	MRS 1191 MRS 1220 MRS 1334	[405, 415-419]

ROLOFYLLINE (KW-3902) provient de Merck. Des antagonistes du récepteur A<sub>2a</sub> de première génération comme le SCH 58261 furent remplacés par le SCH 420814.

#### 1.3.4.2 Récepteurs à l'adénine

Récemment, deux nouveaux récepteurs AdeR1 et AdeR2 répondant à la base azotée adénine et liés à la protéine G<sub>i</sub> ont été décrits. Le premier récepteur (AdeR1) a été identifié par criblage des récepteurs orphelins chez le rat en 2002 [420] et possède un orthologue potentiel chez la souris soit la protéine hypothétique MrgA10. Cependant, cette dernière n'a pas encore été caractérisée. L'ARN<sub>m</sub> correspondant à AdeR1 est détecté principalement dans les petits neurones du ganglion spinal, mais aussi au niveau du cortex cérébral, de l'hypothalamus, des poumons, des leucocytes du sang périphérique et des ovaires [420]. L'injection intrathécale d'adénine facilite la réponse électrique des neurones

dans un modèle d'inflammation et pourrait participer à la nociception [421]. Le second récepteur (AdeR2) a été identifié plus récemment, en 2008, chez la souris [422]. À ce jour, aucun homologue de ce récepteur n'a encore été décrit chez d'autres espèces et son profil d'expression demeure essentiellement inconnu. Chez l'humain, l'adénine est associée à la défaillance rénale chronique [423] et une étude a montré un site de liaison à la surface des cellules d'origine humaines HEK293 d'affinité semblable à la liaison de AdeR1 du rat [424], mais aucun récepteur homologue à AdeR1 ou à AdeR2 n'a encore été trouvé. Finalement, les raisons de la présence d'adénine dans le milieu extracellulaire, de même que son origine (possible dégradation de l'adénosine), reste à être élucidées.

#### **1.3.4.2 Élimination des nucléosides extracellulaires**

Comme pour les nucléotides, il existe des mécanismes permettant d'éliminer les niveaux élevés de nucléosides du milieu extracellulaire. En effet, les concentrations extracellulaires de certains nucléosides puriques, adénosine, inosine et hypoxanthine ont été mesurées [58, 384, 425] et doivent être rapidement éliminées du milieu extracellulaire afin d'éviter une stimulation prolongée des récepteurs P1 ou leur désensibilisation.

Les cellules peuvent dégrader les divers nucléosides puriques à l'aide des enzymes adénosine désaminase (ADA) et nucléoside purique phosphorylase (PNP) qui métabolisent respectivement l'adénosine en inosine et l'inosine en hypoxanthine. Contrairement aux nucléotides, les cellules peuvent aussi recouvrer les nucléosides ainsi que les bases azotées du milieu extracellulaire grâce à deux familles de transporteurs; soit la famille SLC29 ou « équilibrative nucleoside transporter » (ENT) et la famille SLC28 ou « concentrative nucleoside/nucleobase transporter » (CNT). Ces transporteurs sont importants pour terminer l'action des nucléosides extracellulaires, mais aussi pour récupérer les nucléosides du milieu et éviter une nouvelle synthèse ou encore permettre aux types cellulaires ne pouvant pas synthétiser de nucléosides/nucléotides de les récupérer de leur environnement.



#### 1.3.4.2.1 Adénosine désaminase (ADA; EC 3.5.4.4)

L'ecto-adénosine désaminase (ecto-ADA) est une enzyme qui catalyse la réaction de désamination de l'adénosine (en inosine) et la 2-déoxyadénosine (en déoxyinosine) dans le milieu extracellulaire [55, 426]. À ce jour, seulement deux isoenzymes ont été mises en évidence soit ADA1 et ADA2 correspondant respectivement aux gènes *ADA* [427] et *CECR1* chez l'humain [428]. Ces deux isoenzymes seraient retrouvées principalement dans le cytoplasme, mais peuvent se retrouver aussi dans le sérum [429]. Apparemment, l'ecto-ADA membranaire correspond à l'isoenzyme ADA1 (sous forme dimérique) complexée à des protéines membranaires intégrales telles que CD26 ou les récepteurs à l'adénosine A<sub>1</sub> et A<sub>2b</sub> [426, 430], mais sa topologie membranaire demeure inconnue. Les deux isoenzymes peuvent être distinguées par l'inhibition par l'érythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adénine (EHNA) puisque ADA1 est bloquée [429, 431], alors qu'ADA2 est insensible à cette molécule [55, 432, 433].

Il semble qu'une forte activité ADA soit présente à la surface des leucocytes tels que les lymphocytes [426, 434], les neutrophiles [435] et les cellules dendritiques [430, 436]. L'absence d'ADA1 entraîne une lymphopénie sévère et une immunodéficiência chez l'homme et la souris où l'expression du gène a été interrompue après la naissance car les souris déficientes en ADA1 meurent in utero à 18,5 jours post fécondation [55]. Pour leur part, les macrophages expriment l'isoenzyme ADA2 qu'ils peuvent relâcher en conditions hypoxiques et en présence de tumeurs.

#### 1.3.4.2.2 Nucléosides puriques phosphorylase (PNP ; EC 2.4.2.1.)

L'inosine produite par l'ADA peut être dégradée en hypoxanthine. Effectivement, des concentrations d'hypoxanthine importantes ont déjà été mesurées dans le milieu extracellulaire [58, 425]. L'enzyme responsable de cette dégradation est probablement une « nucléoside purique phosphohydrolase » (PNP). Deux gènes, *PNP1* et *PNP2*, codant pour deux protéines différentes ont été clonés chez l'humain et la souris. Ces deux protéines sont capables de métaboliser l'inosine (ou le 2'-3'-déoxyinosine) et la guanosine (ou la 2'-3'-déoxyguanosine) en hypoxanthine et en xanthine respectivement (Figure 6). L'enzyme PNP1 est surtout localisée dans le cytoplasme et il n'existe aucune information quant à la

localisation de PNP2. Cependant, le métabolisme de l' [ $^3\text{H}$ ]inosine en [ $^3\text{H}$ ]hypoxanthine par des cellules épithéliales bronchiques et des lignées de leucocytes intactes [55] ainsi que la dégradation de l'adénosine extracellulaire en hypoxanthine par les astrocytes et les cellules gliales [437] suggèrent la présence de l'une ou l'autre de ces protéines à la surface des cellules en question. L'absence de PNP mène, comme pour l'ADA, à un phénotype d'immunodéficience sévère, mais aussi à des troubles neurologiques [55]. Aucune étude ne permet de distinguer si ces phénotypes sont liés à un problème de métabolisme des nucléosides à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules.

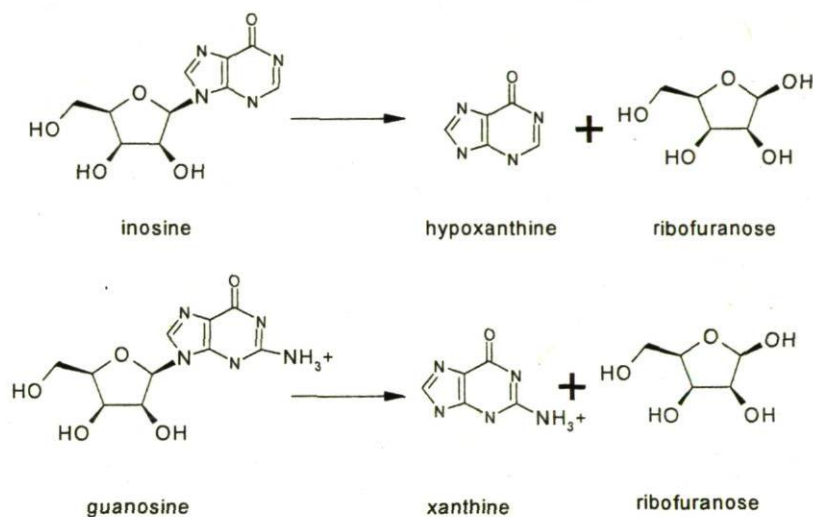


Figure 6 : Représentation de l'activité nucléosides puriques phosphorylase (EC 2.4.2.1.)

#### 1.3.4.2.3 SLC29 ou « *equilibrative nucleoside transporter* »

Les nucléosides peuvent aussi réintroduire la cellule via des transporteurs. La première famille de transporteur, les « *equilibrative nucleoside transporter* » (ENT), ou SLC29, permet un passage bidirectionnel de nucléosides tels que l'adénosine, la thymidine, la cytidine, la guanosine, l'uridine, l'inosine et l'hypoxanthine [438-440]. Les transporteurs ENTs sont retrouvés chez la plupart des organismes eucaryotes et procaryotes [441, 442]. Chez l'humain et la souris, tous les types cellulaires expriment un ou plusieurs des quatre transporteurs ENT [443], soit ENT1, ENT2, ENT3 et/ou ENT4. Ces transporteurs sont caractérisés par onze domaines transmembranaires et peuvent généralement être inhibés par le dipyridamole [43, 444]. Toutefois, les différents transporteurs de la famille possèdent



des propriétés différentes. Par exemple, ENT1 a une forte affinité pour l'adénosine et ne permet pas le passage de l'uridine alors que le transporteur ENT2 favorise l'entrée de l'inosine et de l'hypoxanthine, deux nucléosides résultant de la dégradation de l'adénosine comme nous l'avons vu précédemment. Cependant il laisse aussi entrer l'uridine [43]. De plus ce dernier n'est pas inhibé par les inhibiteurs des ENT tels le dipyridamole [43]. Le transporteur ENT3 a une sélectivité similaire à ENT2 [43], alors que le transporteur ENT4 est un transporteur permettant le transport de la sérotonine favorisant aussi l'entrée d'adénosine lors d'une acidification du milieu [445]. La régulation de l'expression de ces transporteurs n'est essentiellement pas connue, à l'exception d'ENT1 dont l'expression est sensible à la concentration de déoxynucléotides dans la cellule. Le mécanisme derrière ce phénomène est encore inconnu [43].

#### *1.3.4.2.4 SLC28 ou « concentrative nucleoside transporter »*

Les récepteurs CNT permettent l'entrée des nucléosides dans la cellule, mais contrairement au passage passif et de faible affinité des ENTs, les transporteurs CNT possèdent une forte affinité pour les nucléosides et ont besoin d'ions  $\text{Na}^+$  pour permettre le passage des nucléosides par gradient de concentration [44]. Ces transporteurs permettent aussi le passage de molécules ayant une structure semblable aux nucléosides, généralement utilisées comme antiviraux (zidovudine (AZT), ribavirin, etc.) ou dans la chimiothérapie contre le cancer (5-fluoro-déoxy-2'-uridine (FdU), cladrabine, gemcitabine, etc.). Ces transporteurs possèdent treize domaines transmembranaires [44]. L'expression des CNTs est régulée par divers facteurs tels que le cycle cellulaire, certaines hormones [44] ainsi qu'en présence de conditions inflammatoires [446, 447]

## 1.4 Nucléotides extracellulaires : inflammation

Maintenant que nous avons abordé tous les aspects de la signalisation par les nucléotides, regardons plus précisément le rôle joué par cette voie de signalisation dans un processus physiologique donné, soit l'inflammation.

### 1.4.1 La réponse immune

Tous les organismes vivants doivent faire face à des agressions par certains microorganismes (virus, bactéries, champignons, protozoaires) et ont dû développer des moyens de contrer ces attaques souvent destructrices. Au cours de l'évolution, les mammifères ont développé un système immunitaire qui leur permet de faire face à ces agressions. Celui-ci est composé de deux types de réponses complémentaires et qui pourraient même s'avérées être reliées, soit la réponse innée et la réponse acquise hautement spécifique [448]. Ce système complexe de défense peut reconnaître un corps étranger ou un agent pathogène et initier dans un premier temps une réponse non-spécifique, dite réponse inflammatoire. Cette réponse implique certains leucocytes (globules blancs) tels que les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes/macrophages, les cellules NK et les cellules dendritiques et a pour rôle la neutralisation de l'agent pathogène peu importe sa nature [448]. Dans les cas où cette réponse est insuffisante, l'organisme initiera une réponse immune spécifique qui permettra de monter une défense efficace et dirigée, particulièrement contre un agent pathogène donné. Cette réponse acquise implique d'autres types de leucocytes tels que les cellules dendritiques, les lymphocytes B et lymphocytes T, et permet la génération d'un répertoire quasi infini de récepteurs spécifiques aux microorganismes pathogènes rencontrés au cours de la vie [448]. Cependant, tous les microorganismes ne sont pas nécessairement des agents pathogènes. En effet, nous n'avons qu'à penser aux milliards de bactéries logeant dans l'intestin et qui sont essentielles à la dégradation et l'assimilation du bol alimentaire, mais qui peuvent rapidement devenir problématiques si elles sont retrouvées dans le sang. L'organisme a donc besoin de reconnaître non pas seulement la présence de microorganismes, mais aussi



leur « pathogénicité » avant de monter une réponse immune. La façon exacte dont l'organisme s'y prend reste un sujet d'étude encore aujourd'hui. La théorie actuellement acceptée est celle proposée par Polly Matzinger qui suggère que la réponse immune débute par un signal de danger suite à un dommage, un stress tissulaire ou la mort cellulaire et que les cellules immunitaires recrutées vont monter une réponse immune seulement en présence d'un agent pathogène. Dans le cas contraire, elles vont simplement nettoyer le site ayant subi un traumatisme et initier des mécanismes de réparation [449, 450]. Ce modèle soutient que l'organisme peut reconnaître et distinguer le danger de l'agent pathogène afin de pouvoir répondre de manière efficace. Comme le modèle précédent prétendait que les cellules du système immunitaire inné montaient une défense en présence seulement d'un agent pathogène, nous avons pu mettre en évidence des motifs moléculaires conservés associés aux pathogènes (PAMPs) et les récepteurs capables de les reconnaître [451, 452]. Par contre, les signaux impliqués dans la perception du danger sont un concept récent et ont reçu beaucoup moins d'attention. De plus, la définition associée à la notion de danger étant abstraite, les signaux de danger commencent à peine à être identifiés. En effet, la découverte de récepteurs membranaires capables de reconnaître des protéines cytoplasmiques ou des produits de dégradation de la matrice extracellulaire générés seulement en condition de stress supporte la notion de danger et a apporté des pistes d'études.

Les nucléotides extracellulaires semblent de bons candidats comme signaux de danger puisqu'ils sont retrouvés à de fortes concentrations dans le cytoplasme [453]. En effet, ils peuvent être rapidement relâchés lors d'un traumatisme comme nous l'avons vu précédemment [35, 50, 53]. De plus les leucocytes et les cellules endothéliales expriment plusieurs récepteurs P2 leur permettant de répondre aux nucléotides [14, 50, 228, 454, 455]. Enfin, ils peuvent être éliminés rapidement du milieu extracellulaire par des ectonucléotidases aussi présentes chez les leucocytes et les cellules endothéliales [12, 279, 361].

### 1.4.2 L'inflammation

L'origine du terme inflammation remonte à l'Antiquité et serait attribuable à Aulus Cornelius Celsus qui en fait mention dans son ouvrage « *De Medicina libri octo* » (traduction française ; [456]). Lors d'une lésion au niveau de la peau, on pouvait observer une inflammation associée à quatre signes caractéristiques, soit la rougeur ou érythème (*rubor*), l'enflure ou œdème (*tumor*), la chaleur (*calor*) et la douleur (*dolor*). On a depuis ajouté un cinquième signe soit la perte, ou l'altération, des fonctions du tissu atteint (*functio laesa* ; [457, 458]). Ces signes cardinaux de la réaction inflammatoire découlent de la vasodilatation, de la migration de leucocytes et l'extravasation du plasma au site inflammatoire lors d'une infection par un microorganisme, ou d'une lésion suite à un traumatisme physique. En effet, la vasorelaxation favorise l'exsudation de plasma sanguin et de protéines plasmatiques qui se traduisent par de la rougeur, de la chaleur et de l'œdème [458]. Le tissu distendu par l'œdème, relâche certains signaux qui, avec certaines protéines plasmatiques, peuvent être perçus comme douloureux par les terminaisons nerveuses présentes dans le tissu.

Il est intéressant de noter que plusieurs indices suggèrent que l'ATP peut induire la réaction inflammatoire. D'abord, l'injection d'ATP chez la souris, le rat ou l'humain provoque de l'œdème [459, 460], de la rougeur [460, 461] et de la douleur [460-463], trois des signes caractéristiques de l'inflammation. De plus, la co-injection d'ATP avec d'autres signaux pro-inflammatoires comme la bradykinine [464, 465] et la prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) [462] accentue l'extravasation du plasma sanguin ou la douleur. Ensuite, comme nous l'avons vu précédemment, les nucléotides peuvent être relâchés lors d'un traumatisme [63, 69] et activer les récepteurs P2 présents sur l'endothélium. Des études ont montré que l'activation des récepteurs P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>2</sub> de l'endothélium mène à une production de signaux vasorelaxants tels que la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), l'oxyde nitrique (NO) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF), et par conséquent une vasodilatation locale [340, 466-468]. À l'opposé, le dinucléotide Up<sub>4</sub>A cause une vasoconstriction et a été proposé comme candidat possible au « facteur de vasoconstriction dérivé de l'endothélium » (EDCF) [32]. Finalement, les récepteurs P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>4</sub> et



P2X<sub>7</sub> présents au niveau des terminaisons nerveuses participent à la perception de la douleur, ou à l'hyperalgésie dans des modèles d'inflammation chez le rat et la souris [469-471]. À l'opposé, les nucléotides UTP et l'UDP [472] ainsi que l'adénosine via l'activation du récepteur A<sub>1</sub> [473-475] auraient des effets analgésiques. Il semble donc que la signalisation par les nucléotides joue un rôle important dans l'inflammation et la perception de la douleur inflammatoire et une fois de plus les nucléotides pourraient être de bons signaux de danger.

### 1.4.3 Les leucocytes et l'inflammation

La plupart des tissus possèdent des cellules immunitaires résidentes [458] pouvant être divisées en deux types, soit des cellules riches en granules sécrétoires et des cellules phagocytaires. Par exemple, les mastocytes et les cellules de Paneth (intestin) sont des cellules riches en granules contenant des médiateurs chimiques ou des molécules bactéricides [476, 477]. Les histiocytes dermiques (peau), les cellules microgliales (système nerveux central), les cellules de Kupffer (foie) ou les macrophages alvéolaires (poumon) sont des macrophages résidents avec une grande capacité de phagocyter des corps apoptotiques et des microorganismes [451, 458]. La reconnaissance d'agents pathogènes par ces cellules résidentes mène à une libération de signaux capables d'activer les cellules endothéliales. Nous savons que d'autres types cellulaires comme les fibroblastes et les astrocytes peuvent également participer à l'activation de l'endothélium [392, 478, 479]. Une fois activé, l'endothélium va se relaxer, modifier l'expression de molécules d'adhésion (E-sélectines, intégrines, ICAM-1, VCAM-1, etc.) et permettre la transmigration des leucocytes, ou diapédèse [458].

Les leucocytes sont des cellules provenant de la différenciation de cellules progénitrices pluripotentes de la moelle osseuse qui circulent dans l'organisme via un système de transport efficace impliquant les systèmes sanguin et lymphatique. Ces vaisseaux sont tapissés d'une monocouche de cellules endothéliales qui doit être traversée par les leucocytes avant qu'ils ne parviennent au site inflammatoire. Des facteurs chimiotactiques

(LTB<sub>4</sub>, IL-8, MCP-1, MIP-2, KC, RANTES, etc.) participent à la migration et la direction des leucocytes [458, 480, 481].

Parmi les leucocytes migrant au site inflammatoire, les neutrophiles arrivent massivement et s'accumulent rapidement dans les premières heures de l'inflammation (6-12 heures) et disparaissent normalement après 24-48 heures. Ces cellules sont riches en granules sécrétoires contenant, entre autres, des protéases et des protéines bactéricides (ex. : cathepsines, gélatinases, défensines et lysozyme) [458]. La relâche rapide de ces granules et la production de dérivés réactifs de l'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sup>2-</sup>, O<sup>•</sup>, etc.) permettent d'éliminer un grand nombre d'agents pathogènes, mais dégradent aussi la matrice extracellulaire essentielle à l'intégrité du tissu. Ceci peut mener à une diminution ou une perte de fonction du tissu inflammé et peut avoir des effets néfastes. Cependant, il s'agit d'une étape nécessaire à la défense de l'organisme.

Les neutrophiles peuvent libérer de l'ATP en condition inflammatoire et expriment plusieurs composantes de la signalisation des nucléotides ainsi que des ecto-nucléotidases. En effet, les neutrophiles peuvent relâcher de l'ATP rapidement dégradé en AMP et en adénosine [482, 483]. Cette relâche dépendrait d'un mécanisme impliquant la connexine-43 [73, 396, 482]. La présence de NTPDase1 [484, 485], de NPP2 [485] et de phosphatase alcaline [485, 486] a été observée chez ces cellules et pourrait expliquer cette dégradation. En outre, les neutrophiles expriment presque tous les récepteurs P1 et P2 à l'exception de P2Y<sub>12</sub> [50, 487, 488] et sont donc en excellente position pour répondre aux nucléotides. Par exemple, le récepteur P2Y<sub>2</sub> semble participer à la dégranulation, à la relâche d'IL-8 et à la chimiokinèse (mouvement aléatoire) [455, 488, 489], alors que la NTPDase1 et le récepteur A3 se situeraient au front de migration et participerait au chimiotactisme des neutrophiles [485, 488].

En parallèle, les monocytes arrivent et commencent à s'accumuler au site inflammatoire pour atteindre un nombre maximum environ 24 heures après le stimulus inflammatoire. Certaines études nous portent à croire que les monocytes migrent indépendamment des neutrophiles [490] et qu'ils auraient comme origine un stock provenant de la rate différent



des macrophages résidents dans les tissus [491]. Certains monocytes arriveraient au site inflammatoire avant même les neutrophiles. Possiblement que ces derniers correspondent aux monocytes « patrouilleurs » récemment mis en évidence [492], mais ceci reste à être vérifié. Une fois arrivés au site inflammatoire, les monocytes vont pouvoir se différencier, soit en macrophages soit en cellules dendritiques dépendamment des signaux rencontrés [493, 494]. Il n'est pas encore clair quelle proportion des monocytes se différencieront en macrophage et/ou en cellules dendritiques, ni si se sont tous les monocytes migrant au site inflammatoire qui se différencient, mais ces cellules proviennent d'une cellule myéloïde commune [494].

Les macrophages sont souvent considérés comme des « concierges » [495] car ils nettoient en phagocytant les agents pathogènes, mais aussi les cellules mortes, les corps apoptotiques, les débris matriciels, l'ADN et les agrégats de protéines [458, 495]. Les macrophages peuvent demeurer au site inflammatoire plusieurs jours et initier les mécanismes d'angiogenèse, de réparation, et/ou de cicatrisation une fois que l'infection ou le traumatisme sont résolus pour permettre le retour à l'homéostasie [458, 495]. La présence persistante d'agents pathogènes fera intervenir la réponse immunitaire spécifique incluant les lymphocytes T et B ainsi que les anticorps (IgM, IgG) où les cellules dendritiques jouent un rôle important en présentant aux lymphocytes des antigènes issus de l'agent pathogène [448, 496]. Comme mon travail a porté sur les fonctions de la NTPDase1 chez le macrophage et son rôle dans le processus inflammatoire, je porterai une attention particulière à ce dernier leucocyte.

#### **1.4.4 Rôles du macrophage**

Les monocytes/macrophages sont des cellules inflammatoires jouant un rôle important dans la défense de l'organisme, mais aussi dans la guérison d'une blessure et la régulation de la réponse immune [458, 495]. Cette grande diversité de réponses montre la plasticité des macrophages à répondre à leur environnement et à maintenir l'homéostasie [495]. En effet, les monocytes peuvent se différencier en diverses populations de macrophages ayant des propriétés différentes et exprimant des récepteurs particuliers à leur surface. Par exemple,

la plupart des tissus possèdent des macrophages résidents et les monocytes traversant l'endothélium lors de l'inflammation se transforment en macrophages « inflammatoires », deux populations différentes de macrophages. Cependant, ce ne sont pas les seuls types de macrophages existants. Des macrophages répondant à des signaux lymphocytaires, des macrophages spécialisés dans la réparation tissulaire et des macrophages modifiés par les tumeurs aidant la croissance de ces dernières ont aussi été observés. Ces macrophages diffèrent des macrophages résidents ou inflammatoires, mais malheureusement encore aujourd'hui relativement peu d'informations sont disponibles sur ces populations de macrophages. Ceci est principalement une conséquence liée à la difficulté d'obtenir un nombre suffisant de ceux-ci pour l'expérimentation. La quasi totalité des études porte sur les macrophages inflammatoires ou des macrophages provenant de la différenciation soit de monocytes ou de cellules pluripotentes de la moelle osseuse par une incubation avec le phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA), le LPS et/ou des cocktails de cytokines. Deux types de macrophages peuvent résulter de cette différenciation, soit les macrophages de type M1 (LPS plus l'IFN $\gamma$  ou PMA) soit ceux de type M2 (activation alternative). Les macrophages M1 ont des propriétés microbicides importantes et peuvent promouvoir une réponse des lymphocytes Th1 via l'IL-12, alors que les macrophages M2 vont plutôt favoriser une réponse des lymphocytes Th2 [497].

Malgré leurs différences fonctionnelles, les macrophages peuvent tous détecter les agents pathogènes et/ou des signaux de danger via certains récepteurs, dont les récepteurs membranaires « Toll-like » (TLRs), les récepteurs du mannose et les récepteurs « scavenger » ainsi que via des récepteurs cytoplasmiques NLRs [448, 452]. Les récepteurs P2 pourraient aussi permettre la détection du danger en répondant aux nucléotides relâchés dans le milieu extracellulaire. Selon le type de macrophage, l'activation de ces récepteurs va pouvoir augmenter leur capacité phagocytaire et augmenter leur motilité, induire la production de certaines cytokines et chimiokines ou permettre le recrutement de cellules plus spécialisées telles que les lymphocytes. Certaines données expérimentales récentes suggèrent que les nucléotides extracellulaires participent ou influencent la signalisation de certains de ces récepteurs, plus particulièrement les récepteurs TLR et NLR. Je reviendrai sur ces récepteurs ultérieurement.



Les monocytes et les macrophages, tout comme les neutrophiles, peuvent relâcher de l'ATP en condition de stress [72, 498] et possèdent un large éventail de récepteurs aux nucléotides. Les ARNm pour les récepteurs P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>14</sub>, CysLT<sub>1</sub>, CysLT<sub>2</sub>, A<sub>2a</sub> et A<sub>2b</sub> ont déjà été détectés chez les macrophages [14, 50, 228, 499], alors que les monocytes expriment aussi le récepteur P2Y<sub>13</sub> [50]. Au niveau protéique, l'expression des récepteurs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2X<sub>4</sub> et P2X<sub>7</sub> a été confirmée [231-235]. Il semble que l'expression de ces récepteurs peut varier en fonction du type de macrophage ou du niveau de différenciation de ceux-ci. En effet, une augmentation de l'expression des récepteurs P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>2</sub> a été observée lors de la maturation des monocytes ainsi que pendant l'inflammation [50]. Mentionnons aussi que les macrophages péritonéaux de souris élicités à l'huile minérale expriment peu le récepteur P2X<sub>7</sub>, alors que ceux élicités au thioglycollate préservent l'expression de ce récepteur [500]. Finalement, le récepteur P2X<sub>1</sub> est exprimé par les macrophages péritonéaux résidents [501], mais est exprimé par moins de 10% des macrophages élicités au thioglycollate [234]. L'expression de plusieurs récepteurs P2 par les macrophages et les exemples de variations d'expression entre les différents types de macrophages suggèrent un rôle important des nucléotides chez ces cellules.

#### **1.4.5 Récepteurs « Toll-like » (TLR)**

La famille des récepteurs TLR permet la reconnaissance de motifs conservés chez les agents pathogènes et de signaux de danger. En effet, des éléments conservés chez les agents pathogènes comme des protéoglycanes bactériens ou la flagelline, de même que certaines protéines cytoplasmiques ou produits de dégradation de la matrice extracellulaire (normalement absents de l'environnement tissulaire comme l'HSP60, l'HSP70 et l'acide hyaluronique) peuvent être détectés par les récepteurs TLR (Tableau 7) [452, 502, 503]. Ces récepteurs possèdent une portion cytoplasmique hautement homologue aux récepteurs de l'IL-1, une longue région extracellulaire riche en leucines et un domaine transmembranaire [502, 503]. Les TLR1, TLR2 et TLR4 sont exprimés à la surface des

cellules [503], alors que les TLR3, TLR7 et TLR9 se retrouvent dans des compartiments intracellulaires [503].

Les récepteurs « Toll-like » sont exprimés par la plupart des leucocytes, mais aussi par plusieurs autres types cellulaires [503-505]. Les macrophages pour leur part expriment la majorité des récepteurs TLR [503, 504, 506], mais l'expression des récepteurs TLR3 et TLR5 n'est pas toujours détectée dépendamment de la source de macrophages ou des conditions expérimentales [503, 506].

La signalisation par les TLRs implique plusieurs protéines dont MyD88, IRAK1, IRAK4, TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein), et TRAF-6 et mène à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 [448, 503]. Ces facteurs de transcription activent l'expression de plusieurs cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF $\alpha$  et l'IL-8 [507]. Cependant, notre laboratoire a montré récemment que la libération d'IL-8 induite par l'activation du récepteur TLR2 par le Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> et l'activation du récepteur TLR4 par le LPS était grandement réduite en présence d'apyrase chez les monocytes humains [489, 498, 508]. De plus des expériences avec des antagonistes de récepteurs P2 suggèrent que les récepteurs P2Y<sub>2</sub> et P2Y<sub>6</sub> seraient responsables de cette relâche d'IL-8 [489, 508]. Enfin, les monocytes libèrent de l'ATP suite à leur activation par le LPS [498]. Ceci suggère fortement que certains effets attribués aux TLRs pourraient être en fait dus à la relâche de nucléotides extracellulaires et à l'activation de certains récepteurs P2. Ceci renforce l'idée d'une double reconnaissance du pathogène et du danger par les leucocytes, le monocyte dans le cas présent.



Tableau 7 : Récepteurs « Toll-like »

Récepteurs	Localisation	Agonistes	Origine
TLR1/2	Membrane plasmique	Lipopeptide triacylique	Bactérienne
TLR2	Membrane plasmique	Acide lipotéichoïque	Bactérienne
		Glycolipides	Bactérienne
		Lipoprotéines/Lipopeptides	Bactérienne
		Peptidoglycanes	Bactérienne
		Porines	Bactérienne
TLR3	Compartiment cellulaire	zymosan	Champignon
		Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	Synthétique
		HSP70	Hôte
		ARN <sub>db</sub>	Virale
TLR4	Membrane plasmique	Poly I:C	Synthétique
		LPS	Bactérienne
		Protéines d'enveloppe	Virale
		Taxol	Végétale
		Plusieurs HSP	Hôte/Bactérienne
TLR5	Membrane plasmique	fibrinogène	Hôte
		Frag. heparan sulfate	Hôte
		Frag. acide hyaluronique	Hôte
		Flagellin	Bactérie
TLR6/2	Membrane plasmique	Lipopeptides diacylique	mycoplames
TLR7	Compartiment cellulaire	ARN <sub>sb</sub>	Synthétique
		Imidazoquinoline	Synthétique
		Loxoribine	Synthétique
TLR8	Compartiment cellulaire	bropirimine	Synthétique
		ARN <sub>sb</sub>	
TLR9	Compartiment cellulaire	Motif d'ADN non-méthylé CpG	Bactérie
TLR10	Membrane plasmique	(inconnu)	
TLR11	Membrane plasmique	Profilin	Parasite
TLR12		(inconnu)	
TLR13		(inconnu)	

Inspiré de Takeda et al., [503].

### 1.4.6 Récepteurs « NOD-like » (NLR)

Les récepteurs « NOD-like » ou NLR constituent une autre famille de récepteurs importants dans la reconnaissance des agents pathogènes lors de la réponse immunitaire innée [509]. Ces protéines sont retrouvées dans le cytoplasme et ressemblent aux protéines de résistance aux agents pathogènes retrouvées chez les plantes [448]. Ces récepteurs contiennent une région riche en leucines répétées qui est capable de reconnaître des signaux de pathogénicité dans le cytoplasme. Trois sous type de NLR ont été décrits chez les mammifères, soit les NALPs, les NOD et les IPAF/NAIP (Figure 7) [448]. Ces protéines participent à l'organisation de complexes protéiques comme le signalosome NOD et l'inflammasome [448]. Ces deux complexes sont importants pour la reconnaissance d'agents pathogènes, l'activation de la cellule infectée et la production de cytokines comme l'IL-1 qui déclencheront la réponse inflammatoire.

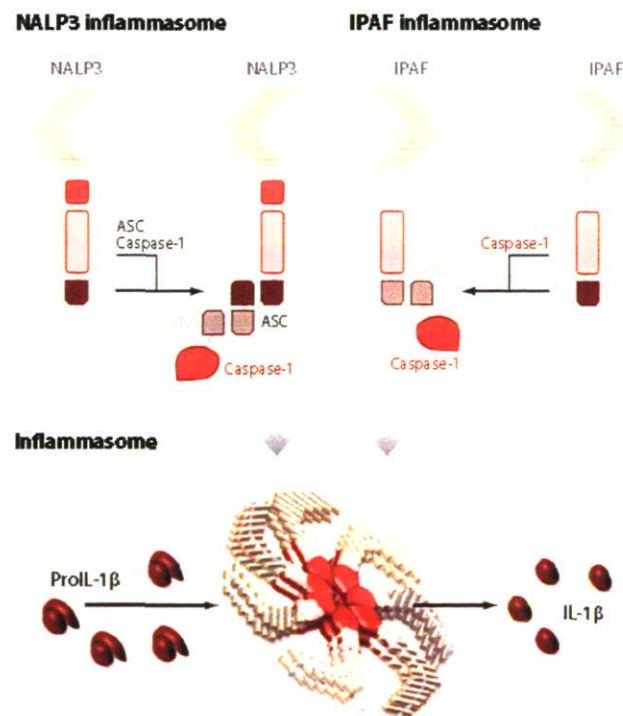


Figure 7 : L'inflammasome.

Reproduction de la figure 2 de Martinon *et al.*, paru à la page 239 du volume 27 d'« Annual Review of Immunology » [448].



Le signalosome NOD se forme suite à l'oligomérisation des protéines NOD1 ou NOD2 ayant lié des peptidoglycanes bactériens comme l'acide méso-diaminopimélique (NOD1) et les dipeptides muramyles (NOD2) [448]. Ces derniers proviendraient de bactéries intracellulaires ou de bactéries phagocytées [448], mais une étude récente met en doute cette idée. En effet, chez le macrophage dérivé de la moelle (BMM), le dipeptide muramyle (MDP) se retrouve principalement dans des compartiments acides et une activation du récepteur P2X<sub>7</sub> par l'ATP ainsi que la pannexine-1 sont nécessaires pour le passage du MDP vers le cytoplasme où la protéine NOD2 est présente [510]. De plus en plus d'études récentes montrent effectivement que le récepteur P2X<sub>7</sub> jouerait un rôle important dans les échanges membranaires (« trafficking ») [511] et pourrait ainsi permettre l'entrée de certains PAMP vers l'intérieur de la cellule.

L'inflammasome, pour sa part, est un complexe protéique impliqué dans l'activation des caspases inflammatoires telles que les caspase-1, -4, -5, -11 et -12. À ce jour trois types d'inflammasome impliquant les protéines NALP1, NALP3 (CIAS1, cryopyrine) et IPAF ont été décrits, mais 22 protéines NLRs sont connues chez l'humain et 29 chez la souris, ce qui laisse entrevoir la formation de plusieurs autres inflammasomes fonctionnels [448]. Pour l'instant, nous savons que les protéines NALP1, NALP3 et IPAF servent d'échafauds au complexe et permettent de recruter des caspases comme la caspase-1. Ce recrutement se fait via le domaine CARD, soit directement dans le cas d'IPAF ou indirectement grâce à la protéine adaptatrice ASC pour NALP1 et NALP3. Dans le cas d'IPAF et de NALP3 un apport d'ATP ou de dATP semble essentiel à l'oligomérisation du complexe [448, 512]. Pour l'instant, les deux principaux rôles du complexe inflammasome seraient le clivage protéolytique de la forme immature (pro-IL-1) en sa forme mature (IL-1) essentiel pour la relâche des cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33) et l'induction de la pyroptose, une forme de mort programmée associée à une activité antimicrobienne se produisant surtout en condition inflammatoire [448, 513].

Le mécanisme d'activation de l'inflammasome n'est pas encore clairement identifié, cependant, de nombreuses observations montrent un lien entre l'activation du récepteur

P2X<sub>7</sub>, l'ouverture d'un pore cellulaire panx-1 ou une diminution du potassium (K<sup>+</sup>) intracellulaire et l'activation de l'inflammasome NALP3 qui se traduit par l'activation de la caspase-1 et la relâche d'IL-1β et d'IL-18 [198, 448, 513-519]. De plus, l'activation prolongée du récepteur P2X<sub>7</sub> est aussi associée à une mort cellulaire [520-522] présentant des similarités avec l'apoptose [523-525] qui pourrait correspondre à la pyroptose. Ces observations suggèrent fortement que le récepteur à l'ATP P2X<sub>7</sub> participe à l'activation de l'inflammasome [519]. Cependant d'autres études montrent que la micro-injection ou la transfection de PAMPs dans le cytoplasme peut directement activer l'inflammasome IPAF ou NALP3 et dans ce cas l'ATP extracellulaire n'est plus nécessaire à l'activation de l'inflammasome et à la libération d'IL-1 [517, 526, 527]. Aucune étude ne montre encore clairement de quelle façon les PAMPs entreraient dans le cytoplasme mais comme pour le MDP, le récepteur P2X<sub>7</sub> pourrait y participer. Néanmoins, il semble qu'une activation soutenue du récepteur P2X<sub>7</sub> et l'ouverture d'un pore panx-1 mènent à des étapes essentielles à une activation subséquente de l'inflammasome NALP3 et la maturation de l'IL-1β et l'IL-18 [517, 528]. Il reste à déterminer si l'ouverture du pore pannexine-1 permet l'entrée de PAMPs dans le cytoplasme de la cellule et/ou par quel mécanisme cette ouverture permet la diminution de la concentration de potassium (K<sup>+</sup>) intracellulaire.

#### 1.4.7 Interleukine-1

La famille de l'interleukine-1 (IL-1F) comprend onze membres (Tableau 8) dont quatre ont été largement étudiés *in vitro* soit l'IL-1α (IL-1F1), IL-1β (IL-1F2), l'IL-1ra (IL-1F3) et l'IL-18 (IL-1F4). Ces protéines sont retrouvées au niveau du cytoplasme sous forme immature (pro-IL-1) et peuvent être relâchées en condition inflammatoire suite au clivage par la caspase-1, aussi connue sous le nom de l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 (ICE), pour générer la forme active (IL-1). Comme nous venons de le voir, la caspase-1 a besoin d'être recrutée par l'inflammasome afin de procéder à cette maturation protéolytique. En effet, des études ont montré que les souris déficientes en NALP3 ou en ASC montraient un sévère défaut en IL-1β (IL-1F2), mais aussi en IL-18 (IL-1F4) une autre cytokine de la famille [529]. En plus, trois autres cytokines de la famille semblent



être clivées par le complexe caspase-1/inflammasome, soit l'IL-33 (IL-1F11), l'IL-1F6 et l'IL-1F7 [529-531], afin d'être relâchées ou de pouvoir être transloquées au noyau [529-531]. Bien que l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> par l'ATP semble essentielle pour l'activation de l'inflammasome [517, 528], le rôle de l'ATP et de P2X<sub>7</sub> a seulement été montré pour l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 et reste à être confirmé pour la maturation de l'IL-33, IL-1F6 et l'IL-1F7.

La cytokine IL-1 $\beta$  (IL-1F2) joue un rôle important dans l'initiation de l'inflammation [529, 532] et semble impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde ainsi que des troubles neurodégénératifs comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [532]. Les macrophages représentent la source majeure d'IL-1 $\beta$  [532, 533]. La signalisation par l'IL-1 $\beta$  est complexe et implique plusieurs protéines. En effet, l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  possèdent un récepteur actif, le récepteur IL1R1, une glycoprotéine de 80 kDa exprimée principalement au niveau des cellules endothéliales, des cellules du muscle lisse, des hépatocytes, des fibroblastes, des kératinocytes, des cellules dendritiques de l'épiderme et des lymphocytes T [534]. Elles possèdent également un récepteur leurre l'IL-1R2 inactif exprimé surtout par les cellules lymphoïdes et les cellules myéloïdes [535]. Ces deux récepteurs se concurrencent pour la liaison de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , mais aussi avec une protéine accessoire IL1RAcP nécessaire pour former un complexe de haute affinité avec l'IL-1R1 et engendrer la réponse cellulaire à l'IL-1 [534]. De plus, l'IL-1ra est un antagoniste naturel du récepteur IL-1R1 et est commercialisé depuis plusieurs années sous le nom d'ANAKINRA pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde et d'autres pathologies où l'IL-1 est impliquée [529]. Bien que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-1ra se concurrencent pour les mêmes récepteurs, l'affinité du récepteur leurre IL1R2 est beaucoup plus forte pour l'IL1 $\beta$  que pour l'IL1 $\alpha$  ou IL1ra [536, 537]. Il semble qu'un système aussi complexe de signalisation existe aussi pour l'IL-18 et l'IL-33 (voir détails dans [529]). Finalement, dans le cas de l'IL-33, il n'est pas encore évident si cette cytokine est relâchée dans le milieu extracellulaire où elle pourrait avoir des effets physiologiques en activant le récepteur IL-1R4 (ST2/Fit-1), ou si elle est transférée au noyau comme l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1F7 [529]. Une étude récente a montré que son clivage par la caspase-1 inactiverait la protéine plutôt que de l'activer comme pour l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 [538].

Tableau 8 : Famille de l'interleukine-1 (IL-1F)

Nouveau nom	Ancien nom	Propriété(s)
IL-1F1	IL-1 $\alpha$	Agoniste (pro-inflammatoire)
IL-1F2	IL-1 $\beta$	Agoniste (pro-inflammatoire)
IL-1F3	IL-1ra	Antagoniste (pro-inflammatoire)
IL-1F4	IL-18; facteur induisant IFN $\gamma$	Agoniste
IL-1F5	FIL1 $\delta$	Nucléaire ? (anti-inflammatoire)
IL-1F6	FIL-1 $\epsilon$	Agoniste
IL-1F7	IL-1H4, IL-1 $\zeta$	Nucléaire (anti-inflammatoire)
IL-1F8	IL-1H2	Agoniste
IL-1F9	IL-1 $\epsilon$	Agoniste
IL-1F10	IL-1Hy2	Antagoniste ?
IL-1F11	IL-33	Agoniste

Tiré de Dinarello « Annual Review of Immunology » [529]

### 1.4.8 Ecto-nucléotidases et inflammation

La présence d'ecto-nucléotidases à la surface des leucocytes est connue depuis plusieurs années. Des activités ecto-ATPase [539-542], ecto-ADPase [542], ecto-AMPase [543] et phosphodiesterase alcaline 1 (hydrolyse de pnp-TMP) [543] ont été rapportées à la surface des monocytes/macrophages, ainsi que d'autres leucocytes [542, 544-546]. L'identité des ecto-nucléotidases responsables de ces activités reste encore à être clarifiée, mais la NTPDase1, l'ecto-5'-nucléotidase et la phosphatase alcaline semblent être présentes chez certains leucocytes.

La NTPDase1 (ou CD39) initialement décrite comme marqueur de l'activation lymphocytaire [286, 287, 547] est exprimée par la plupart des leucocytes. En effet, la présence de NTPDase1 a été rapportée pour les lymphocytes B [484, 547], les lymphocytes T activés [484, 547, 548], les lymphocytes Treg [369, 549], les cellules NK et NKT [550], les neutrophiles [485] ainsi que sur les cellules myéloïdes comme les cellules de Langerhans [551], les monocytes [484, 547], les cellules dendritiques dérivées de monocytes [552], certaines sous population de cellules dendritiques circulantes [547, 548] et les macrophages résidents de la peau humaine [548] et des testicules de souris [553]. Plusieurs études récentes montrent qu'en absence ou en excès de cette enzyme, la réaction



inflammatoire est modifiée [369, 485, 549-551, 554]. Il est intéressant de noter que l'expression et/ou l'activité de la NTPDase1 peuvent être modulées en condition inflammatoire. Par exemple, lors d'une blessure liée à l'ischémie-reperfusion, la forte présence de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) diminue grandement l'activité de la NTPDase1 [322, 555]). À l'opposé, une expression accrue de NTPDase1 a été observée dans des cas d'inflammation chronique comme dans le cas de colite, de pancréatite et d'ischémie [556-558]. L'ecto-5'-nucléotidase (CD73) a pour sa part été rapportée sur plusieurs leucocytes, dont les cellules mononucléées périphériques du sang [559], les lymphocytes B et T [560-562], les lymphocytes Treg [369] et les cellules dendritiques [552], mais absente des cellules NK [563] et des neutrophiles [485]. La NTPDase1 contribue, de concert avec l'ecto-5'-nucléotidase (CD73), à la génération d'adénosine qui joue un rôle principalement anti-inflammatoire [368, 369, 554, 564-566].

D'autres ecto-nucléotidases ont été détectées sur certains leucocytes. Par exemple, les lymphocytes T expriment également la NPP-1 [567] et l'ADA [55], la NDP kinase et l'ecto-adénylate kinase [562]. Les lymphocytes B expriment la phosphatase alcaline [568] et les ARNm de la NTPDase2 et de NPP2 ont été détectés chez le neutrophile humain [485].

Au niveau de l'endothélium et des vaisseaux sanguins, deux NTPDases sont présentes, soit la NTPDase1, qui est fortement exprimée par les cellules endothéliales [338, 548] et les muscles lisses vasculaires [342, 343], et la NTPDase2 qui est retrouvée à la surface des péricytes [343] et dans l'adventice des vaisseaux probablement à la surface des fibroblastes [342, 343]. La NTPDase1 régule la concentration locale de nucléotides du flux sanguin [569, 570] et prévient la désensibilisation du récepteur P2Y<sub>1</sub> plaquettaire [338]. Son rôle dans la prévention de la formation de thrombus a été confirmé par les souris déficientes (*entpdl*<sup>-/-</sup>) [338, 339, 571]. D'autres études ont montré qu'elle pouvait réguler d'autres fonctions vasculaires telles que l'angiogenèse [540] et la perméabilité vasculaire [572].

### 1.4.9 Pathologies inflammatoires

Finalement, dans certains cas l'inflammation est trop intense ou trop longue (chronique) et cause d'importants dommages au tissu atteint ou est à l'origine de pathologies. L'athérosclérose [573], la polyarthrite rhumatoïde [574], l'arthrite goutteuse [575], l'asthme [576, 577] et les maladies inflammatoires de l'intestin telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse [578] en sont quelques exemples. Pour chacune de ces maladies, des données expérimentales suggèrent un rôle pour les nucléotides ou les nucléosides.

L'importance du processus inflammatoire dans de nombreuses pathologies en fait aujourd'hui un champ de recherche dynamique qui rapporte plusieurs milliards de dollars américains à l'industrie pharmaceutique [496]. La modulation de la signalisation par les nucléotides et les nucléosides fait partie des nouvelles cibles thérapeutiques à l'étude [469, 471, 579-583].



## 1.5 Hypothèses et objectifs de recherche

Comme nous venons de le voir, les nucléotides extracellulaires participent à plusieurs fonctions physiologiques dont la réponse inflammatoire. Cependant, peu d'études montrent comment les cellules modulent cette réponse. Dans plusieurs cas, il semble exister un équilibre fin entre la signalisation P1 et la signalisation P2 présentant souvent des effets opposés. Par exemple, l'activation des récepteurs P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> et P2X<sub>7</sub> chez les monocytes et les macrophages a des effets pro-inflammatoires comme la relâche des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 et TNF $\alpha$  [584] et des chimiokines MCP-1/CCL2 et IL-8 [489, 508, 585] alors que l'adénosine via l'activation des récepteurs A<sub>2a</sub> et A<sub>2b</sub> inhibe la production des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que TNF $\alpha$  et MIP-1 $\alpha$ /CCL3 et IL-12, et favorise la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [392, 583]. Comme les nucléotides sont relâchés dans le milieu extracellulaire lors de l'inflammation [63, 69] les effets anti-inflammatoires dûs à l'adénosine devraient dépendre des ecto-nucléotidases telles que la NTPDase1, l'ecto-5'-nucléotidase et la phosphatase alcaline non-spécifique à un tissu (TNAP/ALPL; akp-2) exprimées par les leucocytes et les cellules endothéliales.

Nous avons émis l'hypothèse que les ecto-nucléotidases peuvent réguler finement la signalisation par les nucléotides et ainsi moduler l'inflammation. Les macrophages, cellules clef du processus inflammatoire, présentent une forte activité ecto-ATPasiqque qui pourrait être due à la présence de la NTPDase1. Nous croyons que cette ecto-nucléotidase présente chez le macrophage participera à cette modulation de l'inflammation en contrôlant l'activation de récepteurs P2 à sa surface en gérant la concentration des nucléotides extracellulaires. Des résultats préliminaires et le rôle suggéré de récepteur détectant le danger ont dirigé nos expériences vers le récepteur P2X<sub>7</sub>.

Au début de mes études doctorales, nous n'avions qu'une connaissance très sommaire des ecto-NTPDases [265]. La première partie de mon doctorat a donc consisté à caractériser une nouvelle ecto-NTPDase de souris qui venait juste d'être clonée à mon arrivée au laboratoire et à comparer les propriétés biochimiques des ecto-nucléosides triphosphates diphosphohydrolases retrouvées au niveau de la membrane plasmique afin d'avoir une

meilleure idée de leur influence potentielle sur la signalisation par les nucléotides et leurs effets sur les récepteurs P2.

La seconde partie de mon doctorat a consisté à comprendre le rôle joué par les NTPDases chez le macrophage. Nous avons à notre disposition seulement deux outils soit l'inhibiteur commercial de l'activité ecto-ATPase, l'ARL 67156 [586], ainsi que des souris déficientes en NTPDase1 [338] desquels nous pouvons obtenir des macrophages. Comme la spécificité de l'ARL 67156 n'avait jamais été déterminée et que plusieurs ecto-ATPases avaient été décrites (NTPDase1, 2, 3 et 8, NPP1-3 et la phosphatase alcaline), nous avons caractérisé la spécificité d'inhibition de l'ARL 67156 afin de nous permettre de savoir si cet inhibiteur pouvait être utilisé pour étudier le rôle de la NTPDase1 chez le macrophage. Finalement, nous avons voulu confirmer l'expression de la NTPDase1 chez le macrophage et procédé à sa caractérisation fonctionnelle le cas échéant.



## Chapitre 2 : Clonage et caractérisation de la Nucléoside Triphosphates Diphosphohydrolase-8 de souris.

Article publié dans *Biochemistry* et intitulé "Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8"

Ce chapitre sous forme d'article montre le clonage et la caractérisation d'une nouvelle enzyme de la famille des NTPDases chez la souris, la NTPDase8. Suite à une analyse de la banque d'«Expressed Sequence Tag» (EST) de NCBI, l'ADNc a été cloné par RT-PCR. Le gène est exprimé dans le foie de souris, possède un cadre de lecture ouvert de 1491 paires de bases et code pour une protéine de 497 acides aminés avec un poids moléculaire autour de 54 650 Da et un point isoélectrique prédit de 5,94. Chez la souris, la séquence génomique est localisée au niveau du locus A3 du chromosome 2 et comprend 10 exons. La séquence d'acides aminés déduite à partir de la séquence nucléotidique a révélé huit sites potentiels de N-glycosylation, deux domaines transmembranaires aux deux extrémités de la protéine, cinq régions ACR conservées (« apyrase conserved regions ») et entre 20 à 50% d'identité avec les autres membres de la famille des NTPDases de mammifères. L'ARNm a été détecté par buvardage de type Northern dans le foie, le jejunum et les reins.

L'étude des propriétés biochimiques de cette enzyme exprimée par transfection transitoire dans des cellules COS-7 démontre qu'il s'agit bien d'une nouvelle ecto-NTPDase. En effet, les cellules transfectées acquièrent à leur surface la capacité d'hydrolyser les nucléosides triphosphates et diphosphates tels que l'ATP, l'ADP, l'UTP et l'UDP, alors que les nucléosides monophosphate, tels que l'AMP, ne sont pas hydrolysés. De plus, cet activité catalytique requière absolument la présence de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ ). Le pH optimal est entre 5,5 et 8,0 pour l'hydrolyse de l'ATP et 6,4 pour l'hydrolyse de l'ADP. Les valeurs de  $K_m$  apparent, obtenues avec les lysats des cellules transfectées, montrent que cette enzyme a plus d'affinité pour les nucléotides adényliques qu'uridyliques et préfère les nucléosides triphosphates aux nucléosides diphosphates ( $K_{m, \text{app}}$  en  $\mu\text{M}$  de 13 pour l'ATP, 41 pour l'ADP, 47 pour l'UTP et 171 pour l'UDP). Nous avons confirmé par HPLC que l'hydrolyse des nucléosides triphosphates génère une accumulation transitoire de

nucléosides diphosphates, tel que suggéré par les valeurs de  $K_m$  apparent. Puisque cette nouvelle enzyme correspond à une NTPDase, nous avons proposé le nom de NTPDase8. Les propriétés biochimiques de cette enzyme et sa préférence pour les nucléosides triphosphates devraient permettre à la NTPDase8 de moduler le niveau de nucléosides triphosphates et conséquemment l'activation des récepteurs P2, mais de façon alternative aux autres NTPDases membranaires connues.



## Cloning and Characterization of Mouse Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-8<sup>†, ‡</sup>

François Bigonnesse<sup>1, §</sup>, Sébastien A. Lévesque<sup>1, §</sup>, Filip Kukulski<sup>1</sup>, Joanna Lecka<sup>1</sup>, Simon C. Robson<sup>2</sup>, Maria J.G. Fernandes<sup>1</sup> and Jean Sévigny<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie, Université Laval, Québec, QC, Canada.

<sup>2</sup>Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

† This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-49460, M2C-50334) and the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ; 2822) to J.S. At the origin of this work J.S. received a Scholarship from the American Liver Foundation.

§Equally contributed

‡GenBank accession number for mouse *Entpd8* is AY364442.

\*Address correspondence to:

Jean Sévigny  
Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie  
Centre Hospitalier de l'Université Laval, CHUQ  
Room T1-49, Ste-Foy (Québec), Canada  
G1V 4G2

Tel.: (418) 656-4141 ext. 46319

Fax: (418) 654-2765

e-mail: Jean.Sevigny@crchul.ulaval.ca

Running title: Characterization of mouse NTPDase8

Keywords: NTPDase8, ecto-ATPase, P2 receptor, adenosine receptor, ATP, UTP

## 2.1 Abstract:

A novel mammalian plasma membrane bound nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), named NTPDase8, has been cloned and characterized. Analysis of cDNA reveals an open reading frame of 1491 base pairs encoding a protein of 497 amino acid residues with an estimated molecular mass of 54650 Da and a predicted isoelectric point of 5.94. In a mouse, the genomic sequence is located on chromosome 2A3 and is comprised of 10 exons. The deduced amino acid sequence reveals eight putative N-glycosylation sites, two transmembrane domains, five apyrase conserved regions and 20-50% amino acid identity with other mammalian NTPDases. mRNA expression was detected in liver, jejunum and kidney. Both intact cells and crude cell lysates from COS-7 cells expressing NTPDase8 hydrolyzed P2 receptor agonists, namely, ATP, ADP, UTP and UDP, but did not hydrolyze AMP. There was an absolute requirement for divalent cations for catalytic activity ( $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ ) with an optimal pH between 5.5 and 8.0 for ATP and 6.4 for ADP hydrolysis. Kinetic parameters derived from analysis of crude cell lysates showed that the enzyme had lower apparent  $K_m$  values for adenine nucleotides and for triphosphonucleosides ( $K_{m, \text{app}}$  of 13  $\mu\text{M}$  for ATP, 41  $\mu\text{M}$  for ADP, 47  $\mu\text{M}$  for UTP and 171  $\mu\text{M}$  for UDP). Hydrolysis of triphosphonucleosides resulted in a transient accumulation of the corresponding diphosphonucleoside, as expected from the apparent  $K_m$  values. Enzymatic properties of NTPDase8 differ from those of other NTPDases suggesting an alternative way to modulate nucleotide levels and consequently P2 receptor activation.



## 2.2 Introduction

Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) describes a family of mammalian enzymes that catalyze the hydrolysis of  $\gamma$ - and  $\beta$ -phosphate residues of nucleotides, albeit with different abilities [279]. These enzymes require divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{Mg}^{2+}$ ) for full enzymatic activity. They are tightly bound to the plasma membrane and/or to intracellular organelles by one or two transmembrane domains. The catalytic site of NTPDases faces the extracellular milieu (NTPDases 1-3) and/or the lumen of intracellular organelles such as the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum (NTPDases 4-7). NTPDases 5 and 6 may also be found on the plasma membrane and secreted following proteolytic cleavage [299]. Members of this family of enzymes share five apyrase conserved regions (ACRs). NTPDases have been described under various names in the past [279]: NTPDase1 (CD39, ATPDase, ecto-apyrase) [286, 288, 289], NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) [290-293], NTPDase3 (CD39L3, HB6) [294, 295], NTPDase4 (UDPase, LALP70) [297, 298], NTPDase5 (CD39L4, ER-UDPase, PCPH) [299-301], and NTPDase6 (CD39L2) [302-304]. Another member found recently and named LALP1 may also be considered as NTPDase7 [305].

The presumptive role of plasma membrane bound NTPDases, more specifically NTPDases 1-3, is to regulate the concentration of extracellular nucleotides and thereby modulate their biological effects exerted by the activation of numerous P2Y and P2X receptors. A few functions have been demonstrated in vivo for NTPDase1. It is a key player in the ability of vascular endothelium to block platelet aggregation by clearing ADP from the blood [267, 286, 338, 339, 569, 587]. Interestingly, NTPDase1 activity is also necessary to keep platelets functional by preventing P2Y<sub>1</sub> receptor desensitization at their surface [338]. More recently, NTPDase1 was shown to be expressed on Langerhans cells where it plays a complex role in inflammation and immunity [551]. An opposing function to NTPDase1 has been demonstrated in vitro for NTPDase2. The latter ecto-nucleotidase facilitates platelet aggregation by generating ADP in presence of ATP [343]. Also of significant physiological importance is the final conversion of the NTPDase end product AMP to adenosine by ecto-5'-nucleotidase. Adenosine exerts various biological effects that often

contrast with the functions of P2 receptors. For example, adenosine has antiaggregatory and anti-inflammatory properties [588].

These observations indicate the importance of tightly regulating extracellular nucleotide and nucleoside levels. To date, 15 functional P2 receptors [38, 177, 589, 590] as well as 4 subtypes of adenosine receptors [387, 588] have been cloned and characterized. Because these receptors are expressed in all mammalian tissues, it emphasizes the need for specific enzymes that control the nucleotide/nucleoside levels at the cell surface.

In this paper, we report the identification and characterization of a fourth plasma membrane bound NTPDase with distinct biochemical properties that we have named NTPDase8.

## **2.3 Experimental Procedures**

### **2.3.1 Materials.**

Agarose, aprotinin, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N-N-N'-N'-tetraacetic acid (EGTA), 2-(4-morpholino)ethane-sulfonic acid (MES), nucleotides, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), sodium acetate, tetrabutylammonium hydrogen sulphate (TBA) and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Glycine was provided by Fisher Scientific Ltd (Nepean, Canada). All cell culture media were obtained from Invitrogen (Burlington, Canada) and the 24-well plates from VWR Canlab (Mont-Royal, Canada).

### **2.3.2 RT-PCR Cloning.**

Total RNA was isolated from various mouse tissues, as indicated in Figure 3, with Trizol reagent (Invitrogen). cDNA was synthesized with SuperScript II (Invitrogen) from 500 ng of total RNA with oligo (dT)<sub>18</sub> as the primer, according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen). For amplification, one-fifth of the reverse transcription (RT) reaction volume was used as a template in a final volume of 50  $\mu$ L, containing 0.4  $\mu$ M



primer, 200  $\mu$ M dNTP and 0.7 unit Tgo DNA polymerase (Roche, Laval, Canada). The two following sets of primers were designed based on the 5' and 3' ends of incomplete mouse ESTs (GenBank accession numbers BB610017 and AV026718, respectively): (1<sup>st</sup> set) forward 5'GGAGACGGGGTGTGGAGGAC3', reverse 5'GGGGTTCATAAGGGCAGGCA3'; (2<sup>nd</sup> set) forward 5'GTAGGTGGAGACGGGGTGTG3', reverse 5'GGGTTCATAAGGGCAGGCAT3'. Amplification was started with 2 min at 94 °C followed by 35 cycles of denaturation for 1 min at 94 °C, annealing for 2 min at 60 °C, and primer extension for 2 min at 72 °C and ended with incubation for 7 min at 72 °C. As control, glyceraldehyde dehydrogenase (GAPDH) amplification was used as described previously [591]. The PCR product of approximately 1.8 kb obtained from liver was purified on a 1% agarose gel using the QIAEX II gel extraction kit (Qiagen, Mississauga, Canada) and ligated to pcDNA3.1/V5-His (Invitrogen). Plasmid DNA was purified with the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and the orientation of the insert was determined by restriction-enzyme mapping. Two independent clones (one for each set of primers) with the orientation allowing the expression of the protein were amplified and sequenced. One clone was completely sequenced in both directions and the second clone in one orientation to confirm the sequence obtained from the first clone. Both sequences were identical.

### 2.3.3 Northern Blot Analysis.

Northern blot analysis was performed with total RNA from various mouse tissues extracted as described above. RNA (20  $\mu$ g) was size-fractionated by electrophoresis on 1% agarose gel containing 10% formaldehyde and transferred to a Hybond-N<sup>+</sup> membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, Canada). The membrane was dehydrated at 37 °C for 30 min, prehybridized with the hybridization buffer (5x SSC, 5x Denhardt's solution, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.5% SDS, 200  $\mu$ g/mL salmon sperm DNA, and 50% formamide), and hybridized with a <sup>32</sup>P-labeled cDNA probe in the same buffer not containing the Denhardt's solution. The 470-bp fragment generated by the digestion of the plasmid containing mouse NTPDase8 cDNA with *Bst*XI was used as a probe. Next, the membrane was rinsed with the washing buffer (0.1% SDS and SSC) containing decreasing

concentrations of SSC (1x, 0.2x and 0.1x), and exposed to X-ray film (Eastman Kodak, Rochester, NY).

### 2.3.4 Genomic Characterization of *Entpd8*.

The NTPDase8 cDNA sequence was used to search the National Center for Biotechnology Information (NCBI) mouse genome database. The sequence identified as NT\_039205 showed 100% homology with mouse NTPDase8 cDNA. Oligos were designed to clone the genomic sequence of mouse *Entpd8* in two fragments. PCR products were obtained from mouse genomic DNA [592] with the following primers: (1) forward 5'CTGCTGTCCACT-TCACCCTT3', reverse 5'TCCCGCCCAAAGCAGAGGTA3'; (2) forward 5'CAAGAG-ACATCCTAGCTGCA3', reverse 5'GGGGTTCATAAGGGCAGGCA3'. The two fragments of 1.9 and 2.1 kb were purified on an agarose gel and cloned into pcDNA3.1/V5-His. Plasmids were identified by colony hybridization using a primer labeled with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (PerkinElmer Life Sciences, Woodbridge, Canada) and purified as described above. Selected clones were sequenced, and exon/intron junctions analyzed with NCBI BLAST.

### 2.3.5 Cell Transfection and Protein Preparation.

COS-7 cells were transfected in 10-cm plates using Lipofectamine (Invitrogen), as previously described [286]. Briefly, cells were incubated for 5 h at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) in the absence of fetal bovine serum (FBS) with 6  $\mu$ g of plasmid DNA and 24  $\mu$ L of Lipofectamine reagent. The reaction was stopped by adding an equal volume of DMEM containing 20% FBS, and cells were harvested 40-44 h later. For protein-lysate preparation, transfected cells were washed 3 times with Tris-saline buffer at 4 °C, harvested by scraping in the harvesting buffer (95 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, and 45 mM Tris at pH 7.5), and washed twice by centrifuging at 300g for 10 min at 4 °C. Cells were resuspended in the harvesting buffer containing 10  $\mu$ g/mL aprotinin and sonicated. Nuclei and cellular debris were discarded by centrifuging at 300g for 10 min at 4 °C, and



the supernatants, indicated in the text as crude cell lysates, were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Protein concentration was estimated by the Bradford microplate assay using bovine serum albumin (BSA) as a standard [593].

### 2.3.6 NTPDase Activity Measurement.

Enzyme activity in the protein fractions was determined as previously described [288]. Briefly, enzyme activity was measured at  $37^{\circ}\text{C}$  in 0.5 mL of the following incubation medium: 5 mM  $\text{CaCl}_2$  either with 100 mM Tris at pH 7.4 or with 100 mM MES at pH 6.4 or as indicated. Crude cell lysates were added to the incubation mixture and preincubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 3 min. The reaction was initiated by the addition of 0.5 mM nucleotide (ATP, ADP, UTP, UDP, or AMP) and stopped after 20 min with 0.125 mL of malachite green reagent [594]. Activity on intact COS-7 and 293T cells was determined under similar conditions in 24-well plates, with the addition of 145 mM NaCl to the incubation medium. The reaction was stopped by sampling an aliquot of 0.2 mL and rapidly mixing with 50  $\mu\text{L}$  of malachite reagent. The inorganic phosphate ( $\text{P}_i$ ) released from the hydrolysis of exogenous nucleotides was measured according to Baykov et al. [594]. For all experiments, enzyme activity was assayed 40-44 h after transfection.

The optimum pH for enzyme activity was determined in the presence of 5 mM  $\text{CaCl}_2$  with the following buffers: 100 mM acetate (pH 4.0-5.5), 100 mM MES (pH 5.5-7.0), 100 mM Tris (pH 7.0-9.0), or 100 mM glycine pH (9.0-11.0). In some experiments,  $\text{CaCl}_2$  was substituted by  $\text{MgCl}_2$ . To remove traces of divalent cations, 1 mM EDTA and 1 mM EGTA were added to the medium. One unit of enzyme activity corresponds to the release of 1  $\mu\text{mol}$  of  $\text{P}_i$ /min at  $37^{\circ}\text{C}$  [266]. Specific activity was expressed as units per well or per milligram of proteins, as indicated. All experiments were performed 3 times with the appropriate controls.

### 2.3.7 Separation and Quantification of Nucleotides by HPLC.

For HPLC analysis, activity assays were performed in 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 100 mM MES at pH 6.4 as described above with the following modifications. Aliquots of 20 µL were taken at different time points from the enzymatic reaction, and activity stopped by the addition of an equal volume of ice-cold 1 M perchloric acid. The samples were centrifuged at 1000g for 5 min at 4 °C. Supernatants were neutralized with 1 M KOH (4 °C), centrifuged for a subsequent 5 min at 1000g, and the lipids removed by liquid-liquid extraction with *n*-heptane (5:1, v/v). An aliquot of 20 µL from the lipid-extracted sample was applied to a column connected to a HPLC system.

Adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) were separated on a 15 cm × 4.6 mm, 3 µm SUPELCOSIL LC-18-T column (Supelco, Bellefonte, PA) with a mobile phase composed of 25 mM TBA, 5 mM EDTA, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at pH 7.0, and 2% (v/v) methanol, at a flow rate of 1 mL/min. Uracil nucleotides (UTP, UDP and UMP) were resolved using the SUPELCOSIL LC-18-T column (25 cm × 4.6 mm, 5 µm, Supelco) as described above with the difference that the mobile phase did not contain methanol. Combined adenine and uracil nucleotide samples were analyzed with the latter column with a mobile phase composed of 16.7 mM TBA, 3.3 mM EDTA, and 66.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at pH 7.0. The flow rate was 0.5 mL/min for the first 20 min and 1 mL/min up to 90 min. The nucleotides were detected by UV absorption at 260 nm and identified by comparing the retention time and UV spectrum with the appropriate standards.

## 2.4 Results

### 2.4.1 Cloning and Characterization of Mouse NTPDase8 cDNA.

The open reading frame of mouse NTPDase8 spans 1491 nucleotides encoding a protein of 497 amino acid residues with a predicted molecular mass of 54650 Da and a calculated isoelectric point of 5.94. The deduced amino acid sequence contains eight potential N-glycosylation sites, all five apyrase-conserved regions, and various putative



phosphorylation sites, including one for both protein kinase C and for casein kinase II on serine 4 (Figure 8 and data not shown). According to the Kyte and Doolittle method [595], hydropathicity analysis of mouse NTPDase8 predicts two transmembrane domains in the polypeptide chain, one near the N terminus (amino acids 9-30) and one near the C terminus (amino acids 469-490; data not shown). Distance estimation of the amino acid sequences of various NTPDases and related proteins was performed with GeneBee software (<http://www.genebee.msu.su/>). The phylogenetic tree obtained is shown in Figure 9. Murine NTPDase8 shares the highest homology with chicken ecto-ATPDase with 52.7% identity at the amino acid level [596, 597]. RT-PCR analysis revealed that NTPDase8 mRNA is predominantly expressed in mouse liver. Lower levels of expression were detected in jejunum and kidney. A faint signal was also observed in lung, stomach, and testis (Figure 10). These results were confirmed by Northern blot analysis with total RNA, where a weak signal was obtained for liver and jejunum (data not shown).

GAGTTCCAAGTCCGTCCTGACAACCTAGGGACGCTGCTCTTCTCCCTCCACAGGAGCAAGATGTAAGCCTGGAATTAAT	80
GAGATAGAGTAAAAATTAGTAGATGCCAGAGCAGCAGCTAGAGAGCAGCCTGCTCTCCACCCACAGCCCCAGTTCAAGT	160
AGGTGGAGACGGGGTGTGGAGGACAGCAGGTGTGCAGGTCAGAAGCAGAATCTCTCAAGCTATCCTTGAAGTTGGCTC	240
CCAGTGCAGCTCAGACCCCTCACC <b>ATG</b> GGA CTC TCC TGG AAG GAA CGG <b>GTC</b> TTC ATG GCT CTG	304
<b>M</b> G L S W K E R <b>V</b> F M A L	13
TTG GGA GTT GCA GCA GCC TCT GGC CTC ACC ATG CTC GTC CTC ATC CTG GTG AAG GCA ATC	364
<b>L</b> G V A A A S G L T M L V L I L V K A I	33
AAT GTT CTC TTG CCT GCA GAC ACC AAG TTT GGG ATT GTG TTT <b>GAT</b> GGC GGC TCC TCC CAC	424
N V L L L P A D T K F T G I V F <b>D</b> A G S S H	53
<b>ACA</b> TCC CTG TTT GTG TAC CAG TGG CCA GCA AAC AAG GAG AAG GAC ACA GGA GTG GTC AGC	484
<b>T</b> S L F V Y Q W P A N K E K D T G V V S	73
CAG GCC CTG ACT TGC CAG ATA GAA GGA CCT GGA ATC TCT TCC TAT ACC TCT GAC CCG ACA	544
Q A L T C Q I E G P G I S S Y T S D P T	93
CAG GCT GGG GAA AGC CTG AAG AGC TGC CTG GAG GAG GCG CTG GCG TTG ATC CCA CAG GCC	604
Q A G E S L K S C L E E A L A L I P Q A	113
CAG CAT CCA GAG ACG CCC ACA TTC TTG GGG <b>TCC</b> ACA GCA GGA <b>ATG</b> AGG CTG CTC AGC CAG	664
Q H P E T P T F L G <b>S</b> T A G M R L L S Q	133
AAG <b>AAC</b> AGC TCT CAG GCA AGA GAC ATC CTA GCT GCA <b>ACR2</b> GTC TCC CAG ACA CTA AGC AAG TCT	724
K S S Q A R D I L A A V S Q T L S K S	153
CCT GTG GAT TTT TGG GGT GCT AAG ATC TTG GCT <b>GGG</b> CAG GAT <b>GAA</b> GGT GCC TTT GGT TGG	784
P V D F W G A K I L A <b>G</b> Q D <b>E</b> G A F G W	173
ATC ACC ATC <b>AAC</b> TAT GTC CTG GGA ATG CTC CTG AAG TAT TCC TCT GGA CAG TGG ATC CTG	844
I T I L <b>N</b> Y V L G M L L K Y S S G Q W I L	193
CCT GAA GAG GGG ATG CTA GTT GGT GCT CTG <b>GAC</b> CTT <b>GGT</b> GGA GGC TCC <b>AGS</b> CAG ATC AGC	904
P E E G M L V G A L <b>D</b> L <b>G</b> G A S T Q I S	213
TTT GTG CCT CAG GGC CCC ATC CTG GAC CAG AGC ACC CAA <b>GTC</b> ACC TTC CGC CTG TAC GGT	964
F V P Q G P I L D Q S T Q V T F R L Y G	233
GCC <b>AAC</b> TAC AGT GTC TAC ACT CAC AGC TAC CTC TGC TTT GGG CGG GAC CAG ATC CTG AAC	1024
C Y S V Y T H S Y L C F G R D Q I L N	253
AGG CTC CTG GCT AAG CTG GCA CAG GAC AGG TTG AGC AGC CAG GTG GCC CCG GTC AGA CAC	1084
R L L A A K L A Q D R L S S Q V A P V R H	273
CCA TGC TAC CAC AGT GGC TAC CAG GCC ATA CTG CCA CTG AGT TCC TTG TAT GAC TCA CCC	1144
P C Y H S G Y O A I L P L S S L Y D S P	293
TGC ATC CAC ACT ACA GAT TCC CTG <b>AAC</b> CAC ACC CAG <b>AAC</b> CTC ACA CTT GAA GGG ACA GGC	1204
C I H T T D S L <b>N</b> H T Q <b>N</b> L T V E G T G	313
GAC CCT GGG AAC TGT GTG GTA GCT CTC CGA AGT CTC TTC <b>AAC</b> TTC TCC AGC TGT AAG GGC	1264
D P G N C V V A L F S L F <b>N</b> F S S C K G	333
CAG AAG GAT TGT GCT TTC AAT GGC ATC TAC CAG CCT CCT GTG CAC GGC CAG TTC TAT GCA	1324
Q K D C A F N G I Y Q P P V H G Q F Y A	353
TTT TCC AAC TTT TAC TAC ACC TTC CAT TTC CTG <b>AAC</b> CTC ACG TCC AGG CAA TCA CTG AAC	1384
F S N F Y Y T F H F L <b>N</b> L T S R Q S L N	373
ACT GTC <b>AAC</b> GAC ACT GTC TGG AAG TTC TGT CAG AAA CCC TGG AAA CTG GTG GAA GTC AGC	1444
T V G <b>N</b> D T V W K F Q K P W K L V E V S	393
TAT CCT GGG CAG GAG CGC TGG TTA CGG GAC TAC TGT GCC TCG GGT CTG TAC ATC CTC GTA	1504
Y P G Q E R W L R D Y C A S G L Y I L V	413
TTG CTG CTG GAG GGC TAC AAA TTC AGT GAG GAG ACC TGG CCC AAC ATC CAG TTC CAG AAG	1564
L L L E G Y K F S E E T W P N I Q P Q K	433
CAG GCA GGT GAC ACA GAC ATT GGC <b>TGG</b> ACA <b>CTG</b> GGC TTC ATG CTG <b>AAC</b> CTG ACA GGC ATG	1624
Q A G D T D I G <b>L</b> W T <b>L</b> G F M L <b>N</b> L T G M	453
ATT CCA GCT GAG GCA CCG ACC CAC TGG CGG GCT CAG AGC TAC AGC ATC TGG ACG GCT GGA	1684
I P A E A P T H W R A Q S Y S <b>I</b> W T A G	473
GTA TTA TTC GCA GTG CTG ACC CTT GTG GCC ATT CTT GGG GCA GCT GCC ATC CAG ATC TTC	1744
V V F A V L T L V A I L G A A A I Q I F	493
TGG ACC CAG GAC <b>TAG</b> GTAGAAACCAAGCTGAAGTAGATCAGTCAACAATATCTAAAGCAGAAGTGTGAGTC	1818
W T Q D *	498
AACAGTGACAAACACAGCTGTTTGTGTTGTCAACCTTGTGATCCACCATCAACTGTTCTTAGGAAAGAAGGCCTTTGGCAC	1898
ACAGGACCTTCTGAGCAGATCCTAGATGCTGCTGCTTATGAACCCCTGACCTTTAAGGACTCCAGTCCATCAATTGGGCC	1978
AGGAGGGCCAATTGCTGATAGTACTGACTCCTTTATGCCCTCAGGATAGCACTGGCTATGGGACTGATGTTGCCATAG	2058
GATAGAAACAGGAGAGGCAGCTGTTGGAATAGTGCCACCTCAGAAGGCTGTGGCCAGCCACGACGAGACTCCCTGCTTCC	2138
TCACTATATCAGACTAGACCAGACAGTCCAGTCCAGCTCTGGGGCCAGCCAGCTTCTTACACAAGAGCCTGTGGTTG	2218
GATTCCTTTATCAATCCAGAATATAGATCAAGTTGGGAATGAGGGAATCATTTTTGTGCTTGTGCTTGTGTT	2298
AATTAAGCTGGTTTTGTCATGGTATT	2326

Figure 8 : Nucleotide and predicted amino acid sequences of mouse NTPDase8 cDNA.

The initiation codon and the stop codon (indicated by an asterisk) are in bold face, potential N-glycosylation sites are presented by "N" surrounded by a hexagon. Two hydrophobic regions are double underlined, and the five putative apyrase-conserved regions (ACR1-5) are boxed. Nucleotide sequence for both 5' (1-178) and 3' noncoding sections (1945-2326) were obtained from mouse ESTs (GenBank accession numbers BB610017 and AV026718, respectively).



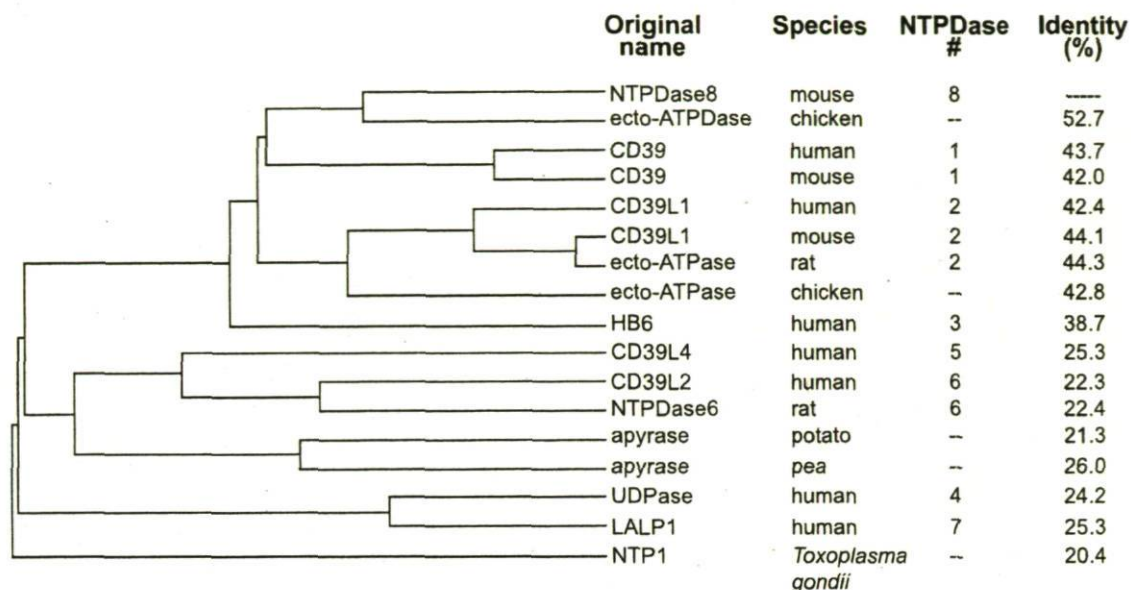


Figure 9 : Phylogenetic analysis of amino acid sequences of selected NTPDases and related proteins.

The percentage of amino-acid identity of these proteins with mouse NTPDase8 was determined by pairwise alignment using ALIGNP ([http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/alignp\\_in.pl](http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/alignp_in.pl)). The GenBank accession numbers of the sequences are as follows: mouse NTPDase8, AY364442; chicken ecto-ATPDase, AF041355; human CD39L1, AF144748; mouse CD39L1, AF042811; rat ecto-ATPDase, Y11835; chicken ecto-ATPDase, U74467; human CD39, S73813; mouse CD39, AF037366; human HB6, AF034840; human CD39L4, AF039918; human CD39L2, AF039916; rat NTPDase6, AJ277748; potato apyrase, U58597; pea apyrase, Z32743; human UDPase, AF016032; human LALP1, AF269255; and *Toxoplasma gondii* apyrase, U96965.

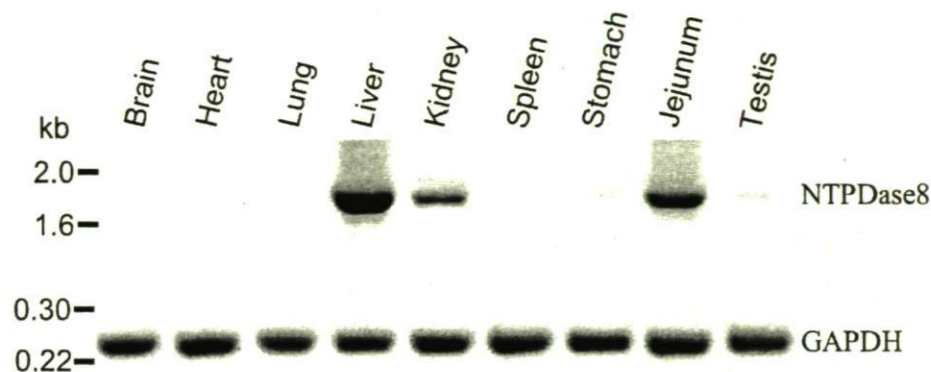


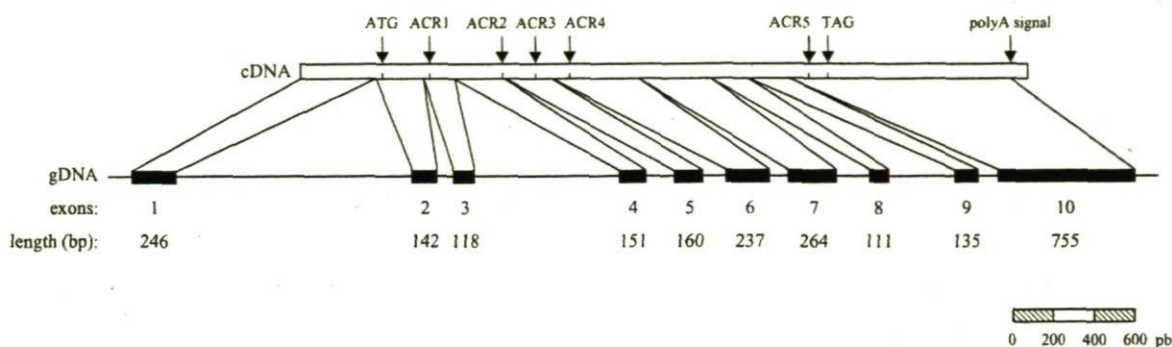
Figure 10 : Tissue distribution of mouse NTPDase8 mRNA.

RT-PCR was performed with total RNA from various mouse tissues. The PCR product of 1.78 kb, obtained with the 1<sup>st</sup> set of primers, was electrophoresed on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed under UV. A GAPDH control giving a fragment of 240 bp is presented in the lower panel.

#### 2.4.2 Genomic Characterization of *Entpd8*.

A homology search with the Mouse Sequence Data Base ([www.ncbi.nih.gov/genome/seq/MmBlast.html](http://www.ncbi.nih.gov/genome/seq/MmBlast.html)) localized *Entpd8* to chromosome 2A3 (Accession number NT\_039205). Alignment of the full cDNA against the mouse genomic sequence reveals that mouse *Entpd8* covers approximately 5410 bp and is organized into 10 exons and 9 introns. All donor and acceptor splice sites conform to the GT/AG rule. Cloning of the genomic sequence of *Entpd8* from exon 2 to 10 confirmed the intron/exon junctions found in the above accession number (data not shown). The genomic structure of mouse *Entpd8* is summarized in Figure 11.



Figure 11 : Schematic representation of the genomic organization of mouse *Entpd8*.

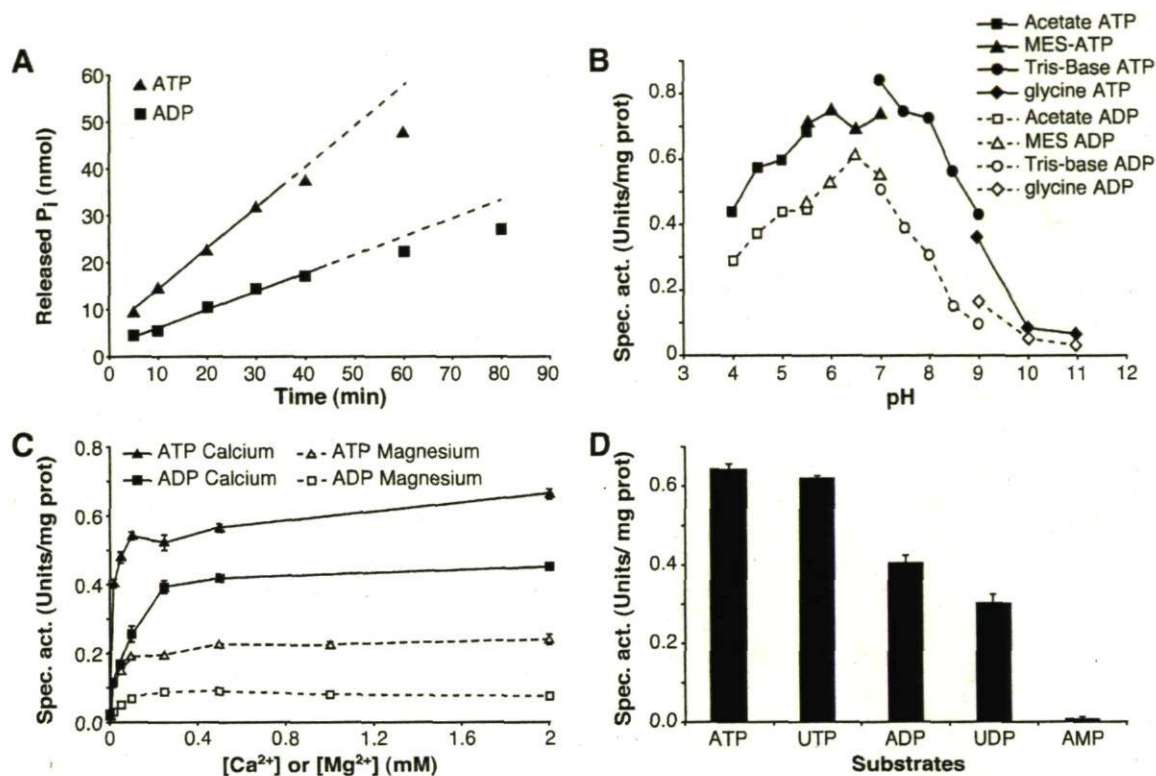
The gene contains 10 exons that span a total of 5410 bp on mouse chromosome 2A3. The start and stop codons, the ACRs 1-5 as well as the polyA tail are indicated on the cDNA. Exons are presented by black boxes on the genomic DNA (gDNA) and their corresponding lengths indicated.

### 2.4.3 Biochemical Characterization of NTPDase8.

The biochemical characteristics of this novel mammalian NTPDase were determined with crude cell lysates of COS-7 cells transiently transfected with an expression vector (pcDNA3.1/V5-His) containing the NTPDase8 cDNA. First, we determined the time course of nucleotide hydrolysis. The result in Figure 12A shows that the hydrolysis of ATP and ADP was linear from 5 to 30 min. All remaining assays were, therefore, carried out for 12-20 min. The effect of pH on ATPase and ADPase activity was then evaluated. Figure 12B shows that murine NTPDase8 was highly active between pH 4.0 and 8.0, with the optimal activity around pH 6.4 for ADPase activity. The enzyme showed a marked preference for  $\text{Ca}^{2+}$  over  $\text{Mg}^{2+}$  for the nucleotides tested (Figure 12C). In the presence of chelators of divalent cations, 1 mM EDTA and 1 mM EGTA, no activity could be detected with any of the substrates tested (data not shown). The substrate specificity of NTPDase8 in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  is shown in Figure 12D and Table 9. Although all triphospho- and diphosphonucleosides tested were hydrolyzed, NTPDase8 preferred triphosphonucleosides with a ratio on the order of ~2:1 (ATP/ADP =  $1.6 \pm 0.3$  and UTP/UDP =  $2.1 \pm 0.3$ ). Like other NTPDases, NTPDase8 does not hydrolyze AMP (Figure 12D, Table 9). As a control, the biochemical activity measured in untransfected COS-7 cell extracts was minimal, except at alkaline pHs. At pH 8.0, a maximum of 0.05 unit/mg of protein with ATP as a

substrate was detected corresponding to less than 7% of the activity detected in transfected cells. Much lower contaminating activity was detected with the other substrates used.

Figure 12 : Biochemical characterization of mouse NTPDase8.



Enzyme activity assays of crude cell lysates from NTPDase8 transfected COS-7 cells were carried out in 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM nucleotide (ATP, ADP, UTP, UDP or AMP), and 100 mM Tris at pH 7.4 unless stated otherwise. In these experiments, less than 6% of the substrate was hydrolyzed. ATPase (▲) and ADPase (■) activities were assayed. For (A) and (B), a representative experiment of at least two independent experiments is shown. For (C) and (D), results are expressed as the mean ± standard deviation of the two independent experiments. Each individual experiment was performed 3 times. (A) Time course of nucleotide hydrolysis by NTPDase8. Reactions were linear from 5 to 30 min for both ATP and ADP as substrates with an  $r^2$  of more than 0.99. (B) Effect of pH. Four buffers [acetate, 4.0-5.5 (■, □); MES, 5.5-7.0 (▲, △); Tris, 7.0-9.0 (●, ○); and glycine, 9.0-11.0 (◆, ◇)] were used with ATP (solid symbols and full lines) and ADP (open symbols and dotted lines) as substrates. (C) Effect of calcium (Ca<sup>2+</sup>) and magnesium (Mg<sup>2+</sup>) ions on NTPDase activity. NTPDase8 was more active in the presence of Ca<sup>2+</sup> (solid symbols and full lines) than in the presence of Mg<sup>2+</sup> (open symbols and dotted lines) with the ATPase (▲, △) activity being higher than ADPase (■, □) activity for both cations. (D) Substrate specificity of NTPDase8.



Table 9 : Substrate specificity of mouse NTPDase8 on transiently transfected intact cells<sup>a</sup>

Substrate	Activity (nmol/min/well)	
	COS-7 cells	293T cells
ATP	3.77 ± 0.14	3.55 ± 0.15
ADP	1.06 ± 0.07	1.54 ± 0.23
UTP	2.17 ± 0.08	2.34 ± 0.31
UDP	0.48 ± 0.04	0.72 ± 0.04
AMP	ND	ND

<sup>a</sup> The appearance of enzymatic activity at the surface of intact COS-7 and 293T cells transfected with an expression vector containing mouse NTPDase8 was measured in 24-well plates in the presence of 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 145 mM NaCl, 0.5 mM nucleotide, and 100 mM Tris at pH 7.4. The activity obtained with control cells was subtracted from the one obtained with NTPDase8 transfected cells. Each individual experiment was performed 3 times. A representative experiment of three to six independent experiments is shown. Results are expressed as the mean ± standard deviation. No activity could be detected with AMP (ND = not detected). Statistical analysis confirmed that the activity of intact transfected cells was significantly higher than the activity of untransfected control cells for all four substrates (P<0.005).

All four nucleotides tested were hydrolyzed by NTPDase8 consistently with Michaelis-Menten model of kinetics (Figure 13A for ATP; not shown for ADP, UTP and UDP). The apparent  $K_m$  constants were calculated by plotting the data according to the Woolf-Augustinsson-Hofstee method (Figure 13A) and are summarized in Table 10. Triphosphonucleosides had lower apparent  $K_m$  values compared to their respective diphosphonucleoside by more than 3-fold, while the apparent  $V_{max}$  values were comparable in the four substrates tested. On the basis of these observations, it could be predicted that ATP and UTP hydrolysis by NTPDase8 would result in an accumulation of the corresponding diphosphoderivative. Because these intermediate products can also activate a subset of P2 receptors, we followed their accumulation by HPLC analysis over a time period of 2 h. Incubation of ATP or UTP with a crude cell lysate from NTPDase8

expressing COS-7 cells led to the formation of high levels of the corresponding diphosphonucleoside during the early phase of the reaction (parts B and C of Figure 13). In these experiments, ADP and UDP were further hydrolyzed to the corresponding monophosphonucleoside once the concentration of ATP and/or UTP had significantly decreased. After 120 min, ADP was completely hydrolyzed to AMP (Figure 13B) while UDP was still detectable at a concentration of 140  $\mu$ M (Figure 13C). When both ATP and UTP were added together, adenine nucleotides were slightly preferentially hydrolyzed giving rise to an accumulation of UDP for an important period of time (Figure 13D). These data are in agreement with the lower  $K_m$  values for adenine nucleotides compared to those for uracil nucleotides. Similar patterns of hydrolysis were observed with confluent intact COS-7 cells transiently transfected with NTPDase8 (data not shown).

In addition, the tight association of NTPDase8 with the membrane fraction was confirmed by an ultracentrifugation of the crude cell lysate at 100 000g for 1 h. Indeed, more than 90% of the total ATPase and ADPase activities were found in the pellet fraction (data not shown). Altogether, these experiments demonstrate that mouse NTPDase8 is an ecto-enzyme tightly bound to the plasma membrane.

Table 10 : Kinetic constants of NTPDase8<sup>a</sup>

substrate	$K_{m,app}$ ( $\mu$ M)	$V_{max,app}$ (units/mg of protein)
ATP	13 $\pm$ 6	0.82 $\pm$ 0.02
ADP	41 $\pm$ 6	0.95 $\pm$ 0.08
UTP	47 $\pm$ 1	1.13 $\pm$ 0.02
UDP	171 $\pm$ 15	1.08 $\pm$ 0.06

<sup>a</sup> Apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  values ( $K_{m,app}$ ,  $V_{max,app}$ ) were estimated by regression analysis of Woolf-Augustinsson-Hofstee plots. Results obtained with COS-7 crude cell lysates are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean of three independent experiments, each performed 3 times. The curves drawn from these data gave an  $r^2$  of 0.99, 0.98, 0.99 and 0.96 for ATP, ADP, UTP, and UDP, respectively.



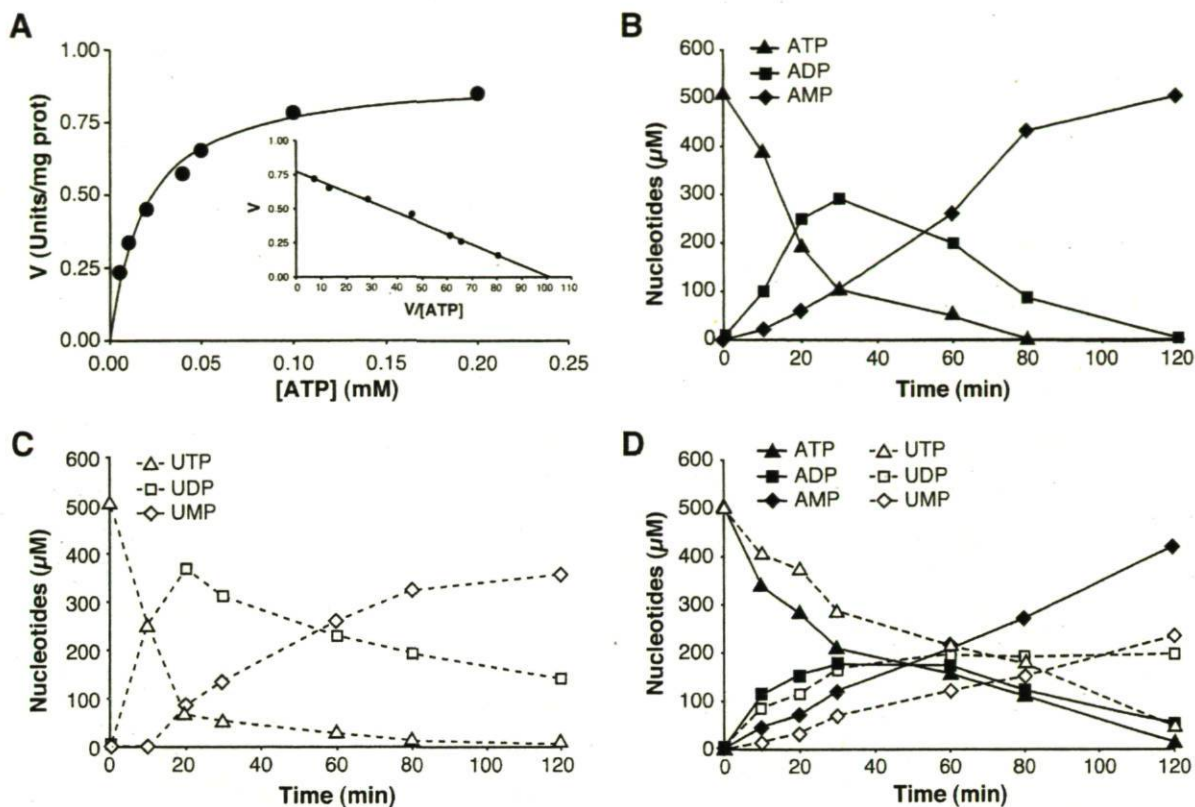


Figure 13 : Kinetics and profiles of nucleotide hydrolysis of mouse NTPDase8.

For (A), reactions were carried out for 12 min in the presence of 5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 100 mM MES at pH 6.4. The average of three separate experiments each performed 3 times is presented. Graphs were produced using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. San Diego, CA). For the analysis of ATP and UTP hydrolysis products (B-D), the reaction was started by the addition of 5  $\mu$ L of NTPDase8 crude cell lysate ( $\sim 6 \mu$ g) to the reaction mixture containing 0.5 mM ATP and/or UTP. Aliquots were taken at different time points, and the reaction stopped immediately by the addition of an equal volume of ice-cold 1 M perchloric acid. These samples were deproteinated, lipids were removed, and the nucleotide content analyzed by HPLC as described in the Experimental procedures section. (A) Michaelis-Menten data representation of ATP concentration ranging from 5 to 200  $\mu$ M. **Inset**, Woolf-Augustinsson-Hofstee plot was used to evaluate the apparent  $K_m$  and  $V_{max}$ . Kinetic parameters are summarized in Table 10. (B) Time course of ATP hydrolysis by a murine NTPDase8 crude cell lysate: ATP ( $\blacktriangle$ ), ADP ( $\blacksquare$ ), AMP ( $\blacklozenge$ ). (C) UTP hydrolysis by a NTPDase8 crude cell lysate: UTP ( $\triangle$ ), UDP ( $\square$ ), UMP ( $\diamond$ ). (D) Simultaneous hydrolysis of ATP and UTP by NTPDase8: ATP ( $\blacktriangle$ ), ADP ( $\blacksquare$ ), AMP ( $\blacklozenge$ ), UTP ( $\triangle$ ), UDP ( $\square$ ), UMP ( $\diamond$ ).

## 2.5 Discussion

This paper reports the identification of a novel member of the mammalian E-NTPDase family. Genomic analysis using mouse NTPDase8 cDNA sequence showed that *Entpd8* is localized on chromosome 2A3 and is comprised of 10 exons. Hence, it is distinct from genes coding for other murine NTPDases located on chromosome 19C3, 2A3, 9F4, 14D1, 12D1, 2G3, 19C3 for *Entpd1* to 7 respectively (data not shown); *Entpd8* maps 306 kb upstream of *Entpd2* on the same chromosome. A search of the NCBI database reveals the presence of a human gene on chromosome 9 that is homologous to mouse *Entpd8*. ESTs from pancreas and stomach (e.g. GenBank accession number BI793151) confirm that the human gene is functional.

Among mammalian NTPDases, NTPDase8 shares the highest homology with NTPDase1-3 with a predicted amino acid identity ranging from 38 to 48% (Figure 9 and data not shown). NTPDase8 had lower homology with intracellular NTPDases (members 4-7) with about 22-25% identity. A 53% amino acid identity was found with the nonmammalian chicken ecto-ATPDase [596, 597]. NTPDase8 shares other important characteristics with NTPDase1-3, including two transmembrane domains with short intracytoplasmic sequences at both ends (N- and C-termini), a tight association with the plasma membrane, a high level of glycosylation (>6 potential N-glycosylation sites), and an active site facing the extracellular milieu (Figure 8). The latter was confirmed by the appearance of nucleotidase activity on transiently transfected intact COS-7 and 293T cells (Table 9).

Because of their membrane topology, NTPDase1-3 and -8 are ecto-enzymes that dephosphorylate nucleotides in the extracellular compartment. There are some similarities between the biochemical properties of these enzymes, as well as important differences. While NTPDase2 prefers triphospho- over diphosphonucleoside by about 30-fold [291, 343], NTPDase1, -3 and -8 catalyze the hydrolysis of triphospho- and diphosphonucleosides efficiently with ATP:ADP rates of hydrolysis of ~1:1 [598], ~3:1 [283, 295, 296] and ~2:1, respectively. The intermediate products generated by plasma membrane bound NTPDases accumulate in a different manner. NTPDase1 hydrolyzes



ATP sequentially, leading to the formation of AMP with the liberation of two molecules of inorganic phosphate; ADP being released from the catalytic site in minute amounts [281, 291]. In contrast, NTPDase2 accumulates ADP in the reaction medium [291, 343]. Interestingly, in the presence of ATP, NTPDase8 leads to the transient accumulation of ADP (Figure 13B). ADP levels are reduced only when the ATP concentration had significantly decreased. Similar data were obtained with UTP as the substrate (parts C and D of Figure 13). Consistent with these observations, NTPDase8 has apparent  $K_m$  values in the low micromolar range with a preference for triphosphonucleosides compared to diphosphonucleosides, as well as for adenine nucleotides over uracil nucleotides. In comparison, ATP and ADP have similar affinity toward NTPDase1 with apparent  $K_m$  values on the order of 10  $\mu\text{M}$  [281, 599]. Human NTPDase2 from NIH-3T3 stably transfected cells was reported to have apparent  $K_m$  values around 400  $\mu\text{M}$  for ATP and 100  $\mu\text{M}$  for ADP with apparent  $V_{\max}$  values of 107  $\text{nmol P}_i \text{ min}^{-1} (10^6 \text{ cells})^{-1}$  for ATP and 4  $\text{nmol P}_i \text{ min}^{-1} (10^6 \text{ cells})^{-1}$  for ADP [292]. The apparent  $K_m$  values of human NTPDase3, evaluated from crude cell lysates of transfected COS-1 cells, were 128 and 96  $\mu\text{M}$ , and apparent  $V_{\max}$  values of 2.0 units/mg and 0.5 U/mg of protein for ATP and ADP, respectively [283]. Another interesting particularity of NTPDase8 is its relatively high activity between pH 4.0 and 8.0, with an optimal activity between pH 5.5 and 8.0.

The biochemical and kinetic information presented in this paper suggest that NTPDase8 would modulate the concentration of nucleotides/nucleosides in a different manner than other plasma membrane bound NTPDases and would therefore affect P2-receptor signaling distinctly. For example, the relatively high accumulation of ADP and UDP observed in parts B-D of Figure 13, in agreement with the apparent  $K_m$  values, suggests that NTPDase8 would not only limit the activation of receptors preferentially activated by ATP and/or UTP such as P2X<sub>1-7</sub> and P2Y<sub>2,4,11</sub> [38, 590, 600] but would also favor the transient activation of ADP and UDP specific receptors such as P2Y<sub>1,6,12,13</sub> [177, 590] property is expected to be partly shared by NTPDase2 [343]. However, in contrast to NTPDase2, NTPDase8 facilitates the late appearance of adenosine, generated by the hydrolysis of AMP by ecto-5'-nucleotidase [601]. Because the latter enzyme is inhibited by ATP and ADP, the formation of adenosine would then be expected to be further delayed in the presence of NTPDase8,

generating a gap between the activation of P2 receptors and the subsequent activation of adenosine receptors. These steps reflect the fact that ATP is the major nucleotide secreted by cells [35]. In similar circumstances, NTPDase1 would be expected to promote a faster generation of adenosine because it favors the rapid formation of AMP. Together, the above observations suggest that NTPDases tightly regulate nucleotide levels, thereby controlling P2-receptor activation. In concert with the ecto-5'-nucleotidase, NTPDases contribute to the formation of adenosine, a biologically active molecule that acts via its own specific receptors [387, 588].

In summary, a novel mammalian plasma membrane bound NTPDase has been identified, and its kinetic properties have been described. This enzyme is expected to regulate extracellular nucleotide levels in a manner distinct from that of other ecto-nucleotidases hitherto described, providing an alternative avenue of regulating cell functions mediated by nucleotides and nucleosides.

## **2.6 Acknowledgments**

We are grateful to Mrs. Julie Pelletier for her technical assistance and to Dr. Guy Poirier from the research unit "Santé et environnement" of the CHUL research center for providing the COS-7 cell line.



### **Chapitre 3 : Étude comparative de l'hydrolyse des agonistes des récepteurs P2 par les Nucléosides Triphosphates Diphosphohydrolases 1, 2, 3 et 8.**

“Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8”

Dans ce chapitre je présente sous forme d'article la comparaison des propriétés biochimiques des différentes NTPDases retrouvées au niveau de la membrane plasmique, soient les NTPDase1, 2, 3 et 8 de la souris, ainsi que les NTPDase1, 2, 3 humaines et la NTPDase8 de rat. Des propriétés biochimiques distinctes ont déjà été décrites pour ces enzymes, mais la présence de plusieurs de ces enzymes dans un même tissu et les variations entre les laboratoires quant à certaines propriétés ne nous permettent pas de savoir quelle sera l'issue finale sur la signalisation P2. Nous étions donc intéressés à comparer, avec la même procédure expérimentale, les propriétés biochimiques principales de ces enzymes afin de mieux comprendre l'impact que pourrait avoir la présence de l'une ou l'autre de ces enzymes sur la signalisation par les nucléotides (ATP, ADP, UTP et UDP) par l'entremise des récepteurs P2.

Les NTPDases 1, 2, 3 et 8 hydrolysent toutes l'ATP et l'UTP de façon efficace avec des valeurs de  $K_m$  de l'ordre du micro-molaire, ce qui indique qu'elles devraient être en mesure de contrôler l'effet exercé par ces nucléotides sur les récepteurs P2X<sub>1-7</sub> et P2Y<sub>2,4,11</sub>. La NTPDase1 ne permet pas l'accumulation d'ADP et devrait aussi inhiber l'activation des récepteurs P2Y<sub>1,12,13</sub> beaucoup mieux que le feraient les autres NTPDases. En revanche, les NTPDases 2, 3 et 8 devraient promouvoir l'activation de récepteurs spécifiques à l'ADP, puisqu'en présence d'ATP elles produisent de façon soutenue (NTPDase2) ou transitoire (NTPDases 3 et 8) une accumulation d'ADP. Il est intéressant de noter que toutes les NTPDases trouvées au niveau de la membrane plasmique vont entraîner une accumulation significative d'UDP suite à la déphosphorylation de l'UTP extracellulaire, ce qui favorise une activation du récepteur P2Y<sub>6</sub>. Les NTPDases diffèrent dans leur dépendance aux cations divalents et dans leur pH optimal, bien qu'elles soient toutes actives à un pH physiologique autour de 7,0-8,5. Les diverses NTPDases peuvent générer différentes quantités de substrat (AMP) et d'inhibiteur (ADP) de la 5'-nucléotidase, l'enzyme

responsable de la production d'adénosine. Les NTPDases pourront aussi affecter de façon différente la formation d'adénosine extracellulaire et influencer la signalisation via les récepteurs à l'adénosine P1. Ces résultats indiquent que les NTPDases membranaires hydrolysent les nucléotides extracellulaires de manières distinctes et peuvent ainsi réguler différemment la signalisation des récepteurs aux nucléotides P2 et celle des récepteurs à l'adénosine.



## Comparative Hydrolysis of P2 Receptor Agonists by NTPDases

### 1, 2, 3 and 8

Filip Kukulski<sup>1</sup>, Sébastien A. Lévesque<sup>1</sup>, Élise G. Lavoie<sup>1</sup>, Joanna Lecka<sup>1</sup>, François Bigonnesse<sup>1</sup>, Aileen F. Knowles<sup>2</sup>, Simon. C. Robson<sup>3</sup>, Terence L. Kirley<sup>4</sup> and Jean Sévigny<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada; <sup>2</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, San Diego State University, San Diego, California, USA; <sup>3</sup>Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA; <sup>4</sup>Department of Pharmacology and Cell Biophysics, College of Medicine, University of Cincinnati, Ohio, USA

\*Address correspondence to:

Dr. J. Sévigny  
Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie  
Centre hospitalier de l'Université Laval  
Room T1-49  
Ste-Foy, Québec, Canada  
G1V 4G2  
Tel.: +1-418-654-2772  
Fax: +1-418-654-2765  
E-mail: Jean.Sevigny@crchul.ulaval.ca

**Keywords:** ATP, ATPase, ecto-nucleotidase, extracellular nucleotide, P1 receptor, P2 receptor.

### 3.1 Abstract

Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1, 2, 3 and 8 (NTPDases 1, 2, 3 and 8) are the dominant ecto-nucleotidases and thereby expected to play important roles in nucleotide signaling. Distinct biochemical characteristics of individual NTPDases should allow them to regulate P2 receptor activation differentially. Therefore, the biochemical and kinetic properties of these enzymes were compared. NTPDases 1, 2, 3 and 8 efficiently hydrolyzed ATP and UTP with  $K_m$  values in the micromolar range, indicating that they should terminate the effects exerted by these nucleotide agonists at P2X<sub>1-7</sub> and P2Y<sub>2,4,11</sub> receptors. Since NTPDase1 does not allow accumulation of ADP, it should terminate the activation of P2Y<sub>1,12,13</sub> receptors far more efficiently than the other NTPDases. In contrast, NTPDases 2, 3 and 8 are expected to promote the activation of ADP specific receptors, because in the presence of ATP they produce a sustained (NTPDase2) or transient (NTPDases 3 and 8) accumulation of ADP. Interestingly, all plasma membrane NTPDases dephosphorylate UTP with a significant accumulation of UDP, favoring P2Y<sub>6</sub> receptor activation. NTPDases differ in divalent cation and pH dependence, although all are active in the pH range of 7.0-8.5. Various NTPDases may also distinctly affect formation of extracellular adenosine and therefore adenosine receptor-mediated responses, since they generate different amounts of the substrate (AMP) and inhibitors (ADP) of ecto-5'-nucleotidase, the rate limiting enzyme in the production of adenosine. Taken together, these data indicate that plasma membrane NTPDases hydrolyze nucleotides in a distinctive manner and may therefore differentially regulate P2 and adenosine receptor signaling.



### 3.2 Introduction

Ecto-nucleotidases control the level of nucleotides at the cell surface by breaking down these molecules [279]. The biologically most relevant substrates of these enzymes, ATP, ADP, UTP and UDP, initiate a number of cellular responses *via* the selective activation of ionotropic P2X and metabotropic P2Y receptors [38, 590]. Therefore, ecto-nucleotidases may dictate a number of physiological responses by regulating P2 receptor activation.

Members of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family are dominant ecto-nucleotidases [279]. Four out of the eight members of this family, namely NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 and NTPDase8, appear relevant to the control of P2 receptor signaling since they are located at the surface of the plasma membrane and hydrolyze nucleotides in the range of concentration that activates P2 receptors [283, 292, 296, 307, 599]. NTPDases 1, 2, 3 and 8 have two plasma membrane spanning domains with an active site facing the extracellular milieu [279, 307]. In contrast, NTPDases 4-7 are anchored to the membranes of intracellular organelles by one (NTPDases 5 and 6) or two (NTPDases 4 and 7) transmembrane domains and their catalytic site faces the lumen of intracellular compartments such as the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum [297-300, 302-305]. Even though NTPDases 5 and 6 can be present at the surface of the plasma membrane and secreted as soluble enzymes following a proteolytic cleavage, their high  $K_m$  values and low specific activities [300, 302, 303] make it unlikely that these enzymes regulate P2 receptor signaling.

NTPDases dephosphorylate a variety of nucleoside triphosphates (e.g. ATP and UTP) and diphosphates (e.g. ADP and UDP) with different abilities and exclusively in the presence of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ ). Among the plasma membrane bound NTPDases (NTPDases 1, 2, 3 and 8), NTPDase1 (also named CD39, ATPDase, ecto-apyrase, ecto-ADPase) [286, 288, 289, 587] hydrolyzes ATP and ADP equally, NTPDase2 (ecto-ATPase, CD39L1) [291-293, 602] is a preferential triphosphonucleosidase whereas

NTPDase3 (CD39L3, HB6) [295] and NTPDase8 [307] are functional intermediates between NTPDases 1 and 2.

So far, the comparison of the biochemical properties of plasma membrane NTPDases is difficult as these enzymes were in general partially characterized, came from different species and were studied in different laboratories with different conditions and techniques. To better understand the potential roles of these enzymes in the control of P2 receptor signaling, and the different expression of various NTPDases in mammals, we have compared the biochemical properties of plasma membrane bound NTPDases from human and mouse. Our results indicate that these enzymes have the capacity to collaborate distinctly with P2 receptors either by terminating the stimulation of some of them or by providing the diphosphonucleoside ligands for other P2 receptors. These data also suggest that plasma membrane bound NTPDases may influence differently the formation of adenosine, and therefore adenosine receptor activation.

### **3.3 Materials and Methods**

#### **3.3.1 Materials**

Agarose, aprotinin, ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N-N-N'-N'-tetraacetic acid (EGTA), nucleotides, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), sodium acetate, and tetrabutylammonium hydrogen sulphate (TBA) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl) methane (Bis-Tris), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) were provided by EMD Chemicals (Gibbstown, New Jersey, USA). All cell culture media were obtained from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada).

#### **3.3.2 Plasmids**

The plasmids encoding human NTPDase1 (GenBank accession no. U87967) [286], human NTPDase2 (NM\_001246) [602], human NTPDase3 (AF034840) [295], mouse NTPDase1 (NM\_009848) [338], mouse NTPDase3 (AY376710) [296] and mouse NTPDase8 (AY364442) [307] have all been described in published reports. The plasmid encoding rat NTPDase8 corresponds to GenBank accession no. AY536920 [308].



Mouse NTPDase2 was cloned as follows. Total RNA was isolated from mouse heart with Trizol reagent (Invitrogen). The complementary DNA was synthesized with SuperScript II (Invitrogen) from 500 ng of total RNA with oligo (dT)<sub>18</sub> as the primer, in accordance with manufacturer's instructions (Invitrogen). For amplification, 10% of the reverse transcription (RT) reaction was used as template in a final volume of 50 µl reaction mixture containing 0.6 µM primer, 400 µM dNTP and 3.5 U Expand High Fidelity PCR System (Roche, Laval, Canada). The following sets of primers were designed based on the 5' and 3' ends of mouse NTPDase2 published sequences (AK002553 and NM\_009849): set 1 forward 5'GGG-GTC-CCT-GCT-GTG-TTC3' and reverse 5'CCG-AGG-GCA-TCT-CTG-ACC3'; set 2 forward 5'TCC-CTG-CTG-TGT-TCT-CCC-G3' and reverse 5'TGA-AGC-AGC-CTG-GAC-GGT-C3'. Amplification was started by an incubation of 2 min at 94°C which was followed by 30 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 60°C, and 2 min primer extension at 72°C and ending with 7 min incubation at 72°C. The PCR product of approximately 1.8 kb was purified on agarose gel using the QIAEX II gel extraction kit (Qiagen, Mississauga, Canada) and ligated into the expression vector pcDNA3.1/V5-His (Invitrogen). Plasmid DNA was purified with QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and the orientation of the insert was verified by restriction mapping. One clone obtained with each set of primers was amplified and fully sequenced in one direction. Both sequences were identical. The corresponding and combined sequence is given in accession number AY37674. The clone obtained with the first set of primers was used for transfection and activity assays.

### **3.3.3 Cell transfection and protein preparation**

COS-7 cells were transfected in 10 cm plates using Lipofectamine (Invitrogen), as previously described [286]. Briefly, 80%-90% confluent cells were incubated for 5 h at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) in the absence of fetal bovine serum (FBS) with 6 µg of plasmid DNA and 24 µl of Lipofectamine reagent. The reaction was stopped by the addition of an equal volume of DMEM containing 20% FBS and the cells were harvested 40-72 h later. For the preparation of protein extracts, transfected cells

were washed three times with Tris-saline buffer at 4°C collected by scraping in the harvesting buffer (95 mM NaCl, 0.1 mM PMSF and 45 mM Tris at pH 7.5) and washed twice by 300 × g centrifugation for 10 min at 4°C. Cells were resuspended in the harvesting buffer containing 10 µg/ml aprotinin and sonicated. Nucleus and cellular debris were discarded by centrifugation at 300 × g for 10 min at 4°C and the supernatant (crude protein extract), was aliquoted and stored at -80°C until used for activity assays. Protein concentration was estimated by the Bradford microplate assay using bovine serum albumin as a standard [593].

### 3.3.4 NTPDase activity measurement

Enzyme activity of protein extracts was determined as previously described [288]. NTPDase activity was measured at 37°C in 0.5 ml of the following incubation medium: 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 80 mM Tris, pH 7.4 or as indicated. Protein extracts were added to the incubation mixture and pre-incubated at 37°C for 3 min. The reaction was initiated by the addition of 25 µl of substrate to give a final concentration of 0.5 mM nucleotide, and stopped with 0.125 ml of malachite green reagent. The liberated inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) was measured according to Baykov *et al.* [594]. In the kinetic determinations, less than 10% of substrate was hydrolyzed over the course of the reaction to ensure the conditions of initial velocity and to minimize ADP and UDP hydrolysis in experiments with ATP and UTP as substrates. Kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) were calculated using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

NTPDase activity at the surface of intact COS-7 cells transfected with expression vectors containing NTPDases 1, 2, 3 or 8 was measured in 24-well plate in the presence of 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 145 mM NaCl, 0.5 mM nucleotides, and 100 mM Tris at pH 7.4. The activity obtained with the control cells was subtracted from the one obtained with NTPDase transfected cells.



Optimum pH was determined in the presence of 2 mM  $\text{CaCl}_2$  in the following buffer: 50 mM Bis-Tris, 50 mM Tris, 50 mM glycine (pH 4.0-11.0). In parallel, it was also measured in the following individual buffers: 100 mM acetate for pH 4.0-5.5, 100 mM MES for pH 5.5-7.0, 100 mM Tris for pH 7.0-9.0 and 100 mM glycine for pH 9.0-11.0 as described previously [296, 307]. In some experiments 1 mM  $\text{CaCl}_2$  was substituted by 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . In control assays, 1 mM EDTA plus 1 mM EGTA replaced  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  to remove traces of endogenous divalent cations from the medium. One unit of enzyme activity corresponds to the release of 1  $\mu\text{mol Pi/min}$  at 37°C. All experiments were performed in triplicate with controls where the protein extract was added after the reaction had been stopped.

### 3.3.5 Separation and quantification of nucleotides by HPLC

For HPLC analysis, NTPDase activity assays were performed as described above with the following modifications. Aliquots of 40  $\mu\text{L}$  of reaction mixture were taken at different time points and transferred to an equal volume of ice-cold 1 M perchloric acid. The samples were centrifuged for 5 min at  $1000 \times g$  at 4°C. Supernatants were neutralized with 1 M KOH (4°C), centrifuged for a subsequent 5 min at  $1000 \times g$  and lipids extracted with n-heptane (5:1, v/v). An aliquot of 20  $\mu\text{L}$  of the resulting samples was used for nucleotide analysis by HPLC.

Adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) were separated on a 15 cm x 4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$  SUPELCOSIL™ LC-18-T column (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a mobile phase composed of 25 mM TBA, 5 mM EDTA, 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0 and 2% methanol (v/v), at a flow rate of 1 mL/min. Uracil nucleotides (UTP, UDP and UMP) were resolved using SUPELCOSIL™ LC-18-T column (25 cm x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Supelco) as described above except the mobile phase did not contain methanol. Samples containing both adenine and uracil nucleotides were analyzed with the latter column with a mobile phase composed of 16.7 mM TBA, 3.3 mM EDTA, 66.7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0 at

the flow rate of 1 mL/min. The nucleotides were detected by UV absorption at 260 nm and identified and quantified by the comparison of the retention time with the appropriate standards.

## 3.4 Results

### 3.4.1 Biochemical characterization of plasma membrane bound NTPDases

The biochemical characteristics of human and murine plasma membrane bound NTPDases (members 1, 2, 3 and 8) were studied using protein extracts of COS-7 cells transiently transfected with an expression vector (pcDNA3) containing cDNA that encodes each enzyme. Time course analysis revealed that for all NTPDases tested, the reaction was linear for at least first 30 min with either ATP or ADP as a substrate (data not shown). To ensure the linearity of the reaction, the subsequent enzymatic assays were carried out for 10-20 min. Figure 14 shows that all plasma membrane bound NTPDases hydrolyze tri- and diphosphonucleosides that have capability to induce a P2 receptor response, namely ATP, ADP, UTP and UDP. NTPDases 1, 2, 3 and 8 all preferred tri- over diphosphonucleosides, although with different NTP/NDP ratios as determined by the measurement of  $P_i$  release (Table 11). None of these enzymes hydrolyzed AMP (data not shown).

All human and murine NTPDases required  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$  ions for their activity with optimal concentration between 1 and 5 mM (data not show). Indeed, in the presence of 1 mM EDTA and 1 mM EGTA to chelate divalent cations, no activity could be detected (data not shown). Figure 15 shows that  $Ca^{2+}$  was preferred over  $Mg^{2+}$  by NTPDases 3 and 8, while there were less differences for NTPDases 1 and 2. Interestingly, all plasma membrane NTPDases hydrolyzed uracil nucleotides more efficiently in the presence of  $Ca^{2+}$ . For few enzymes and substrates tested, the NTP/NDP ratio slightly changed when  $Ca^{2+}$  was replaced by  $Mg^{2+}$  (Figure 15 and Table 11).



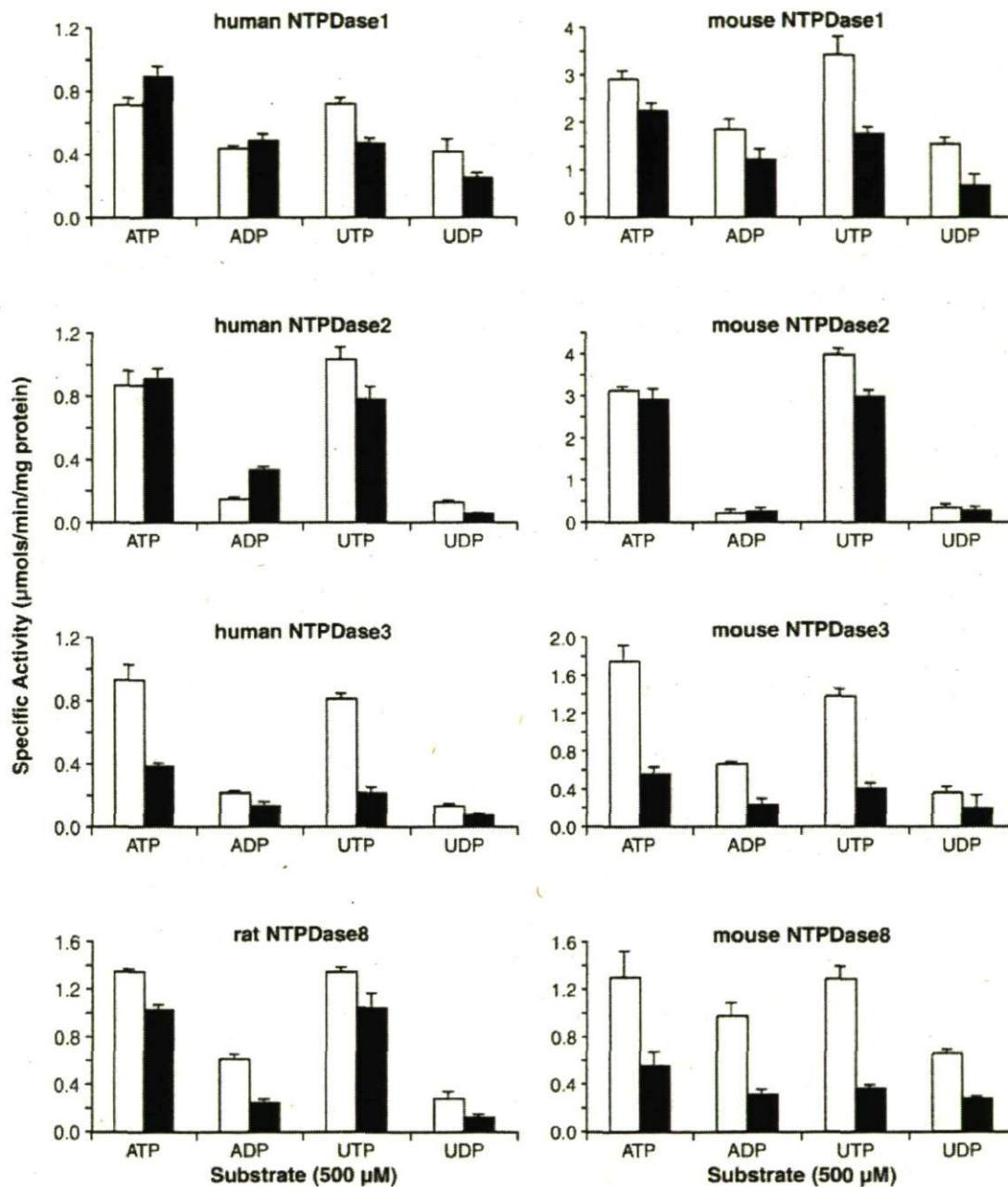


Figure 14 : Substrate specificity of plasma membrane bound NTPDases.

The assays for the enzymatic activity were carried out with protein extracts from transiently transfected COS-7 cells in the presence of 0.5 mM adenine or uracil nucleotide with either 1 mM CaCl<sub>2</sub> (open bars) or 1 mM MgCl<sub>2</sub> (solid bars), as described under Materials and Methods. The average  $\pm$  SEM of two to five experiments performed in triplicate is shown.

Table 11 : NTP/NDP ratios of human and murine plasma membrane bound NTPDases.

<b>A) ATP/ADPratio</b>			
Enzyme	Cation	Human or Rat <sup>a</sup>	Mouse
NTPDase1	Ca <sup>2+</sup>	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.2
	Mg <sup>2+</sup>	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1
NTPDase2	Ca <sup>2+</sup>	7.2 ± 1.8	9.5 ± 1.8
	Mg <sup>2+</sup>	3.5 ± 1.0	11.8 ± 2.4
NTPDase3	Ca <sup>2+</sup>	4.3 ± 0.1	2.1 ± 0.4
	Mg <sup>2+</sup>	2.9 ± 0.1	2.8 ± 0.3
NTPDase8	Ca <sup>2+</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1
	Mg <sup>2+</sup>	4.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.1 ± 1.2

<b>B) UTP/UDPratio</b>			
Enzyme	Cation	Human or Rat <sup>a</sup>	Mouse
NTPDase1	Ca <sup>2+</sup>	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.7
	Mg <sup>2+</sup>	1.9 ± 0.4	2.6 ± 0.5
NTPDase2	Ca <sup>2+</sup>	9.3 ± 1.3	15.1 ± 4.9
	Mg <sup>2+</sup>	12.8 ± 2.0	13.4 ± 4.5
NTPDase3	Ca <sup>2+</sup>	6.2 ± 0.5	2.4 ± 0.8
	Mg <sup>2+</sup>	2.8 ± 0.5	1.7 ± 0.3
NTPDase8	Ca <sup>2+</sup>	4.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.2
	Mg <sup>2+</sup>	9.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.4

Enzyme activity assays were carried out with protein extracts from transiently transfected COS-7 cells in 80 mM Tris, pH 7.4 with either 1 mM CaCl<sub>2</sub> or 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Reactions were started by the addition of 0.5 mM nucleotide as a substrate and Pi release measured as indicated in Material and Methods. Results are expressed as the mean ± SD of at least two experiments performed in triplicate.

<sup>a</sup>rat NTPDase8.



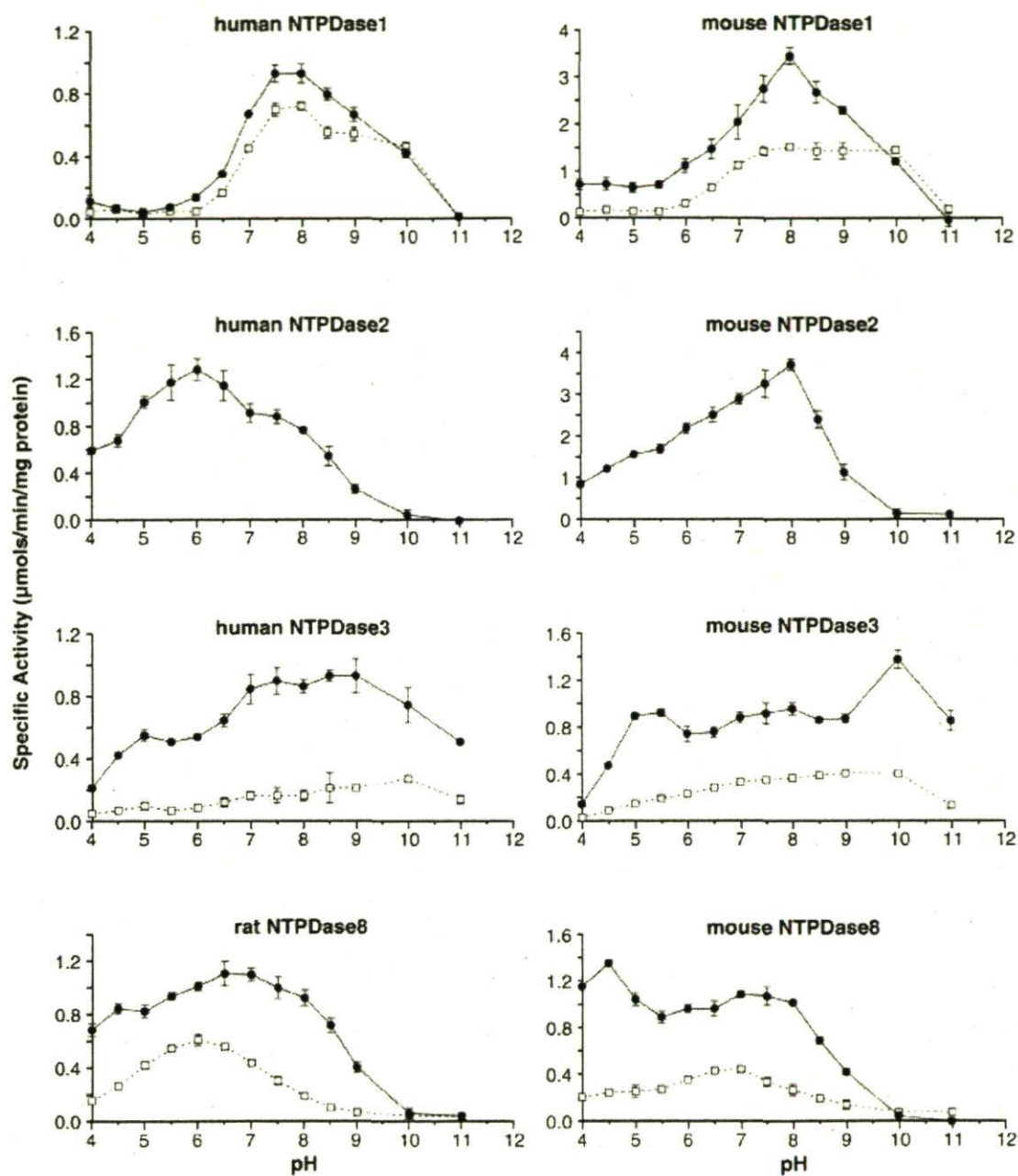


Figure 15 : The effect of pH on plasma membrane NTPDases.

Enzyme activity assays with protein extracts from transiently transfected COS-7 cells were carried out in 50 mM Bis-Tris, 50 mM Tris, 50 mM Glycine, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  at the indicated pH. Reaction were initiated with 0.5 mM ATP (●) or ADP (□). A representative of at least two independent experiments performed in triplicate, is shown.

### 3.4.2 Kinetics of nucleotide hydrolysis by plasma membrane bound NTPDases

All NTPDases analyzed exhibited Michaelis-Menten kinetics for the hydrolysis of ATP, ADP, UTP and UDP (data not shown). Apparent kinetic constants were calculated according to Woolf-Augustinsson-Hofstee plot and are summarized in Table 12.

Table 12 : Kinetic parameters of human and murine NTPDases.

Enzyme	ATP		ADP		UTP		UDP	
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ (U/mg prot.)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ (U/mg prot.)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ (U/mg prot.)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ (U/mg prot.)
hNTPDase1	17 $\pm$ 1	0.94 $\pm$ 0.02	22 $\pm$ 1	0.75 $\pm$ 0.01	47 $\pm$ 4	1.05 $\pm$ 0.03	135 $\pm$ 10	0.79 $\pm$ 0.04
hNTPDase2	70 $\pm$ 2	2.3 $\pm$ 0.03	ND	ND	393 $\pm$ 30	3.9 $\pm$ 0.2	ND	ND
hNTPDase3	75 $\pm$ 10	0.79 $\pm$ 0.03	31 $\pm$ 1	0.18 $\pm$ 0.01	58 $\pm$ 6	0.57 $\pm$ 0.03	67 $\pm$ 3	0.17 $\pm$ 0.01
rNTPDase8	46 $\pm$ 5	0.74 $\pm$ 0.04	265 $\pm$ 20	0.61 $\pm$ 0.03	124 $\pm$ 10	1.17 $\pm$ 0.06	1780 $\pm$ 140	1.37 $\pm$ 0.08
mNTPDase1	12 $\pm$ 1	1.78 $\pm$ 0.04	13 $\pm$ 1	1.12 $\pm$ 0.02	49 $\pm$ 2	4.0 $\pm$ 0.11	92 $\pm$ 6	2.15 $\pm$ 0.09
mNTPDase2	37 $\pm$ 2	1.7 $\pm$ 0.05	ND	ND	49 $\pm$ 2	3.9 $\pm$ 0.1	ND	ND
mNTPDase3 <sup>a</sup>	11 $\pm$ 2	0.35 $\pm$ 0.02	19 $\pm$ 2	0.2 $\pm$ 0.01	10 $\pm$ 1	0.3 $\pm$ 0.01	27 $\pm$ 2	0.14 $\pm$ 0.01
mNTPDase8 <sup>b</sup>	13 $\pm$ 6	0.82 $\pm$ 0.02	41 $\pm$ 6	0.95 $\pm$ 0.08	47 $\pm$ 1	1.13 $\pm$ 0.02	171 $\pm$ 15	1.08 $\pm$ 0.02

Reactions were carried out for 10 min in the presence of 5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 80 mM Tris buffer pH 7.4 or 100 mM MES pH 6.4 for mouse NTPDase8. In all assays, less than 10% of the substrate was hydrolyzed.  $K_m$  and  $V_{\max}$  values were estimated with nucleotide concentration ranging from 0.02 to 1.5 mM by regression analysis of Woolf-Augustinsson-Hofstee plots using GraphPad Prism software. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three separate experiments, each performed in triplicate. <sup>a</sup>From Lavoie *et al.* [296]; <sup>b</sup>reprinted from Bigonnesse, Lévesque *et al.* Biochemistry 2004; 43:5511-5519, Copyright 2004 American Chemical Society [307].

ND: not determined as diphosphonucleosides are poor substrates of NTPDase2



Although human and mouse NTPDase1 had similar  $K_m$  values for P2 receptor agonists, all human NTPDases tested had higher  $K_m$  values than the ones corresponding to their mouse orthologue. The hydrolysis pattern and intermediate products of ATP and UTP dephosphorylation were also analyzed for each of these enzymes by HPLC. This technique, in contrast to  $P_i$  determination by colorimetric assays, distinguishes between the di- and monophosphonucleoside products of ATP and UTP degradation and also enables one to follow the simultaneous hydrolysis of ATP and UTP. HPLC analysis of adenine and uracil nucleotide hydrolysis was performed with either intact COS-7 cells transfected with mouse NTPDases 1, 2, 3 and 8 or protein extracts of these cells (Figure 16 and data not shown for intact cells). As the pattern of hydrolysis was similar in both cases, we conducted all other experiments with protein extracts of transfected COS-7 cells.

Of physiological interest, human and mouse NTPDase1 hydrolyzed ATP to AMP with a very modest appearance of ADP (Figure 16A). UTP was also hydrolyzed by both enzymes with a major difference that UDP accumulated in the medium and was hydrolyzed only when UTP levels were significantly decreased (Figure 16B). Combined ATP and UTP hydrolysis showed that adenine nucleotides are better substrates than uracil nucleotides for both NTPDase1s, which was in agreement with the  $K_m$  values measured for these nucleotides (Table 12, Figure 16C).

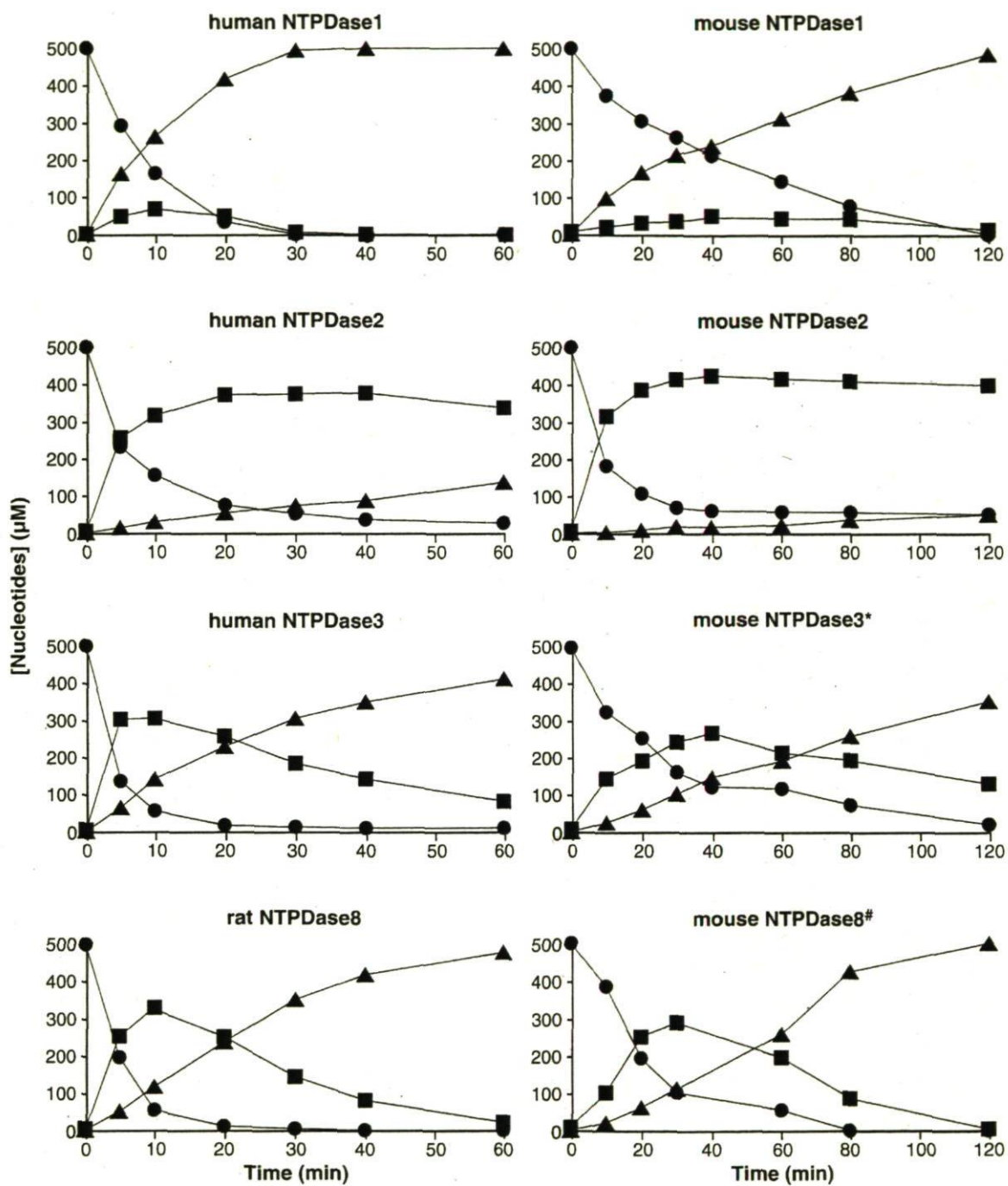
Both human and mouse NTPDase2 hydrolyzed ATP and UTP efficiently to the corresponding diphosphonucleoside (Figure 16). A small accumulation of AMP was also observed for the hydrolysis of ATP that was a little higher with the human enzyme (Figure 16A). This and other slight differences between human and murine NTPDases may be attributable to some variations in the substrate preferences between enzymes from different species or may have also resulted from differences in the amount of activity used for the HPLC determination of the hydrolysis pattern. Compared to human NTPDases 1, 2, 3 and rat NTPDase8, half as many units of activity were used for mouse NTPDases with a doubled time frame. The simultaneous hydrolysis of ATP and UTP by human NTPDase2 showed that this enzyme preferred adenine nucleotides over uracil nucleotides, as expected from the apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  values (Table 12, Figure 16). This could not have been

predicted by considering only the profile of substrate specificity depicted in Figure 1. In contrast, mouse NTPDase2 had similar  $K_m$  and  $V_{max}$  for ATP and UTP and hydrolyzed these nucleotides with no preferences (Table 12, Figure 16).

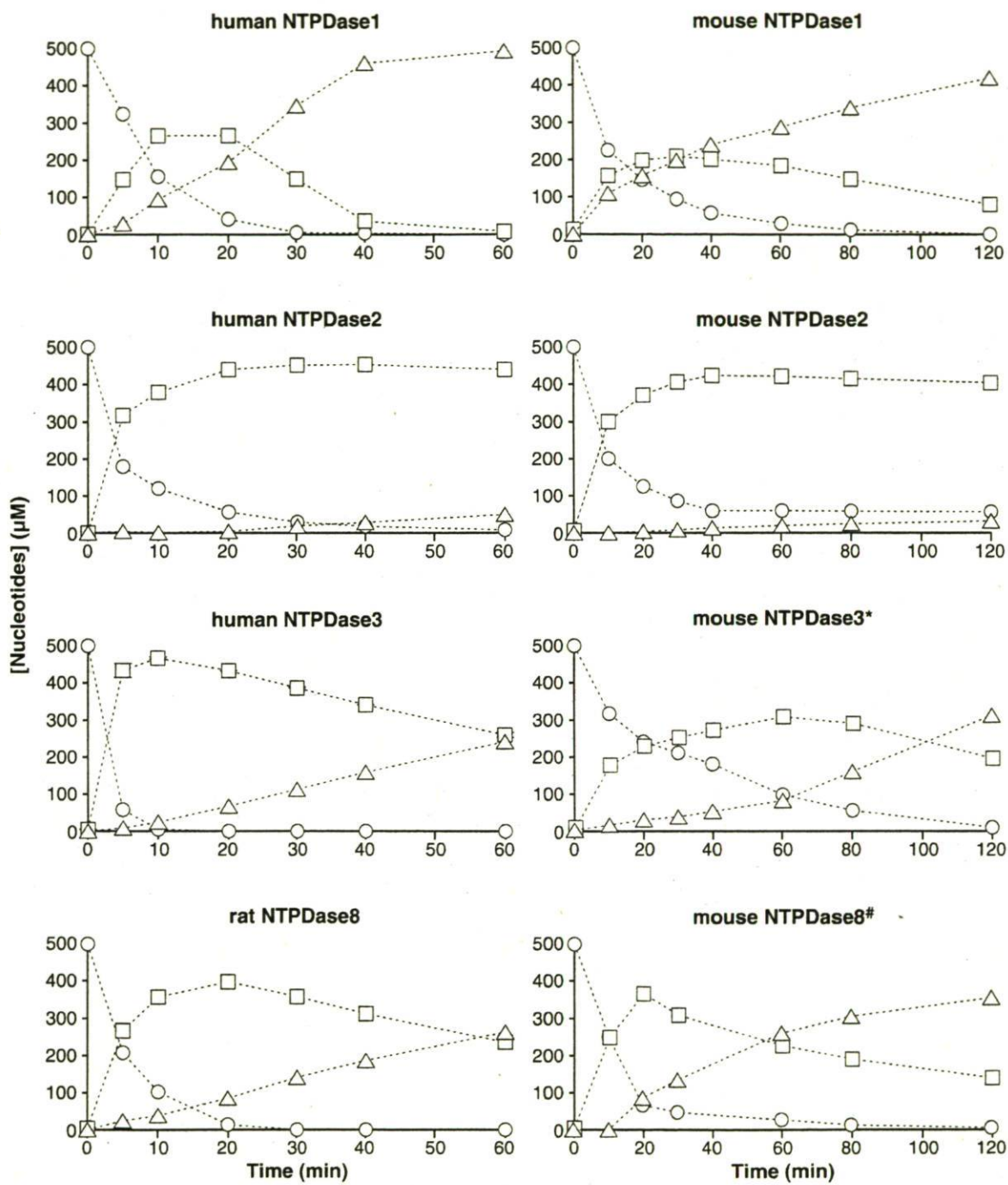
Human and mouse NTPDase3, as well as murine NTPDase8, hydrolyzed ATP and UTP with an important but transient formation of the respective diphosphonucleoside (Figure 16). Among these four enzymes, only mouse NTPDase3 hydrolyzed adenine and uracil nucleotides without any preferences (Figure 16), as expected from the apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  values. In contrast, human NTPDase3 and murine NTPDase8 dephosphorylated ADP to AMP much faster than UDP to UMP, leading to an important and sustained accumulation of UDP (Figure 15B, C). Interestingly, human NTPDase3 had lower  $K_m$  for ADP than for ATP but the former was a much poorer substrate, as suggested by its low  $V_{max}$ . The pattern of hydrolysis of 500  $\mu$ M ATP (Figure 16A) and 25  $\mu$ M ATP (data not shown) was similar in both cases.



a



b





C

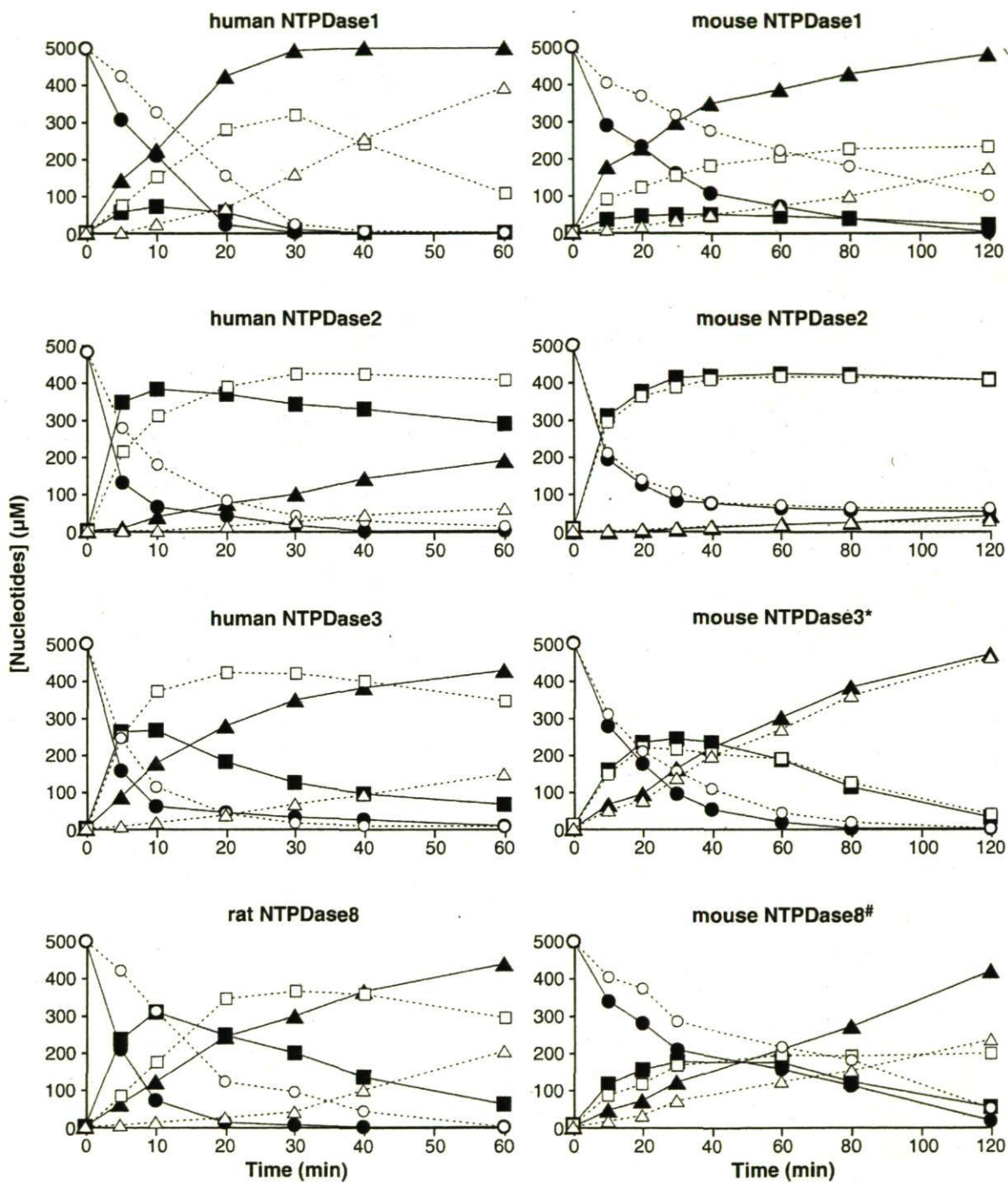


Figure 16 : Profiles of nucleotide hydrolysis by plasma membrane NTPDases.

Reactions were initiated by the addition of protein extracts from COS-7 cells transfected with plasmid encoding an NTPDase to a medium containing 0.5 mM ATP and/or UTP, 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 80 mM Tris, pH 7.4. Tris was replaced by 80 mM Mes pH 6.4 for mouse NTPDase8. A sample of protein extracts was added to obtain 24 nmol/min of activity with ATP as a substrate of human NTPDases 1, 2, 3 and rat NTPDase8, and of 10 - 12 nmol/min of all mouse NTPDases. This amount of activity was doubled when both substrates (ATP and UTP) were added together. Controls with protein extracts from COS-7 cells not expressing NTPDase activities were performed and their activity subtracted from the activity of samples containing NTPDases. Aliquots were taken at the indicated time points and the reaction was stopped immediately by the addition of an equal volume of ice-cold 1 M perchloric acid. These samples were prepared and analyzed for nucleotide contents by HPLC, as described under Material and Methods. Data from a representative experiment performed in triplicate is given. Panel a) ATP hydrolysis by human and murine NTPDases: ATP (●), ADP (■), AMP (▲). Panel b) UTP hydrolysis by NTPDases: UTP (○), UDP (□), UMP (△). Panel c) Simultaneous hydrolysis of ATP and UTP by NTPDases: ATP (●), ADP (■), AMP (▲), UTP (○), UDP (□), UMP (△). <sup>a</sup>From Lavoie *et al.* [296]; <sup>b</sup>reprinted from Bigonnesse, Lévesque *et al.* *Biochemistry* 2004;43:5511-5519, Copyright 2004 American Chemical Society [307].



### 3.5 Discussion

This work reports the comparison of the biochemical properties and kinetics of hydrolysis of P2 receptor agonists by human and murine plasma membrane bound NTPDases. As the presence of detergents changes the biochemical properties of NTPDases we used membrane preparations of transiently transfected COS-7 cells. The protein extracts from these cells have only background levels of nucleotidase activity and allow the analysis of NTPDases in their native membrane bound forms. For all assays performed, the results obtained with protein extracts were similar to those obtained with intact transfected cells. Although with different abilities, all NTPDases tested hydrolyzed tri- and diphosphonucleosides relevant to P2 receptor signaling. In general, human and murine NTPDases had similar substrate specificity (Figure 14). Only human NTPDase2 hydrolyzed ADP slightly more than its mouse counterpart. For comparison, it has been previously reported that mammalian NTPDase2 hydrolyses triphosphonucleosides preferentially by 10 to 40-fold while NTPDases 1, 3, and 8 hydrolyze tri- and diphosphonucleosides efficiently with ATP:ADP ratios of ~1-2:1, ~3-4:1 and ~2:1, respectively (for references see Table 13).

It is well known that divalent cations such as  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  are essential for nucleotide hydrolysis by NTPDases [279]. Our results showed that NTPDases 1 and 2 had no clear preferences with respect to  $Ca^{2+}$  or  $Mg^{2+}$  ions, whereas NTPDases 3 [603] and 8 preferred  $Ca^{2+}$  for the hydrolysis of both tri- and diphosphonucleosides. Interestingly, uracil nucleotides were hydrolyzed more efficiently in the presence of  $Ca^{2+}$  by all plasma membrane NTPDases.

Table 13 : Biochemical and kinetic parameters of recombinant and purified plasma membrane NTPDases.<sup>a</sup>

Enzymes	Species	Source (detergent used)	Kinetic parameters				ATP/ADP Ratios <sup>b</sup>	Ion preferences	Ref.
			ATP		ADP				
			$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (U/mg prot.)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (U/mg prot.)			
NTPDase1	Mouse	Rec., extract of COS-7 cells	12		13		1.4		[341]
	Rat	Rec., intact CHO cells					1.3		[602]
		Rec., extract of COS-7 cells	75				1.7		[603]
	Human	Pur., placenta (Triton X-100)	10		20		1.1	Ca <sup>2+</sup> >Mg <sup>2+</sup>	[604]
		Rec., extract of COS-7 cells					1.3		[341]
Porcine	Pur., brain (Polydocanol)	97	65	95	47	1.4	Mg <sup>2+</sup> : ATP Ca <sup>2+</sup> : ADP	[605]	
Bovine	Pur., aorta (Triton X-100) <sup>c</sup>	14	16.3 (~20%)	12	16.2 (~20%)	1.1		[606]	
	Pur., heart (Triton X-100)			29		1.1	Ca <sup>2+</sup> $\approx$ Mg <sup>2+</sup>	[607]	
NTPDase2	Rat	Rec., extract of COS-7 cells					40		[341]
		Rec., intact CHO cells					20-30		[608]
		Rec., extract of COS-7 cells					11		[314]
	Human	Rec., extract of HeLa cells	210 <sup>d</sup>				22 <sup>d</sup>		[600]
Rec., intact NIH-3T3 cells		400	0.107 <sup>e</sup>	102	0.004 <sup>e</sup>	9.4		[609]	
Porcine	Pur., brain (Polydocanol)	270	76	6	6	12	Mg <sup>2+</sup> : ATP Ca <sup>2+</sup> : ADP	[605]	
Rabbit	Pur., muscle (Digitonin) <sup>f</sup>		6600 <sup>d</sup>			20 <sup>d</sup>	Mg <sup>2+</sup>		
NTPDase3	Human	Rec., extract of COS-1 cells	74 <sup>g</sup>	2 <sup>d</sup>	234 <sup>g</sup>	0.5 <sup>d</sup>	3.6-4.2	Ca <sup>2+</sup> >Mg <sup>2+</sup>	[601,610]
hATPDase	Porcine	Pur., liver (Triton X-100)	93	8.5 (~5-20%)	108	8.5 (~5-20%)	1.1	Ca <sup>2+</sup> >Mg <sup>2+</sup>	[611]

Rec.: recombinant enzyme expressed in cell line; Pur.: homogenous or highly purified enzyme with the estimated purity given in parentheses.

a) In the presence of Ca<sup>2+</sup> ions unless stated otherwise.; b) Ratios with concentration of substrate of at least five times the  $K_m$  of the indicated enzyme, corresponding to concentration of 100 to 2500  $\mu$ M.; c) This enzyme was identified as NTPDase1 from the biochemical properties and internal sequence.; d) Experiments carried out with 5 mM Mg<sup>2+</sup>.; e) Activity per one million cells.; f) This enzyme was identified as NTPDase2 from the biochemical properties and N-terminal sequence.; g) Personal communication from Dr. T.L. Kirley.



Even though all NTPDases tested were highly active at physiological pH, our studies indicated differences between these enzymes. NTPDase1 had the narrowest range of pH for >50% maximal activity in the physiological to basic conditions (pH 7-9.5). In comparison, NTPDases 2 and 8 were efficient from acidic to slightly basic pHs (4.5-8.5) while NTPDase3 appeared to be fairly active in the entire pH range tested (4.5-11). Depending on the localization of NTPDases, these characteristics may have physiological importance. Before the nomenclature of NTPDases was established, pH optima between 7 and 8 for ATP hydrolysis and 7.5-9 for ADP hydrolysis were reported for enzymes assigned with different names, which most likely correspond to NTPDase1 ([598] and references therein). More recently, pH optima in physiological range for synaptosomal NTPDase1 and NTPDase2 were reported [607] in agreement with what we observed for the recombinant human and mouse orthologues.

The comparison between  $K_m$  values of plasma membrane NTPDases and  $EC_{50}$  of nucleotide receptors is of major physiological importance as it provides information on which of these enzymes can regulate particular P2 receptor function. Our results show that all apparent  $K_m$  constants of human and murine NTPDases obtained for adenine nucleotides as substrates were in the low micromolar range with the exception of rat NTPDase8 with ADP as a substrate (265  $\mu$ M). Higher  $K_m$  values were obtained for the hydrolysis of uracil nucleotides with human NTPDase1 (UDP) and human NTPDase2 (UTP), rat NTPDase8 (both UTP and UDP) and mouse NTPDase1 and NTPDase8 (UDP). Micromolar  $K_m$  values were also previously reported for NTPDases (Table 13). However, these experiments were performed with enzymes from different species, purified to different extent and with different detergents, or from intact cells or protein extracts from different transfected cell lines. Therefore, the comparison of the kinetic properties of these ecto-nucleotidases is virtually impossible. Importantly, the apparent  $K_m$  values of all human and murine NTPDases measured were consistent with the hydrolysis pattern of ATP and UTP, except the one of human NTPDase3. ADP and UDP had respectively higher and equal affinity to human NTPDase3 compared to ATP and UTP. In this case, however, the  $K_m$  values are

less important, because ADP and UDP are poor substrates of human NTPDase3, as reflected by the low  $V_{\max}$  values of their hydrolysis compared to  $V_{\max}$  of ATP and UTP hydrolysis, respectively. Accordingly, ADP and UDP accumulation was observed during ATP and UTP hydrolysis by human NTPDase3. The same explanation would also apply to the hydrolysis of ATP by porcine NTPDase2 (Table 13). It was also noteworthy that the profiles of nucleotide hydrolysis together with  $K_m$  measurements provide valuable information about nucleotide hydrolysis compared to the simple profile of substrate specificity that may sometimes lead to erroneous conclusions. For example, the latter suggests that UTP is a better substrate than ATP for human and mouse NTPDase2 while the HPLC pattern of hydrolysis showed that ATP is preferred over UTP (Figure 16C).

Some slight variations were found in the pattern of nucleotide hydrolysis between NTPDase orthologues. As it was previously shown for rat NTPDase1 [291], mouse and human NTPDase1 hydrolyze ATP to AMP with the liberation of two molecules of  $P_i$ . However, a modest and transient accumulation of ADP could be detected for human and mouse NTPDase1 that was not observed during ATP hydrolysis by rat NTPDase1. These results are consistent with the observation that pig pancreas ATPDase (truncated form of NTPDase1) hydrolyzed ATP in a step favored manner; ATP to AMP via ADP [281]. Another minor variance observed between human NTPDases 2 and 3, and their murine orthologues was their preference for adenine to uracil nucleotides as substrates.

Although there were some minor differences between NTPDases from different species, their main pattern of substrate hydrolysis remained largely similar. We may therefore expect that these enzymes would regulate P2 receptor signaling in the same way in different species. NTPDase1 would terminate the effects exerted by either ATP or UTP on P2X<sub>1-7</sub> and P2Y<sub>2,4,11</sub>, or ADP on P2Y<sub>1,12,13</sub> receptors. Indeed, endothelial NTPDase1 was shown to prevent ADP-induced platelet aggregation in the blood (via P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub>) [267, 286, 339, 569, 587] and to keep platelets functional by preventing P2Y<sub>1</sub> receptor desensitization



[338]. By generating UDP from UTP, NTPDase1 may also favor the transient activation of P2Y<sub>6</sub> receptor or may also terminate it, depending on the magnitude and identity of nucleotide release. NTPDase2 would be expected to terminate P2X<sub>1-7</sub> and P2Y<sub>2,4,11</sub> receptor activation and simultaneously provide ligands for receptors stimulated by diphosphonucleosides (P2Y<sub>1,6,12,13</sub>). This potential function of NTPDase2 was corroborated by an *in vitro* aggregation assay where its activity facilitated platelet aggregation by generating ADP in the presence of ATP [343]. NTPDase3 and NTPDase8, which efficiently hydrolyze ATP and UTP, may attenuate and/or terminate the activation of receptors for these two nucleotides (P2X<sub>1-7</sub> and P2Y<sub>2,4,11</sub>), but also favor the transient activation of ADP and UDP specific receptors (P2Y<sub>1,6,12,13</sub>), as they produce a transient accumulation of diphosphonucleosides. NTPDases 1, 8 and human NTPDase3, which hydrolyze UDP poorly compared to ADP, would be expected to form a prolonged activation of P2Y<sub>6</sub> receptor. This could be of potential interest in inflammation, as for example UDP was shown to promote IL-8 secretion in human monocytic cells by the activation of P2Y<sub>6</sub> [498].

AMP, the end product of ATP hydrolysis by NTPDases 1, 3 and 8, is further dephosphorylated by ecto-5'-nucleotidase (CD73) to adenosine, a biologically active molecule that exerts a diversity of physiological responses via its own receptors [387, 588, 601]. Our data suggest that NTPDases may have a different impact on the formation of adenosine. NTPDase1 that hydrolyzes ATP to AMP without any significant accumulation of ADP should facilitate fast appearance of adenosine. In contrast, since ecto-5'-nucleotidase is inhibited by ADP [387, 588, 601], it is expected that the formation of adenosine would be prevented in the presence of NTPDase2 alone and delayed in the presence of NTPDases 3 or 8. Indeed, the latter enzymes would be expected to generate a time lapse between the activation of P2 receptors and the subsequent activation of adenosine receptors as they require more time to produce the substrate (AMP) of CD73 and remove its inhibitor (ADP).

In summary, NTPDases have the potential to exert a tight, distinct and sophisticated regulation of P2 and adenosine receptor signaling, and therefore affect a number of biological functions. The results presented in this work in conjunction with the localization of these enzymes will help define the functions of cell surface NTPDases.

### **3.6 Acknowledgements**

We thank Mrs. Julie Pelletier for technical assistance. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-49460), The Arthritis Society (TAS01/0078) and from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ; 2822) to J.S. S.A.L. was a recipient of a scholarship from the "Fond Hydro-Québec".



## **Chapitre 4 : Spécificité d'inhibition de l'ARL 67156 pour les ecto-nucléotidases murines et humaines.**

“Specificity of ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ecto-nucleotidases.”

Dans ce chapitre, je présente sous forme d'article la caractérisation de l'inhibition de l'ARL 67156 (6-*N,N*-Diéthyl-*D*- $\beta$ - $\gamma$ -dibromométhylène adénosine triphosphate) initialement nommé FPL 67156. Cette molécule était le seul inhibiteur spécifique et disponible commercialement de l'activité ecto-ATPasique. Cependant, depuis sa découverte au milieu des années 1990, de nombreuses ecto-nucléotidases hydrolysant l'ATP extracellulaire ont été clonées et caractérisées (incluant les NTPDase1, 2, 3 et 8 décrites au chapitre 3 de la présente thèse). Ce travail a permis d'identifier quelles ecto-nucléotidases pouvaient être inhibées par l'ARL 67156. Nous avons testé son effet sur l'activité des NTPDase1, 2, 3 et 8 (de souris et humaines), les NPP1 et 3 et l'ecto-5'-nucléotidase (humaine) recombinantes. L'inhibition de l'activité a été mesurée par essai colorimétrique ou analyse HPLC à l'aide des substrats ATP, ADP et UTP pour les NTPDases, le pnp-TMP et l'Ap<sub>3</sub>A pour les NPPs et l'AMP pour l'activité ecto-5'-nucléotidase. L'ARL 67156 est un faible inhibiteur compétitif des NTPDase1, NTPDase3 et NPP1 humaines avec des  $K_i$  de l'ordre de  $11 \pm 3$ ,  $18 \pm 4$  et  $12 \pm 3$   $\mu$ M, respectivement. À la concentration généralement utilisée dans la littérature (50-100  $\mu$ M), l'ARL 67156 inhibe partiellement mais de façon significative les formes humaine et murine de ces enzymes. L'activité des NTPDase2, NTPDase8, NPP3 et de l'ecto-5'-nucléotidase est beaucoup moins affectée. L'ARL 67156, qui est un analogue des nucléotides, n'est pas hydrolysable par les NTPDase1, 2, 3, 8, la NPP1 ou la NPP3 humaine. Dans l'environnement cellulaire, l'ARL 67156 prolongera l'effet des nucléotides relâchés de manière endogène sur la signalisation par les récepteurs P2 si les NTPDase1, NTPDase3, NPP1 ainsi que la NTPDase8 chez la souris sont présentes. Néanmoins, l'ARL 67156 ne bloquera aucune ecto-nucléotidase de façon efficace lorsque de fortes concentrations de nucléotides sont ajoutées dans des essais biochimiques ou lors d'essais avec le récepteur P2X<sub>7</sub> qui nécessite des concentrations de l'ordre du mM. De plus, l'ARL 67156 ne bloque jamais de façon efficace la NTPDase2, la NTPDase8 et la NPP3 humaine, ainsi que l'ecto-5'-nucléotidase.

## Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ecto-nucleotidases

**Sébastien A. Lévesque, Élise G. Lavoie, Joanna Lecka, François Bigonnesse and Jean Sévigny\*.**

Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada.

\*Address correspondence to:

Dr. J. Sévigny  
Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie  
Centre hospitalier de l'Université Laval  
2705 Boulevard Laurier, local T1-49  
Québec (QC), Canada  
G1V 4G2  
Tel.: (418)-654-2772  
Fax: (418)-654-2765  
E-mail: Jean.Sevigny@crchul.ulaval.ca

**Keywords:** ecto-ATPase, NTPDase, CD39, NPP, ecto-5'-nucleotidase, extracellular nucleotide, ARL 67156, FPL 67156.



## 4.1 Abstract

**Background and purpose:** ARL 67156, 6-*N,N*-Diethyl-D- $\beta$ - $\gamma$ -dibromomethylene adenosine triphosphate, originally named FPL 67156, is the only commercially available inhibitor of ecto-ATPases. Since the first report on this molecule, various ecto-nucleotidases responsible for the hydrolysis of ATP at the cell surface have been cloned and characterized. In this work, we identified the ecto-nucleotidases inhibited by ARL 67156.

**Experimental procedures:** The effect of ARL 67156 on recombinant NTPDase1, 2, 3 & 8 (mouse and human), NPP1, NPP3 and ecto-5'-nucleotidase (human) have been evaluated. The inhibition of the activity of NTPDases (using the following substrates: ATP, ADP, UTP), NPPs (pnp-TMP, Ap<sub>3</sub>A) and ecto-5'-nucleotidase (AMP) was measured by colorimetric or HPLC assays.

**Key Results:** ARL 67156 was a weak competitive inhibitor of human NTPDase1, NTPDase3 and NPP1 with  $K_i$  of  $11 \pm 3$ ,  $18 \pm 4$  and  $12 \pm 3$   $\mu$ M, respectively. At concentration used in the literature (50-100  $\mu$ M), ARL 67156 partially but significantly inhibited the mouse and human forms of these enzymes. NTPDase2, NTPDase8, NPP3 and ecto-5'-nucleotidase activities were less affected. Importantly, ARL 67156 was not hydrolyzed by either human NTPDase1, 2, 3, 8, NPP1 or NPP3.

**Conclusions and implications:** In cell environments where NTPDase1, NTPDase3, NPP1 or mouse NTPDase8 are present, ARL 67156 would prolong the effect of endogenously released ATP on P2 receptors. However, it does not block any ecto-nucleotidases efficiently when high concentrations of substrates are present, such as in biochemical, pharmacological or P2X<sub>7</sub> assays. In addition, ARL 67156 is not an effective inhibitor of NTPDase2, human NTPDase8, NPP3 and ecto-5'-nucleotidase.

## 4.2 Introduction

Extracellular nucleotides such as ATP, ADP, UTP and UDP play various biological functions by activating P2X<sub>1-7</sub>, P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub> [7], cysLT1R, cysLT2R or GPR17 receptors. The latter three are G protein coupled receptors recently reported to respond to uracil nucleotides in addition to cysteinyl-leukotrienes [39, 40]. The study of nucleotide receptors and their functions is complicated by the presence at the cell surface of many enzymes, called ecto-nucleotidases, that rapidly break down nucleotides into nucleosides [310]. One nucleoside in particular, adenosine, can, in turn, act as a signalling molecule via the activation of four ubiquitous receptors (A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> and A<sub>3</sub>) [11]. Therefore, an effect thought to be due to ATP may, in fact, involve its hydrolysis product, adenosine.

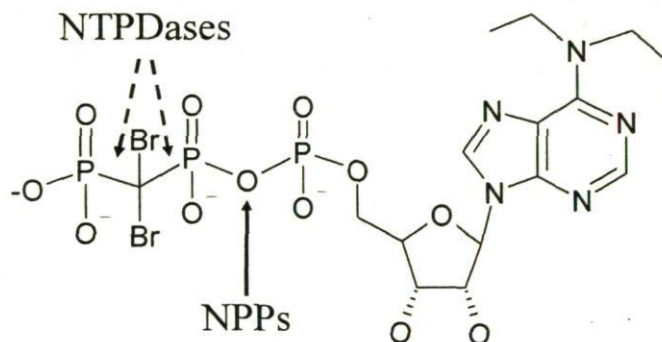


Figure 17 : Molecular structure of ARL 67156.

The arrow indicates the potential cleavage site between the α- and β-phosphates of ARL 67156 by NPPs. The site of cleavage by NTPDases between the β- and γ-phosphate is blocked by -CBr<sub>2</sub>- and can therefore not be hydrolysed by these enzymes [599] as confirmed by HPLC (see Results).



In the endeavour to develop specific tools to investigate this complex signalling system, Fisons Laboratories (now Astrazeneca, Loughborough, UK) produced a nucleotide analogue 6-*N,N*-diethyl-D- $\beta$ - $\gamma$ -dibromomethylene adenosine triphosphate (ARL 67156). This molecule was originally named FPL 67156 or AR-c67156 (see Figure 17) and is now known as ARL 67156. It was described in 1995 by Crack *et al.* (1995) as a selective inhibitor of ecto-ATPase activity from blood cells. Since this original report, ARL 67156 was shown to inhibit ecto-ATPase activity in various tissues from different species: smooth muscle membranes of mouse, rat, rabbit and guinea-pig vas deferens [614-616], rat superior cervical ganglia [617], bovine chromaffin cells [618] and rat parotid acinar cells [619]. However, it did not block ATPase activity from guinea-pig hearts [620] nor from rat nodose ganglia [617]. In agreement with the inhibition of ATP hydrolysis, ARL 67156 was shown to potentiate the contraction evoked by exogenous ATP in guinea-pig isolated vas deferens, in urinary bladder [621, 622] and in rabbit ear artery [586] as well as the responses to endogenously released ATP induced by noradrenaline, KCl, acetylcholine or histamine [621, 622]. In accord with these observations, ARL 67156 failed to enhance responses to the non-hydrolysable analogue  $\alpha$ - $\beta$ -MeATP [586, 621]. ARL 67156 was also reported as an effective inhibitor of UTP breakdown by superior cervical ganglion cells [623] and to potentiate contractions elicited by this nucleotide in isolated tail artery of rat [624].

In the past decade following the original publication on ARL 67156, several enzymes responsible for the hydrolysis of nucleotides have been identified, cloned and characterized [12]. Among these nucleotidases, four members of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family, namely NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 and NTPDase8, and two members of the ecto-nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (E-NPP) family, NPP1 and NPP3, are located at the cell surface and hydrolyze extracellular nucleotides and derivatives [12, 86, 310, 625]. NTPDases dephosphorylate a variety of nucleoside triphosphates (for example, ATP and UTP) and diphosphates (for example, ADP and UDP) in the presence of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ ), with different specificity and ability. NTPDase1 (also called CD39 or vascular ATPDase) dephosphorylates ATP to

AMP, removing one phosphate at a time with a modest appearance of ADP. In contrast, NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) hydrolyzes ATP to ADP, with minimal AMP accumulation. NTPDase3 (CD39L3, HB6) and NTPDase8 (hepatic ATPDase) are functional intermediates as they convert ATP to AMP with a transient accumulation of ADP [86]. As for NPP1 (PC-1), NPP2 (PD-1 $\alpha$ , autotaxin) and NPP3 (CD203c, PD-1 $\beta$ , B10, gp130<sup>RB13-6</sup>), they release nucleoside 5'-monophosphate from a variety of nucleotides and nucleotide derivatives [349]. For example, these enzymes catalyse the hydrolysis of ATP to AMP and pyrophosphate (PP<sub>i</sub>), Ap<sub>3</sub>A to AMP and ADP, etc. Compared to NPP1 and NPP3, NPP2 is a rather poor phosphodiesterase [350] that bears an intrinsic lysophospholipase-D activity [346]. In addition, NPP2 was recently shown to be a zymogen (pre-pro-enzyme) proteolytically cleaved and secreted rather than a membrane protein [346]. Finally, monophosphonucleosides (for example, AMP) are hydrolysed to nucleosides (for example, adenosine) and P<sub>i</sub> by ecto-5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl phosphatidylinositol-anchored enzyme located at the cell surface [626].

In the recent literature, there is a confusion regarding the specificity of ARL 67156, as it was described as a 'non specific inhibitor of ecto-nucleotidases' [627, 628], a 'non specific ecto-triphosphate nucleotidase [*Sic*] inhibitor' [627], an 'inhibitor of the ecto-NTPDases' [629], a 'specific inhibitor of NTPDase1' [630], an 'inhibitor of NTPDase1 and NTPDase2 activities in several tissues' [627], or even a 'selective ecto-5'-nucleotidase inhibitor' [631]. In fact, the only clues regarding the identity of the enzyme(s) influenced by ARL 67156, so far, are its capacity to block ATP, ADP and UTP hydrolysis [586, 623, 632], three excellent substrates of NTPDases [86], and a report in 2002 by Sesti *et al.* [633] showing that ARL 67156 decreased ATPase and ADPase activity (between 25%-37%) of an artificial recombinant soluble form of human NTPDase1 (solCD39) when used at twice the concentration of substrate. Nevertheless, it remains unclear whether ARL 67156 can also affect the native membrane-bound NTPDase1. Indeed, the membrane environment of NTPDases is important for their activity and substrate specificity as they are altered in the presence of detergent or when the transmembrane domains are removed [309, 634].



Hitherto, the identity of the ecto-nucleotidases influenced by ARL 67156 remains uncharacterized [310, 635].

In this work, we have investigated the specificity of ARL 67156 on the ecto-nucleotidases present at the cell surface, namely NTPDase1, 2, 3 and 8, NPP1 and NPP3, and ecto-5'-nucleotidase. We also looked at the capacity of human NTPDases and NPPs to enzymatically cleave the P-C-P bond or the diphosphoester bond between  $\alpha$ - and  $\beta$ -phosphates of ARL 67156, respectively (Figure 17).

## **4.3 Material and Methods**

### **4.3.1 Plasmids**

The plasmids used in this study have all been described in published reports: human NTPDase1 (GenBank accession no. U87967; [286], human NTPDase2 (NM\_203468; [602], human NTPDase3 (AF034840; [295], human NTPDase8 (AY430414; [308], mouse NTPDase1 (NM\_009848; [338], mouse NTPDase2 (AY376711; [86], mouse NTPDase3 (AY376710; [296], mouse NTPDase8 (AY364442; [307], human ecto-5'-nucleotidase (DQ186653; [636]), human NPP1 (NM\_006208; [351] and human NPP3 (NM\_005021; [356]).

### **4.3.2 Cell transfection and preparation of membrane fraction**

COS-7 and HEK 293T cells were transfected in 10 cm plates using Lipofectamine (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), as previously described [86]. Briefly, 80-90% confluent cells were incubated for 5 h at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium, nutriment mix F-12 (DMEM/F-12) in the absence of fetal bovine serum (FBS) with 6  $\mu$ g of plasmid DNA and 24  $\mu$ l of Lipofectamine reagent. The reaction was stopped by the addition of an equal volume of DMEM/F-12 containing 20% FBS and the cells were harvested 44-72 h later.

For the preparation of protein extracts, transfected cells were washed three times with Tris-saline buffer at 4°C, collected by scraping in the harvesting buffer (in mM, 95 NaCl, 0.1 PMSF, 45 Tris, pH 7.5), and washed twice by  $300 \times g$  centrifugation for 10 min at 4°C. Cells were resuspended in the harvesting buffer containing  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  aprotinin and sonicated. Nucleus and cellular debris were discarded by centrifugation at  $300 \times g$  for 10 min at 4°C and the supernatant (crude protein extract), was aliquoted and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used for activity assays. Protein concentration was estimated by the Bradford microplate assay using BSA as a standard [593].

### 4.3.3 Enzymatic assays

*NTPDases (EC 3.6.1.5)*. Activity was measured as described previously [593] in 0.2 mL of incubation medium (5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 80 mM Tris, pH 7.4) or Tris-Ringer buffer (in mM, 120 NaCl, 5 KCl, 2.5  $\text{CaCl}_2$ , 1.2  $\text{MgSO}_4$ , 25  $\text{NaHCO}_3$ , 5 glucose, 80 Tris, pH 7.4) at 37°C with or without ARL 67156 (Sigma-Aldrich, ON, Canada (lots # 084K4610 and # 098H4727) or Tocris, Ellisville, MO, USA (lot #3 and #4)). NTPDase protein extracts were added to the incubation mixture and pre-incubated at 37°C for 3 min. The reaction was initiated by the addition of 10-500  $\mu\text{M}$  ATP, ADP or UTP and stopped after 15 min with 50  $\mu\text{L}$  of malachite green reagent. The released inorganic phosphate ( $\text{P}_i$ ) was measured at 630 nm according to Baykov *et al.* [594]. The type of inhibition was determined by Dixon and Cornish-Bowden plots of four independent experiments and  $K_i$  using nonlinear regression.

For intact cells, activity at the cell surface of transiently transfected cells were carried out in 0.25 mL of incubation medium containing 145 mM NaCl in 24 well plates. The reaction was stopped by sampling an aliquot of 0.2 mL promptly mixed with 50  $\mu\text{L}$  of malachite reagent and  $\text{P}_i$  determined as indicated above. The activity obtained from cells transfected with a control plasmid was subtracted from the one obtained with NTPDase-transfected cells.



*NPPs* (EC 3.1.4.1; EC 3.6.1.9). Evaluation of the effect of ARL on human NPP1 and NPP3 activity was carried out with para-nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate (pnp-TMP) and Ap<sub>3</sub>A as substrates [36, 353]. The reactions were carried out at 37°C in 0.2 mL of the following incubation mixture, in mM, 1 CaCl<sub>2</sub>, 140 NaCl, 5 KCl, and 50 Tris, pH 8.5, with or without ARL 67156 (100 μM) or ATP (100 μM). Human NPP1 or NPP3 extract was added to the incubation mixture and pre-incubated at 37°C for 3 min. Reaction was initiated by the addition of 100 μM pnp-TMP or Ap<sub>3</sub>A. For pnp-TMP, the production of paranitrophenol was measured at 410 nm, 15 min after the initiation of the reaction. For Ap<sub>3</sub>A, the reaction was stopped after 30 min by transferring an aliquot of 0.1 mL from the reaction mixture to 0.125 mL ice-cold 1 M perchloric acid. The samples were centrifuged for 5 min at 13 000 × g. Supernatants were neutralized with 1 M KOH (4°C) and centrifuged for 5 min at 13 000 × g. An aliquot of 20 μL was separated by reverse-phase high performance chromatography (HPLC) to evaluate the nucleotide content of each reaction sample (see below). The type of inhibition and K<sub>i</sub> was calculated by plotting the data of three independent experiments using pnp-TMP as substrate according to Dixon and Cornish-Bowden methods.

*Ecto-5'-nucleotidase* (EC 3.1.3.5). Activity was measured at 37°C for 15 min in 0.2 mL of incubation solution (in mM, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 200 NaCl, 10 KCl, 100 Tris, pH 7.5), with or without ARL 67156. Reaction was started by the addition of 100 μM AMP and stopped with 50 μL malachite green reagent after 15 min. Released inorganic phosphate was measured as described above for NTPDases.

#### **4.3.4 Evaluation of ARL 67156 as a potential substrate for human NTPDases and NPPs**

The potential hydrolysis of ARL 67156 and its parent compound β,γ-MeATP by human NTPDase1, 2, 3 and 8 and human NPP1 and NPP3 was evaluated. In this experiment, ATP, ARL 67156 or β,γ-MeATP was incubated with the indicated NTPDase or NPP, in the appropriate reaction medium, as described above under the respective enzyme assays.

Reactions were stopped after 60 min by the addition of an equivalent volume of ice cold  $\text{CHCl}_3$  and vigorous mixing. The samples were immediately centrifuged for 5 min at  $13\,000 \times g$ , the aqueous phases were collected and aliquots of 20  $\mu\text{L}$  separated by reverse-phase HPLC to evaluate the disappearance of ARL 67156 and appearance of new peaks expected to correspond to hydrolysis products (6-*N,N*-diethyl-ADP and 6-*N,N*-diethyl-AMP). HPLC conditions are described below.

#### 4.3.5 Separation and quantification of nucleotides and dinucleotides by HPLC

An aliquot of 20  $\mu\text{L}$  of the reaction products (described above) was used for nucleotide analysis by HPLC using a 15 cm  $\times$  4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$  SUPELCOSIL™ LC-18-T column (Supelco, Bellefonte, PA, USA).  $\beta,\gamma$ -MeATP and its hydrolysis product AMP were separated with a mobile phase composed of 25 mM tetrabutyl ammonium (TBA), 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0 and 2% methanol (v/v), at a flow rate of 0.75  $\text{mLmin}^{-1}$  for the first 11 min and 1.4  $\text{mLmin}^{-1}$  for the following 14 min. Separated nucleotides were detected by ultraviolet absorption at 260 nm, identified and quantified by the comparison of the retention time with the appropriate standards.  $\text{Ap}_3\text{A}$  was eluted using a step gradient of MeOH in the same mobile phase at a flow rate of 1  $\text{mLmin}^{-1}$ . The step gradient was carried out for 25 min with 2% MeOH, then 10% MeOH for 15 min, and finally the column was re-equilibrated with 2% MeOH for 15 min before the next run. We measured the potential hydrolysis of ARL 67156 using a mobile phase composed of 8 mM TBA, 100 nM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25% AcN, pH 6.0 at a flow rate of 1.4  $\text{mLmin}^{-1}$ , by measuring ARL 67156 decrease and by verifying the appearance of a new peak corresponding to the expected degradation product 6-*N,N*-diethylAMP, detected by UV absorption at 277 nm. Since this molecule is not available commercially, we evaluated the retention time of 6-*N,N*-dimethylAMP, kindly provided by Dr. Bilha Fischer (Bar-Ilan University, Ramat Gan, Israel), assuming that it would have an elution time close to 6-*N,N*-diethylAMP. The retention time of 6-*N,N*-dimethylAMP and ARL 67156 were 6 and 19 min, respectively.



### 4.3.6 Reagents

ADP, ATP, BSA, KCl, malachite green, para-nitrophenol, pnp-TMP, PMSF, TBA and UTP were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Ammonium molybdate, NaCl, Tris and Tween 20 were provided by EMD chemicals (Gibbstown, NJ, USA). Acetonitrile (AcN), CaCl<sub>2</sub> and perchloric acid (HClO<sub>4</sub>) were acquired from Fischer Scientific (Ottawa, ON, Canada). ARL 67156 was obtained from both Tocris (Ellisville, MO, USA) and Sigma-Aldrich (for further details see Enzymatic assays and Results). Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) was from Laboratoire MAT (Québec, QC, Canada).

## 4.4 Results

The ecto-ATPases inhibited by ARL 67156 are expected to be NTPDases and/or NPPs [36, 635, 637]. NTPDase1, 2, 3 and 8 that are bound to the plasma membrane have been tested while NTPDase4-7, that are mainly associated with intracellular organelles [12, 86], have been excluded from this study. In addition, another family of ecto-nucleotidases, the NPPs, was tested. Protein extracts from COS-7 or HEK 293T cells transiently transfected with an expression vector encoding mouse or human recombinant NTPDase1, 2, 3 or 8 or human NPP1 or 3 were used as a source of enzymes.

### 4.4.1 ARL 67156 is a non-hydrolysable ATP analogue

We first tested whether ARL 67156 could be hydrolysed by ecto-nucleotidases. Theoretically, this molecule is not expected to be hydrolyzed by NTPDases, as the phosphodiester bond (P-O-P) present in ATP is substituted by a phosphomethyl bond (P-C-P). However, this resistance to hydrolysis was only verified for bovine NTPDase1 with the parent compound  $\beta,\gamma$ -MeATP [599]. To confirm the absence of ARL 67156 hydrolysis by NTPDases, we incubated 500  $\mu$ M of ARL 67156 in parallel with the parent compound  $\beta,\gamma$ -MeATP, and with ATP, a substrate of NTPDase1, 2, 3 and 8, with large amount of transfected HEK 293T membrane protein extract (12  $\mu$ g) for 60 min. The resulting samples were separated and analysed using reverse-phase HPLC. In these conditions, ATP was

hydrolysed by over 85% by human NTPDase1, 2, 3 and 8 (100, 92, 97, 85%, respectively), but no significant decrease in ARL 67156 nor in  $\beta,\gamma$ -MeATP concentration could be detected. In addition, no new peaks corresponding to potential hydrolysis product could be observed (data not shown).

In contrast, as NPP1 and NPP3 generate nucleoside 5'-monophosphate from a variety of dinucleotides, nucleotides and nucleotide derivatives [13, 638], it could therefore be expected that these enzymes would hydrolyze ARL 67156 to 6-*N,N*-diethyl-adenosine 5'-monophosphate and  $(\text{PO}_3)\text{CBr}_2(\text{PO}_3)$ , as depicted in Figure 17. Consequently, we evaluated by HPLC the hydrolysis of ARL 67156 in parallel with the parent compound  $\beta,\gamma$ -MeATP as a control. In these conditions, no conversion of ARL 67156 could be detected by either recombinant human NPP1 or NPP3, even after incubating 100  $\mu\text{M}$  of ARL 67156 in the presence of large amount of transfected HEK 293T cell lysate (25  $\mu\text{g}$ ) for 2 h while 16-23% of the parent compound  $\beta,\gamma$ -MeATP was hydrolysed to AMP by both NPPs.

It is noteworthy to mention that in our preliminary experiments, when we used the usual  $\text{HClO}_4$  precipitation followed by KOH neutralization, the peak corresponding to ARL 67156 on HPLC profiles was completely replaced by two unknown peaks with lower retention times, suggesting a degradation of ARL 67156 under acidic condition.

#### **4.4.2 Effect of ARL 67156 on ecto-NTPDases**

The inhibition of ATP hydrolysis by NTPDases was evaluated in two different buffers. In Tris- $\text{Ca}^{2+}$  buffer, at the concentration generally used in the literature (100  $\mu\text{M}$ ), ARL 67156 was not able to block the hydrolysis of 500  $\mu\text{M}$  ATP by any of the human recombinant NTPDases (Figure 18A). However, at a higher ARL 67156/ATP ratio (100  $\mu\text{M}/10 \mu\text{M}$ ), an efficient inhibition of human NTPDase1 and 3 was observed, while NTPDase2 and 8 were less affected (Figure 18A). Similar results were obtained in Ringer buffer for human NTPDases (data not shown). Figure 19 shows that both human NTPDase1 and 3 were inhibited in a competitive manner with  $K_i$  of  $11 \pm 3$  and  $18 \pm 4 \mu\text{M}$ , respectively, as



determined by Dixon and Cornish-Bowden representations (data not shown for the latter) and non-linear regression. Note that no differences were seen with different batches of ARL 67156 purchased from Sigma or Tocris (see Methods for details) when using human NTPDase1 protein extracts (data not shown).

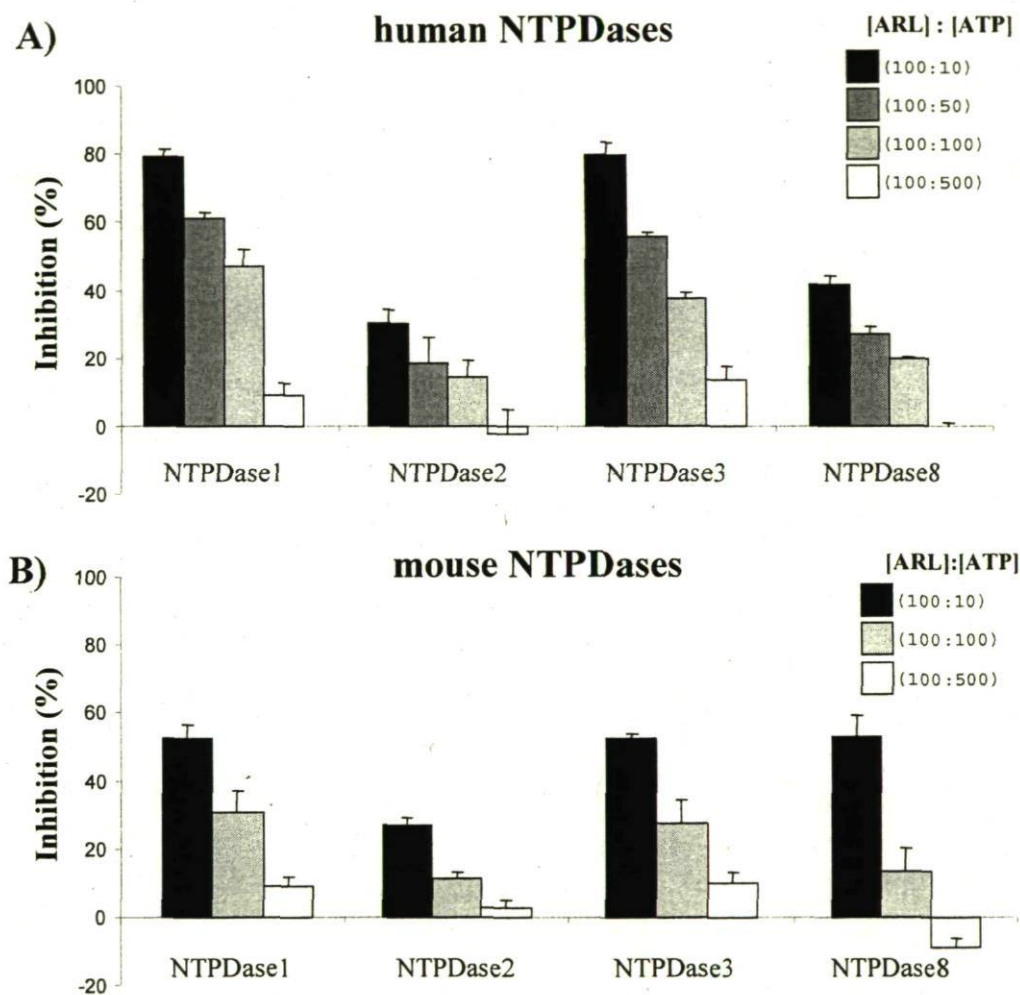
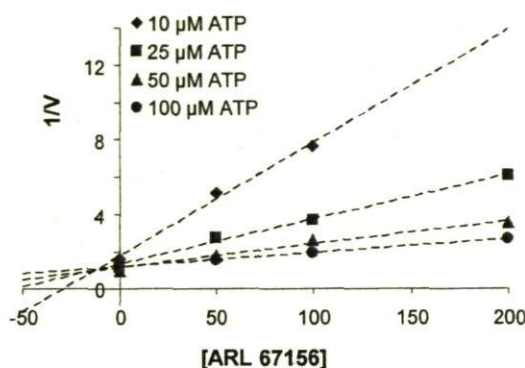
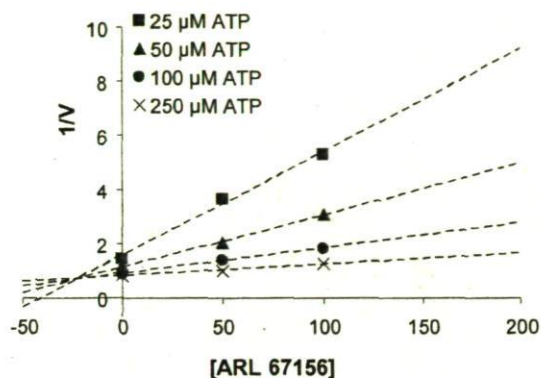


Figure 18 : Effect of ARL 67156 on human and mouse NTPDases.

ATPase activity of protein extracts from HEK 293T or COS-7 cells transfected with human or mouse NTPDase1, 2, 3 or 8 was tested with or without ARL 67156. The concentration of ARL 67156 was set at 100  $\mu$ M and the concentration of ATP ranged from 10 to 500  $\mu$ M, as indicated. Reaction was carried out for 15 min in the presence of 5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 80 mM Tris, pH 7.4. In each of these assays, less than 10% of the substrate was hydrolysed. The modest increases in activity of human NTPDase2 and mouse NTPDase8 at 500  $\mu$ M ATP are not statistically different from the controls. **A)** human NTPDases. **B)** mouse NTPDases. The means  $\pm$  SEM of three to ten experiments, each performed in triplicate, is shown.

**A) Human NTPDase1****B) Human NTPDase3**

**C)**

	Type of Inhibition	$K_i$
<b>NTPDase1</b>	Competitive	$11 \pm 3 \mu\text{M}$
<b>NTPDase3</b>	Competitive	$18 \pm 4 \mu\text{M}$

Figure 19 : Determination of the kinetic parameters for the inhibition of human NTPDase1 and NTPDase3 by ARL 67156.

**A** and **B**) Dixon plot of a representative experiment out of four is shown with ATP concentration ranging from 10 to 100  $\mu\text{M}$  for human NTPDase1 (Panel A) or 25 to 250  $\mu\text{M}$  for human NTPDase3 (Panel B). In both panels ARL 67156 concentrations were 0, 50, 100 or 200  $\mu\text{M}$ , as indicated. **C**) Inhibition type and the  $K_i$  (mean  $\pm$  SEM) obtained from four independent experiments, each performed in triplicate, are indicated.

Importantly, when used at the same concentration, ARL 67156 blocked the hydrolysis of UTP by both human NTPDase1 and NTPDase3 more efficiently than the hydrolysis of ATP, while the inhibition of ADP hydrolysis was in between (Table 14). Mouse NTPDases were similarly inhibited, although to a lesser extent compared to their human counterpart. At 100  $\mu\text{M}$  ARL and 10  $\mu\text{M}$  ATP, a maximal inhibition of approximately 50% for NTPDase1 and 3 was observed (Figure 18B) compared to ~80% for their human orthologs (Figure 18A). We also confirmed that ARL 67156 (100  $\mu\text{M}$ ) decreased ATP hydrolysis (100  $\mu\text{M}$ ) similarly on intact COS-7 cells transfected with plasmid encoding these enzymes. Figure 20 shows that NTPDase1 and 3 were both significantly inhibited by ARL 67156 for both species, although slightly less than with protein extracts (Figure 18).



Table 14 : Comparative effect of ARL 67156 on the biochemical activity of human NTPDases.

Enzyme	% inhibition (100 $\mu$ M substrate and 100 $\mu$ M ARL 67156)		
	ATP n = 4-9	ADP n = 3	UTP n = 3
NTPDase1	48 $\pm$ 5	70 $\pm$ 4	89 $\pm$ 2
NTPDase2	15 $\pm$ 5	1 $\pm$ 6	25 $\pm$ 6
NTPDase3	42 $\pm$ 5	69 $\pm$ 3	73 $\pm$ 3
NTPDase8	20.1 $\pm$ 0.4	21 $\pm$ 4	38 $\pm$ 1

Note that only minor inhibition for either human or mouse NTPDase2 was observed even in the presence of 10 fold excess of ARL 67156 compared to ATP (100  $\mu$ M vs 10  $\mu$ M; Figure 18). Human NTPDase8 was hardly affected (Figures 18A and 20A). A modest but significant inhibition of mouse NTPDase8 could be seen with concentration equal to ATP with both protein extract and intact cells (Figures 18B and 20B). The inhibition of mouse NTPDase8 was more obvious at a ten-fold excess of ARL 67156 with the protein extract (Figure 20B). As the inhibition of mouse and human NTPDase8 was slightly different, we also tested the hydrolysis of ADP in the presence of ARL 67156 for these two enzymes. Interestingly, 100  $\mu$ M ARL 67156 blocked hydrolysis of ADP (100 $\mu$ M) by mouse NTPDase8 by 51 $\pm$ 1%, while ATP hydrolysis was inhibited by only 14  $\pm$  7% (data not shown). No significant differences between inhibition of ATP and ADP hydrolysis was observed with the human ortholog (Table 14).

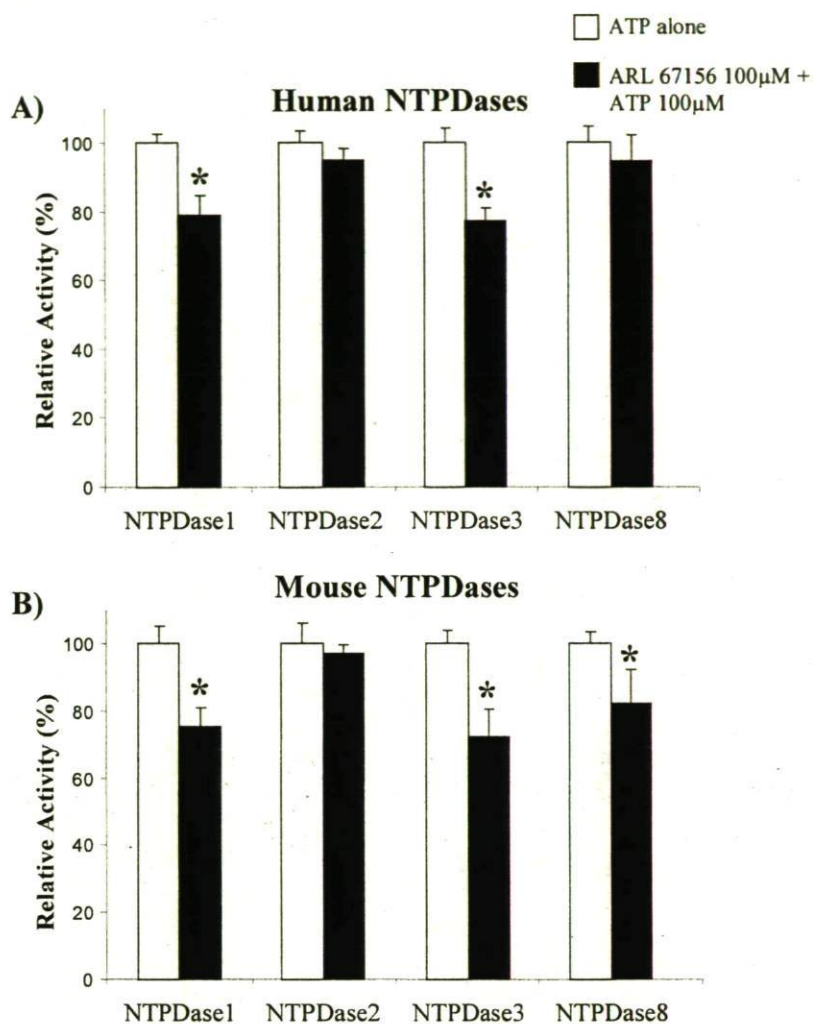


Figure 20 : Effect of ARL 67156 on ATP hydrolysis by NTPDases expressing cells.

Activity of intact COS-7 cells transfected with NTPDase1, 2, 3 or 8 was measured in 24 well plates. Cells were preincubated 3 min with or without 100  $\mu$ M ARL 67156, then the reaction was started with 100  $\mu$ M ATP. **A)** human NTPDases. **B)** mouse NTPDases. The means  $\pm$  SEM of four independent experiments, each performed in triplicate, is shown; A star (\*) indicates significant differences as evaluated by Student T test analysis (p values <0.05).



#### 4.4.3 Effect of ARL 67156 on NPP1 and NPP3 activity

Indirect evidences suggested that NPPs could also be affected by ARL 67156: (1) ARL 67156 potentiated the contraction evoked by  $Ap_4A$  in guinea-pig vas deferens [635] and NPPs hydrolyse  $Ap_nA$  [36, 637], (2) Farahbakhsh showed that pre-treatment with PPADS and ARL 67156 had similar effect on nonpigmented epithelium  $Ca^{2+}$  mobilisation in response to UTP and proposed that NPP1 was the enzyme affected [627] since PPADS was shown to block NPP1 [639]. Considering that both NPP1 and NPP3 could hydrolyse ATP to AMP +  $PP_i$ , we investigated whether ARL 67156 could inhibit these enzymes. However, the ATPase activity measured in transfected HEK 293T or COS-7 cell extracts was only 25% higher than in controls (transfected with inactive NPP3 plasmid or untransfected cell extracts). Therefore, to determine whether ARL 67156 inhibits ecto-NPP activity, and since ATP was poorly hydrolysed, we compared the capacity of ARL 67156 and ATP, both at 100  $\mu M$ , to block the hydrolysis of the nucleotide analogue pnp-TMP (100  $\mu M$ ) by human NPP1 and NPP3. Human NPP1 activity was decreased by  $73 \pm 5\%$  in the presence of ARL 67156, and by  $94 \pm 4\%$  with ATP, while human NPP3 remained unaffected (Figure 21A). Further kinetic analysis of human NPP1 using Dixon and Cornish-Bowden representations showed a competitive inhibition for ARL 67156 with a  $K_i$  of  $12 \pm 3 \mu M$ , and a mixed type of inhibition for ATP (Figure 21B and C). ARL 67156 could also inhibit NPP1 hydrolysis of the more physiological substrate  $Ap_3A$ , showing about 40% inhibition in the presence of ARL 67156. Again, NPP3 activity was unaffected by ARL 67156 (data not shown).

#### 4.4.4 Effect of ARL 67156 on ecto-5'-nucleotidase

Finally, we addressed the possibility that ARL 67156, being an analogue of ATP, could influence the activity of ecto-5'-nucleotidase. Indeed, nucleotides like ADP and ATP in micromolar concentration as well as  $\alpha, \beta$ -MeADP in nanomolar concentration are highly effective competitive inhibitors of this enzyme [626]. At the same concentration as the substrate, 100  $\mu M$ , ARL 67156 inhibited human ecto-5'-nucleotidase by  $28 \pm 3\%$  while ATP and ADP were more effective inhibitors of AMP hydrolysis giving an inhibition of 40 and 70%, respectively (data not shown).

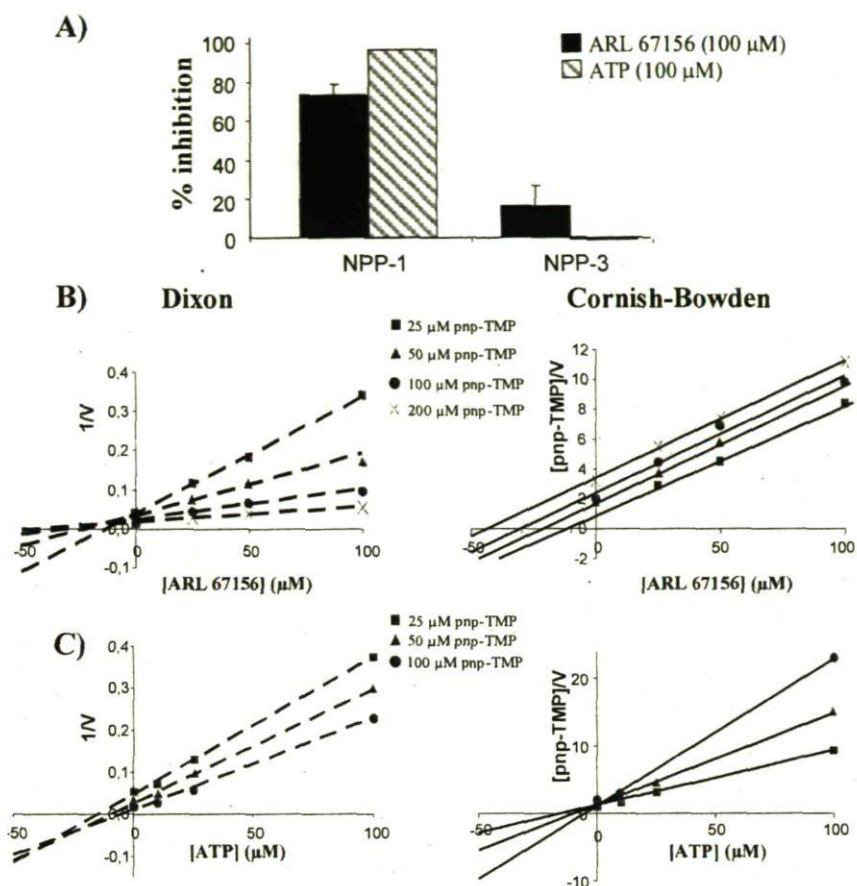


Figure 21 : Effect of ARL 67156 and ATP on pnp-TMP hydrolysis by human NPP1 and NPP3.

**A)** Cell lysates from HEK 293T cells transfected with human NPP1 or NPP3 were preincubated with or without 100  $\mu$ M ATP or 100  $\mu$ M ARL 67156 and the reaction started by the addition of 100  $\mu$ M pnp-TMP. The activity was evaluated by measuring the absorbance of pnp produced at 410 nm. The average  $\pm$  SEM of three independent experiments, each performed in triplicate, is shown.

**B and C)** Dixon and Cornish-Bowden plots of a representative experiment out of three is presented for both ARL 67156 (panel B) and ATP (panel C) inhibition of pnp-TMP hydrolysis by human NPP1. Concentrations used for pnp-TMP ranged from 25-200  $\mu$ M and ARL 67156 or ATP concentrations from 0-100  $\mu$ M for panel B and C, respectively.



## 4.5 Discussion

In the present work, we showed that among the ecto-nucleotidases that break down extracellular nucleotides involved in P2 receptor signalling, ARL 67156 was a weak competitive inhibitor of NTPDase1 (CD39), NTPDase3 and NPP1, with  $K_i$  of 11, 18 and 12  $\mu\text{M}$ , respectively (Figures 19 and 21). ARL 67156 was not an effective inhibitor of NTPDase2, NPP3 and ecto-5'-nucleotidase (CD73), although it could also reduce the activity of these enzyme. ARL 67156 affected human and mouse NTPDase8 differently. While it inhibited ADP hydrolysis by mouse NTPDase8 more effectively than ATP hydrolysis (data not shown), it was a poor inhibitor of human NTPDase8. Previous reports showed a  $\text{pIC}_{50}$  of 4.62 ( $\sim 24 \mu\text{M}$ ) for the ecto-ATPase activity of human blood cells [586] and 5.1 ( $\sim 8 \mu\text{M}$ ) for rat vas deferens [615]. In a recent report using a capillary electrophoresis method, Iqbal *et al.* [640] showed the effect of ARL 67156 on three rat NTPDases. NTPDase1 and NTPDase3 were inhibited with a  $K_i$  of 27 and 112  $\mu\text{M}$ , while NTPDase2 was inefficiently blocked by ARL 67156 ( $K_i > 1 \text{ mM}$ ). Although the  $K_i$  values measured in the latter study are slightly higher than the one evaluated here for the human orthologs, the inhibition of rat NTPDase1, 2 and 3 by ARL 67156 is in agreement with the data presented here on the human and mouse orthologs. These minor differences may be due to the species, the assay conditions and/or the method used for  $K_i$  determination. In this paper, Iqbal *et al.* focus their study on the description of a new technique for the rapid versatile and automated screening of ecto-nucleotidase inhibitors.

These data suggest that ARL 67156 would delay nucleotide hydrolysis in tissues where NTPDase1, NTPDase3 or NPP1 are present but would exert a minor effect in tissues expressing NTPDase2, NPP3 or ecto-5'-nucleotidase. In the case of NTPDase8, ARL 67156 would be expected to slow down nucleotide hydrolysis in mouse, but not in human, tissues. Therefore, in tissues where ARL 67156 was described to block ATP hydrolysis such as vas deferens, superior cervical ganglia, chromaffin cell, urinary bladder, ear and tail arteries, and parotid acinar cells [586, 614-619, 621, 622, 624], NTPDase1, NTPDase3 and/or NPP1 would be expected to play a pivotal role in extracellular nucleotides hydrolysis. Indeed the inhibition of ATP hydrolysis in ear and tail arteries by ARL 67156

could be explained by NTPDase1 as it is the major ecto-nucleotidase expressed by the vascular endothelium [286, 338, 587]. In other tissues with high ecto-nucleotidase activities and where ARL 67156 had no effect, NTPDase2, NPP3, or potentially NTPDase8 depending of the species, would be expected to be more important as for example in heart and nodose ganglia [617, 620]. Hence, the lack of inhibition by ARL 67156 of the activity from guinea-pig hearts [620] could be explained by NTPDase2 that is highly expressed in this tissue [343, 641]. The complete correlation between ARL 67156 inhibition and the identity of the ecto-nucleotidases involved in a given tissue will be possible when the complete localization of these enzymes has been accomplished; this is already thoroughly investigated with specific antibodies in our laboratory and others (for more information see the recent review of [12]). Finally, ARL 67156 had a modest effect on ecto-5'-nucleotidase and would thereby not be expected to interfere with AMP hydrolysis directly. However, ARL 67156 could delay the formation of adenosine indirectly by decreasing both the formation of ecto-5'-nucleotidase substrate (AMP) and the breakdown of its potent inhibitors (ATP and ADP) as a consequence of NTPDase1 and NTPDase3 inhibition.

The data presented here also suggest that ARL 67156 would not be efficient in blocking any ecto-nucleotidase in experiment where high concentrations of ATP are involved, as in the activation of P2X<sub>7</sub> receptors. This would happen even in the presence of NTPDase1, NTPDase3 and/or NPP1, as millimolar concentration of ARL 67156 would still be expected to be insufficient to inhibit these enzymes. Furthermore, high concentrations of ARL 67156 were reported to affect P2U (P2Y<sub>2</sub> or P2Y<sub>4</sub>), P2T (mainly P2Y<sub>12</sub>) and P2X (most probably P2X<sub>1</sub> [642] but possibly other P2X) receptors from rabbit ear artery with a pA<sub>2</sub> of 3.3 or less ( $\geq 500 \mu\text{M}$ ) [586]. A more recent study showed that at a concentration 300-fold higher than the one needed to block ecto-ATPase activity, ARL 67156 affected P2Y receptors on bovine chromaffin cells [618]. An effect on other P2 receptors among the fifteen P2 receptors (P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub> and P2X<sub>1-7</sub>) [7] and the three cysteinyl-leukotrienes/uracil nucleotides G protein coupled receptors [39], can also not be excluded as there are no studies reporting the effect of ARL 67156 on all known nucleotide receptors.



An important characteristic of ARL 67156, though, is its high stability toward the action of several ecto-nucleotidases compared to ATP. ARL 67156 differs from ATP by two modifications, (1) the phosphodiester bond (P-O-P) between the  $\beta$ - and  $\gamma$ -phosphates is substituted by a phosphodibromomethyl bond (P-CBr<sub>2</sub>-P) and (2) two ethyl groups are added to the primary amine in position 6 of the adenine ring (Figure 17). The phosphate chain modification theoretically confers resistance to hydrolysis by NTPDases. In agreement with these assumptions, in conditions where over 85% of ATP was hydrolyzed, we did not observe any hydrolysis of ARL 67156 or of the parent compound  $\beta,\gamma$ -MeATP by human NTPDase1, 2, 3 and 8. Alternatively, NPP1 and NPP3 could theoretically hydrolyse this compound since they cleave their substrates after the alpha phosphate (that is,  $\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$ ), which remains unaltered in ARL 67156. In our hands, we could not see any hydrolysis of ARL 67156 even when it was incubated with large amount of human NPP1 or NPP3. Since in these conditions, the parent compound  $\beta,\gamma$ -MeATP was efficiently hydrolysed to AMP, this suggest that either the modification on the adenine ring, or the two bromide on the carbon between the terminal phosphates adjacent to the cleavage site, would be responsible for this resistance to NPP hydrolysis. Nevertheless, the higher chemical stability compared to ATP and the inability of both NTPDases and NPPs to hydrolyse ARL 67156 suggests that it can remain available for a long period of time, albeit it is unstable in highly acidic condition as suggested by the disappearance of ARL 67156 peak in HPLC after treatment of the samples with 0.5N HClO<sub>4</sub>.

Interestingly, when we investigated the capacity of NPP1 and NPP3 to hydrolyse ATP, we measured only a low appearance of AMP and pyrophosphate (PP<sub>i</sub>). These observations combined with the fact that other reports on NPPs used only more sensitive techniques, that is radiolabelled ATP or the synthetic substrate pnp-TMP, suggest that the breakdown of ATP by NPP1-3 [349] would be less important than the one by NTPDases, at least when using the recombinant enzymes.

In conclusion, we showed that ARL 67156 is a weak competitive inhibitor of NTPDase1, NTPDase3 and NPP1, and is not an effective inhibitor of NTPDase2, NPP3 and ecto-5'-nucleotidase. In addition, ARL 67156 is also a weak inhibitor of mouse NTPDase8, especially on ADPase activity, but not of human NTPDase8. On the one hand, our results suggest that in cell environment at the concentration usually used (50-100  $\mu$ M), ARL 67156 would prolong the effect of ATP on P2 receptors if NTPDase1, NTPDase3 or NPP1 are the dominant ecto-nucleotidases in the system investigated. On the other hand, our biochemical data suggest that in assays where large concentrations of exogenous nucleotides are used, or on cells expressing NTPDase2 or NPP3, ARL 67156 would be unable to block ATP hydrolysis. Hence, ARL 67156 can be used with some precaution. Highly effective broad range and specific inhibitors of NTPDases and NPPs still need to be developed to allow the functional study of these enzymes and of P2 receptor signalling in tissues expressing ecto-nucleotidases.

#### **4.6 Acknowledgements**

We thank Dr. A.F. Knowles, Dr. T.L. Kirley, Dr. J.W. Goding and Dr. K. Sano for providing plasmids encoding human NTPDase2, NTPDase3, NPP1 and NPP3, respectively. A special thank to Dr M. Singh Rana for the cloning of human ecto-5'-nucleotidase (manuscript in preparation). We also thank Dr. B. Fischer and I. Kogan for the kind gift of the 6,*N,N*-dimethyl AMP molecule. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and The Arthritis Society of Canada (TAS01/0078). S.A.L. was the recipient of a scholarship from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ), E.G.L. of both "Fonds de Recherche sur l'Arthrite et les Maladies Rhumatismales de l'Université Laval" (FRAMR) and FRSQ, and J.S. of a New Investigator award from the CIHR.

#### **4.7 Statement of conflicts of interest**

The authors state no conflict of interest.



## Chapitre 5 : La NTPDase1 régule les fonctions associées au récepteur P2X<sub>7</sub> des macrophages murins.

“NTPDase1 governs P2X<sub>7</sub>-dependent functions in murine macrophages”

Dans ce chapitre je présente sous forme d'article, la confirmation que la NTPDase1 est exprimée par les macrophages péritonéaux de souris élicités aux thioglycollate où elle est l'ecto-nucléotidase majeure. Les macrophages isolés de souris déficientes en NTPDase1 (*entpdl*<sup>-/-</sup>) perdent complètement l'activité ecto-ADPase et presque complètement l'activité ecto-ATPase comparativement aux macrophages obtenus de souris sauvages (*entpdl*<sup>+/+</sup>). Je présente aussi une fonction de la NTPDase1 que nous avons pu mettre en évidence soit le contrôle des fonctions associées à l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub>, un récepteur ionotrope sensible à l'ATP qui collabore avec le complexe multiprotéique inflammasome. À ce jour, nous connaissons peu la régulation de fonctions associées à P2X<sub>7</sub>. Les macrophages *entpdl*<sup>-/-</sup> exposés à des concentrations élevées d'ATP (mM) sont plus susceptibles à la mort, relâchent plus d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 suite à l'activation des récepteurs TLR2 ou TLR4 et incorporent plus le fluorochrome Yo-Pro-1 (indiquant la formation d'un pore) que les macrophages *entpdl*<sup>+/+</sup>. Le point de contrôle de la relâche d'IL-1 $\beta$  associée au récepteur P2X<sub>7</sub> par la NTPDase1 se situe après la synthèse de la pro-IL-1, mais avant sa maturation par la caspase-1. En accord avec les données *in vitro*, la NTPDase1 affecte aussi la relâche d'IL-1 $\beta$  *in vivo* dans le modèle de la poche d'air. Les niveaux d'IL-1 $\beta$  mesurés dans les exsudats de poches injectées avec du LPS des souris *entpdl*<sup>-/-</sup> étaient significativement plus élevés que ceux des souris sauvages. Ces résultats suggèrent que la NTPDase1/CD39 joue un rôle clef dans les réponses dépendantes du récepteur P2X<sub>7</sub> et ainsi peut influencer l'inflammation.

## **NTPDase1 governs P2X<sub>7</sub>-dependent functions in murine macrophages.**

NTPDase1 regulates P2X<sub>7</sub> activation in macrophages

**Sébastien A. Lévesque<sup>§</sup>, Filip Kukulski<sup>§</sup>, Keiichi Enjyoji, Simon C. Robson<sup>†</sup> and Jean Sévigny<sup>§</sup>.**

<sup>§</sup> Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada.

<sup>†</sup> Transplant Institute, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

Address correspondence to:

Jean Sévigny  
Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie  
Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ)  
2705 Boulevard Laurier, local T1-49  
Québec (QC), Canada  
G1V 4G2  
Fax: (418) 654-2765  
e-mail: Jean.Sevigny@crchul.ulaval.ca

**Keywords:** ATP-induced death; CD39; IL-1 $\beta$ ; macrophage; NTPDase1; P2X<sub>7</sub> receptor



## 5.1 Abstract

P2X<sub>7</sub> receptor is an ATP-gated ion channel within the multiprotein inflammasome complex. Until now, little is known about regulation of P2X<sub>7</sub> effector functions in macrophages. Here, we show that NTPDase1/CD39 is the dominant ectonucleotidase expressed by murine peritoneal macrophages and that it regulates P2X<sub>7</sub>-dependent responses in these cells. Macrophages isolated from NTPDase1-null mice (*Entpd1*<sup>-/-</sup>) were devoid of all ADPase and most ATPase activities when compared to wild type macrophages (*Entpd1*<sup>+/+</sup>). *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages exposed to millimolar concentrations of ATP were more susceptible to cell death, released more IL-1 $\beta$  and IL-18 after TLR2 or TLR4 priming, and incorporated the fluorescent dye Yo-Pro-1 more efficiently (suggestive of increased pore formation) than *Entpd1*<sup>+/+</sup> cells. Consistent with these observations, NTPDase1 regulated P2X<sub>7</sub>-associated IL-1 $\beta$  release after synthesis, and this process occurred independently of, and prior to, cytokine maturation by caspase-1. NTPDase1 also inhibited IL-1 $\beta$  release in vivo in the air pouch inflammatory model. Exudates of LPS-injected *Entpd1*<sup>-/-</sup> mice had significantly higher IL-1 $\beta$  levels when compared to *Entpd1*<sup>+/+</sup> mice. Taken together, our studies suggest that NTPDase1/CD39 plays a key role in the control of P2X<sub>7</sub>-dependent macrophage responses.

## 5.2 Introduction

Monocytes/macrophages are myeloid inflammatory cells that play an important role in innate host defense and immune regulation [495]. For example, these cells represent the major source of IL-1 during inflammation, a cytokine playing a pivotal role in chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and neurodegenerative disorders [528, 532]. Monocytes/macrophages express functional receptors specific for extracellular nucleotides, which serve as “danger” signals and initiate the immune response [519]. At the mRNA level, primary monocytes express the ion-channel P2X<sub>1,4,5,7</sub> and the G-protein-coupled P2Y<sub>1,2,4,6,11-13</sub> receptors, and macrophages express the same receptor subtypes except P2Y<sub>13</sub> [50]. P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors have been detected in macrophages at the protein level [231-235].

P2X<sub>7</sub> receptor (formerly P2Z) plays a key role in inflammation [513, 584, 643-645]. This receptor activation by extracellular ATP, released in inflammatory conditions, is a co-stimulus that promotes a massive release of mature and bioactive cytokines of the IL-1 family, such as IL-1 $\beta$  and IL-18, from LPS-primed macrophages and other cell types [515, 516]. The activation of P2X<sub>7</sub> in leukocytes also induces cell death, intracellular pathogen clearance and membrane trafficking [511, 646, 647]. While nano to low micromolar nucleotide concentrations are sufficient for the activation of other P2 receptors, P2X<sub>7</sub> is activated by far higher concentrations of ATP (in the order of the millimolar [mM]) and/or by mono ADP-ribosylation [648].

The concentration of P2 receptors ligands (ATP, ADP, UTP and/or UDP) is regulated by ecto-nucleotidases, including members of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) and ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) families [12, 86, 310, 625]. NTPDase1 (or CD39) is expressed on endothelial cells, smooth muscle cells and the majority of leukocytes [369, 484, 485, 547-550, 552, 649, 650]. This enzyme efficiently hydrolyzes all tri- and diphosphonucleosides, such as ATP, UTP, ADP and UDP, and thus is expected to terminate P2 receptor activation.



Hitherto, the expression of NTPDase1 in macrophages has been suggested by immunohistochemistry on human skin resident macrophages [548] and mouse testis resident macrophages [553]. Here we show that NTPDase1 is the dominant ecto-nucleotidase responsible for the hydrolysis of ATP and ADP at the surface of mouse primary macrophages and that this enzyme plays a key role in modulating P2X<sub>7</sub>-associated functions in these cells.

## 5.3 Material and methods

### 5.3.1 Reagents:

The general inhibitor of caspases z-VAD(OMe)-fmk, the caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-AOM, and cycloheximide (CHX) were purchased from Calbiochem (Gibbstown, NJ, USA). Flagellin from *S. typhimurium*, Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, and poly I:C were obtained from Invivogen (San Diego, CA, USA). Actinomycin D, LPS from *Escherichia coli* O111:B4, nucleotides (ATP, ADP, AMP, UTP, UDP), oxidized ATP (oATP), potato apyrase grade VII were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). The P2X<sub>7</sub> antagonists A-438079 and KN-62 were provided by Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA), BBL thioglycollate medium by Fischer Scientific (Ottawa, ON, Canada), Reactive blue 2 (RB-2) by ICN Biochemicals (Aurora, OH, USA) and ultra pure LPS from *Escherichia coli* O55:B5 by List Biological Laboratories (Campbell, CA, USA). Yo-Pro-1 was acquired from Invitrogen (Burlington, ON, Canada).

### 5.3.2 Animals:

CD1 mice were purchased from Charles River (Pointe-Claire, QC, Canada). NTPDase1-deficient mice backcrossed 7 times to the C57BL/6 genetic background were previously reported [338]. Experimental procedures were done according to the Canadian Council on Animal Care policy and were approved by the *Université Laval* Animal Welfare Committee.

### 5.3.3 Isolation of Peritoneal Macrophages:

Peritoneal macrophages were obtained either from CD1 or C57BL/6 wild type (*Entpd1<sup>+/+</sup>*) or NTPDase1 knockout (*Entpd1<sup>-/-</sup>*) mice by a method similar to the one described by Zhang et al. [651]. Briefly, Macrophages were collected 4 days after i.p. injection of 1 mL of 3% sterile thioglycollate medium by a lavage of the peritoneal cavity with 8 mL of sterile PBS. The cells consisted of 70-85% macrophages, as confirmed with CD11b and F4/80 Ab, were washed twice with sterile PBS and resuspended in DMEM/F12 medium containing 1% FBS. To enrich this preparation in macrophages, the cells were transferred into 6 ( $2 \times 10^6$  cells/well), 24 ( $5 \times 10^5$ - $10^6$  cells/well) or 48 ( $2 \times 10^5$  cells/well) well-plates and allowed to attach for 2 hours. Unattached cells were wash out with DMEM/F12 containing 1% FBS. The attached cells, mainly peritoneal macrophages, were used for the experiments thereafter.

### 5.3.4 Isolation of BMM $\Phi$

Mice were anesthetized with Ketamine/Xylazine and sacrificed by cervical dislocation. Femur and tibia were isolated aseptically. Bone marrows were collected in 10% FBS-DMEM/F12 medium, disrupted, and cultured for 7-10 days in 10% FBS-DMES/F12 supplemented with 1 ng/ml of Mouse CSF (Peprotech) in bacterial petri-dish. Cells were harvested and replated in 12-well plates at  $0.5 \times 10^6$ /well in 10% FBS-DMEM/F12 medium [652].

### 5.3.5 Nucleotidase Activity Assays:

Enzymatic activity was evaluated by two methods, a Malachite green colorometric assay to quantify the release of inorganic phosphate ( $P_i$ ) according to Baykov et al. [594] and by analysis of the nucleotide products by HPLC. Activity was determined for  $10^6$  cells at 37°C in a 24 well-plate using 0.5 mL of incubation medium (5 mM  $CaCl_2$ , 145 mM NaCl, 80 mM Tris, pH 7.4). The reaction was initiated by the addition of 500  $\mu$ M ATP or ADP and stopped after 15 min by sampling an aliquot of 0.2 mL promptly mixed with 50  $\mu$ L of malachite reagent and  $P_i$  released was calculated as before ([86]; Chapitre 3). All



experiments were performed in triplicates. HPLC analysis was used to determine and quantify the nucleotide products of ATP hydrolysis. Two milliliter of DMEM medium without phenol red containing 2 mM ATP was added to macrophages at 37°C, aliquots of 200 µL were withdrawn from the wells at different time points, and transferred to 200 µL ice cold 1 M HClO<sub>4</sub>. Further sample preparation and nucleotide content quantification by HPLC were done as before [86].

### 5.3.6 RT and Quantitative PCR

Total RNA was isolated using Trizol method according to the manufacturer's recommendation (Invitrogen). RNA quantity and quality was assessed using an Agilent Technologies 2100 bioanalyzer and RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent, Mountain View, CA, USA). Primers were designed using Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) and their respective sequences are included in Supp. Table 1. For RT-PCR, cDNA was synthesized with Superscript III (Invitrogen) from 500 ng of total RNA with oligo (dT)<sub>18</sub> as the primer, according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen). For amplification, 1/20 of the reverse transcription (RT) reaction volume was used as a template in a final volume of 25 µL, containing 0.4 µM primer, 200 µM dNTP, and 1.5 unit of Taq DNA polymerase (New England Biolab, Ipswich, MA, USA). Amplification was started with 10 min at 94°C followed by 35 cycles of denaturation for 45 sec at 94°C, annealing for 45 sec at 55-61°C, as indicated in Table 2), and elongation for 45 sec at 74°C, and ended by 7 min incubation at 74°C. Glyceraldehyde dehydrogenase (GAPDH) amplification was used as a control of amplification.

For quantitative PCR (qPCR), cDNA was generated from 75 ng of total RNA using random nanomers as primers (Sigma-Aldrich) following the protocol for Superscript III (Invitrogen). Equal amounts of cDNA were run in triplicate and amplified in a final volume of 15 µl containing 7.5 µL of 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 nM of Z-tailed forward primer, 100 nM of reverse primer, 250 nM of Amplifluor Uniprimer probe (Chemicon, Temecula, CA, USA), and 80 ng of cDNA target. The mixture was incubated at 50°C for 2 min, at 95°C for 4 min, and then cycled 55 times at 95°C for 15 sec and at 55°C for 30 sec using the Applied Biosystems Prism 7900

Sequence Detector. For all genes quantified, no template controls were run, amplification efficiencies were validated and normalized to 18S ribosomal gene and quantity of target gene was calculated according to a standard curve. Primers were designed using Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) and their respective sequences are included in Table 15. Amplicons were detected using the Amplifluor UniPrimer system where forward primers contained a 5' Z sequence: ACTGAACCTGACCGTACA.

### **5.3.7 Western Blot**

Protein extracts of cells were prepared as previously described [86]. Mouse NTPDase1 was revealed with mN1-2<sub>C</sub> (2 hours, 1:1000; [553]), and C9F (2 hours, 1:1000) and IL-1 with 3ZD (1 hour, 1:1000), followed by 1 hour incubation with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit, Amersham Biosciences, Boston, MA; anti-guinea pig, GE Healthcare, QC, Canada; anti-mouse, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA). Bands were visualized using lightning western blot Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Boston, MA, USA).

### **5.3.8 Flow Cytometry**

The expression of selected surface proteins by peritoneal macrophages was evaluated by cytometry using the following Ab: a rat PE-conjugated anti-mouse CD11b (clone M1/70; BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada), a rat anti-mouse F4/80 (clone A3-1; AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), a rabbit polyclonal anti-mouse CD39 (C9F; [338]), a rabbit polyclonal anti-mouse NTPDase2 (mN2-36<sub>L</sub>; [653]) and a rabbit polyclonal anti-P2X<sub>7</sub> (APR-004; Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Briefly, the cells were incubated 30 min with the above primary antibodies diluted in PBS 1X, 1% FBS, 0.1% sodium azide (PFA), and, when necessary, with secondary FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies for 30 min (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), with a minimum of 2 washes with PFA after each incubation. Cell surface fluorescence was measured with EPICS XL flow cytometer (Beckman-Coulter, Mississauga, ON, Canada) and analysed with WinMDI 2.9 software (Scripps Research Institute, La Jolla CA, USA).



Table 15 : Primer pairs for PCR and products size

Gene	Forward primer	Reverse primer	Genbank	Length (bp)
<b>RT-</b>				
<i>P2rx1</i>	CAACTGTGTGCCCTTCAATG	GGTACCATTACCTCCTCCA	NM_008771	196
<i>P2rx2</i>	CAAGGCACCCCTCAAGTAGA	TCAGTCAGAGCAGAGCTGGA	NM_153400	193
<i>P2rx3</i>	ATTTCCTCAAAGGGGCTGAT	GTTCTGCAGCCCAAGGATAA	NM_145526	204
<i>P2rx4</i>	ATCCCTTCTGCCCCATATTC	TAGCCAGGAGACACGTTGTG	NM_011026	205
<i>P2rx5</i>	CTGTCACTTCAGCTCCACCA	TTTGTGTCCAGACGGTTGA	NM_033321	196
<i>P2rx6</i>	TCACCCGCTAACCCTGTTAC	TAGTCCCGCTGAAGCTTTGT	NM_011028	242
<i>P2rx7</i>	AATCGGTGTGTTTCCTTTGG	CCGGGTGACTTTGTTGTCT	NM_011027	165
<i>P2ry1</i>	TCGTGTCTCCATTCTGCTTG	CGACAGGGTTTATGCCACTT	NM_008772	218
<i>P2ry2</i>	TGACGACTCAAGACGGACAG	GTCCCTACAGCTCCCTAC	NM_008773	108
<i>P2ry4</i>	ACTGGCTTCTGCAAGTTCGT	AGGCAGCCAGCTACTACCAA	NM_020621	188
<i>P2ry6</i>	GGTAGCGCTGGAAGCTAATG	TTTCAAGCGACTGCTGCTAA	NM_183168	308
<i>P2ry12</i>	GGCAGCCTTGAGTGTCTTC	ATAACGTGCTACCCGACCTG	NM_027571	130
<i>P2ry13</i>	ATAGAGAACCGGGAACAGCA	CAAAACAAAGCTGATGCTCG	NM_028808	115
<i>P2ry14</i>	TTTTGTGCTGCTTTGTGC	GCAGCCGAGAGTAGCAGAGT	NM_133200	135
<i>Entpd1</i>	AGCTGCCCTTATGGAAGAT	TCAGTCCCACAGCAATCAAA	NM_009848	123
<i>Entpd2</i>	TTCCTGGGATGTCAGGTCTC	GTCTCTGGTGCTTGCCTTTC	NM_009849	132
<i>Entpd3</i>	ACCTGTCCCGTGCTTAAATG	AGACAGAGTGAAGCCCCTGA	NM_178676	183
<i>Entpd8</i>	CACACAGGACCTTCTGAGCA	AGCCTTCTGAGGTGGCACTA	NM_028093	212
<i>Nt5e</i>	CAGGAAATCCACCTTCCAAA	AACCTTCAGGTAGCCCAGGT	NM_011851	128
<i>Gapdh</i>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA	NM_008084	223
<b>qPCR</b>				
<i>P2rx7</i>	Z-tail-CCTACATTAGCTTTGCTTTGGTGA	GCTCTTTCCGCTGGTACAGC	NM_011027	52
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	Z-tail-AAATGCCACCTTTTGACAGTGAT	CGTCAACTTCAAAGAACAGGT CAT	NM_008361	50
<i>18S</i>	Z-tail-TGCATGTCTAAGTACGCACGG	AATGAGCCATTTCGAGTTTCA	X56974	50

The Z-tail for qPCR is ACTGAACCTGACCGTACA. It was excluded from the qPCR product length presented in base pair (bp).

### 5.3.9 ATP-induced Cell Death Assays

The cell death of peritoneal cells treated with nucleotides was determined based on two techniques: trypan blue (0.2%) incorporation and LDH release. In both assays, the cells were incubated with 2 mM nucleotides (ATP, ADP, AMP, UTP and UTP) with or without apyrase, or P2X<sub>7</sub> antagonists, for various times up to 12 hours at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator. For the trypan blue incorporation assay, medium was removed after stimulation and cells were incubated with trypan blue for 5 min, then washed twice with PBS and analyzed with a microscope. The lactate dehydrogenase (LDH) activity released in the supernatants of the treated peritoneal cells was compared with the total activity in cells lysed with 2% Triton X-100 using the “Cytotoxicity Detection Kit (LDH)” following the manufacturer’s recommendations (Roche Diagnosis, Indianapolis, IN, USA).

### 5.3.10 IL-1 $\beta$ and IL-18 ELISA

Peritoneal macrophages were primed 3 hours with the following TLR ligands: LPS 10 ng/mL (TLR4), Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> 100 ng/mL (TLR1/2), or flagellin 1  $\mu$ g/mL (TLR5). After washes with PBS, these macrophages were stimulated with various nucleotides, at concentrations ranging from 0.1 to 5.0 mM for 30 min, in order to induce the maturation/release of pro-IL-1 cytokines, produced upon stimulation with TLR ligands. In some of these experiments, various inhibitors and P2X<sub>7</sub> antagonists were added to macrophages 15 min before the addition of TLR ligands or ATP. The mature form of IL-1 $\beta$  and IL-18 released from macrophages was quantified by sandwich ELISA following manufacturers’ protocols (eBioscience (San Diego, CA, USA) and Bender Medsystems Inc. (Burlingame, CA, USA), respectively). In figure 4a, IL-1 $\beta$  was measured using ELISA kit from Thermo Scientific (Nepean, ON, Canada).

BMM $\Phi$  were primed with LPS (Sigma 0111:B4) at 300 ng/ml for 24 hours in 10% FBS-DMEM/F12. After washing with serum free DMEM/F12, cells were treated for 30 min with 0.5 or 1.0 mM ATP. The supernatant was then harvested and kept at -80°C until used. IL-1 $\beta$  was measured using Quantikine ELISA kit as recommended by the manufacturer, R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA).



### 5.3.11 Air Pouch Model

Air pouches were formed on the dorsum of 10 to 12 week-old C57BL/6 wild type or *Entpd1*<sup>-/-</sup> mice by s.c. injection of 4 mL sterile air on day 0, and 3 mL on day 4, as described [489]. On day 7, 0.1 µg LPS diluted in 1 mL PBS was injected into the pouches and mice were euthanized 1, 4, 8 or 12 hours later by CO<sub>2</sub> asphyxiation. The inflammatory exudates with the accumulated cells were collected from the air pouches with a 2 mL wash (PBS-5 mM EDTA) and centrifuged (500 g, 10 min, 4°C). The cells present in the pellet were resuspended in PBS and counted manually with a hemacytometer. Leukocyte subpopulations were distinguished by Diff Quick staining of cytopspins and/or by flow cytometry. The supernatants were analyzed for the level of IL-1β by ELISA, as described above.

### 5.3.12 Statistical Analysis

Student's t-test and two-way ANOVA analysis with Bonferonni post hoc test were performed using Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). For Yo-Pro-1 incorporation, statistical analysis was performed using SAS 9.2 statistical software (SAS Institute Inc., NC, USA). Briefly, the increase of fluorescence intensity over time for *Entpd1*<sup>-/-</sup> and *Entpd1*<sup>+/+</sup> macrophages was compared for each treatment. A linear model with a common slope and additional individual slopes (deviations from the common slope) was adjusted and a global test F performed on the slope coefficients indicated if the common slope was significantly different from zero and if there was a significant difference between individual slopes. Since both test were positives ( $p < 0.0001$ ), we proceeded to t tests and to pairwise comparisons of these individual slope coefficients.

## 5.4 Results

### 5.4.1 NTPDase1 (CD39) is the dominant ecto-nucleotidase on peritoneal macrophages

Previous studies indicated that peritoneal macrophages hydrolyze extracellular ATP [539, 541], suggesting the presence of ecto-nucleotidases at their surface. We first sought to identify the ecto-enzyme(s) responsible for this activity. RT-PCR of mouse peritoneal macrophage mRNA noted the presence of NTPDase1 and NTPDase2, but not of NTPDase3, NTPDase8 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Table 16). However only NTPDase1/CD39, but not NTPDase2, was detected in peritoneal macrophages at the protein level by western blot (Fig. 22A) and flow cytometry (Fig. 22B; not shown for NTPDase2). NTPDase1 protein was also found in mouse bone marrow-derived macrophages (BMM $\Phi$ ) by western blot (data not shown). The latter cells were used in a few experiments to extend the results obtained with elicited peritoneal macrophages to another type of macrophages.

Next, we compared the differential capacity of *Entpd1*<sup>+/+</sup> and *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages to hydrolyse extracellular ATP and ADP. *Entpd1*<sup>+/+</sup> cells hydrolysed these nucleotides with specific activities of  $61 \pm 9$  and  $35 \pm 2$  nmol Pi  $\times$  min<sup>-1</sup> per 10<sup>6</sup> cells, respectively. In comparison *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages had about one tenth of the ATPase activity of *Entpd1*<sup>+/+</sup> cells and undetectable ADPase activity (Fig. 22C). The activity at the surface of 10<sup>6</sup> *Entpd1*<sup>+/+</sup> macrophages converted about 50% of 2 mM ATP to AMP with a minimal generation of ADP in 60 min, while 10<sup>6</sup> *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages needed around 12 hours to hydrolyse the same amount of ATP (Fig. 22D). Noteworthy, *Entpd1*<sup>-/-</sup> cells hydrolyzed ATP with accumulations of ADP which could be due to a modest NTPDase2 expression. This weak activity was masked by the highly expressed NTPDase1 in wild type cells. Neither *Entpd1*<sup>+/+</sup> nor *Entpd1*<sup>-/-</sup> thioglycollate-elicited peritoneal macrophages hydrolysed AMP (Fig. 22D and data not shown) that concurs with the lack of ecto-5'-nucleotidase expression (Table 16). In comparison with elicited macrophages, resident peritoneal macrophages had similar ATPase and ADPase activities, but had ability to hydrolyze AMP



(data not shown). Altogether, these results show that NTPDase1 is the major ectonucleotidase in mouse peritoneal macrophages.

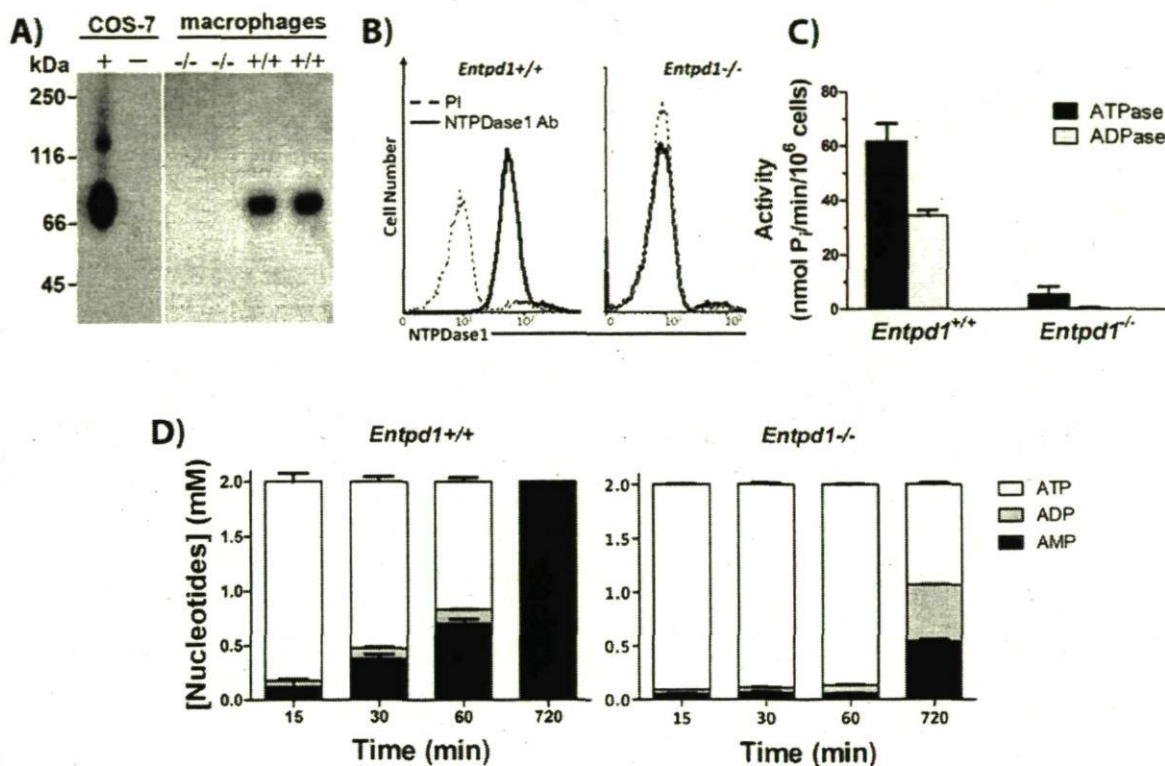


Figure 22 : NTPDase1 is the major ecto-nucleotidase on mouse peritoneal macrophages elicited with thioglycollate.

A) Western blot with rabbit polyclonal Ab against mouse NTPDase1 (mN1-2<sub>c</sub>). Left gel shows control proteins (0.5  $\mu$ g) from lysates of COS-7 cells transfected with mouse NTPDase1 (+) or untransfected (-). Right gel shows a representative western blot (out of three performed with cells from individual mice) of proteins (12.5  $\mu$ g) from peritoneal macrophage lysates.

B) Flow cytometric analysis of NTPDase 1 analysis using non permeabilizing conditions with a polyclonal Ab against CD39 (C9F, —), compared to its pre-immune serum (PI, ---). Data are representative of three independent experiments with pooled macrophages from 2 to 4 mice per experiment. C) NTPDase1 activity with either ATP or ADP as substrate, *Entpd1*<sup>+/+</sup> (filled bars) and *Entpd1*<sup>-/-</sup> (grey bars) macrophages. Data show mean + SEM (n=3). \*\*\*p<0.001, two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test. D) Time course of the hydrolysis of 2 mM ATP by *Entpd1*<sup>+/+</sup> or *Entpd1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages was followed for 12 hours by HPLC: ATP ( $\square$ ), ADP ( $\blacksquare$ ), AMP ( $\blacksquare$ ). No adenosine production was detected. Data show mean + SEM of three independent experiments.

Table 16 : Expression of P2 receptors and ecto-nucleotidases as determined by RT-PCR

Gene	<i>Entpd1</i> <sup>+/+</sup>	<i>Entpd1</i> <sup>-/-</sup>
<i>P2rx1</i>	—	—
<i>P2rx2</i>	—	—
<i>P2rx3</i>	—	—
<i>P2rx4</i>	+	+
<i>P2rx5</i>	—	—
<i>P2rx6</i>	+/-	+/-
<i>P2rx7</i>	+	+
<i>P2ry1</i>	+	+
<i>P2ry2</i>	+	+
<i>P2ry4</i>	—	—
<i>P2ry6</i>	+	+
<i>P2ry12</i>	+/-	+/-
<i>P2ry13</i>	—	—
<i>P2ry14</i>	+	+
<i>Entpd1</i>	+	—
<i>Entpd2</i>	+/-	+/-
<i>Entpd3</i>	—	—
<i>Entpd8</i>	—	—
<i>Nt5e</i>	—	—

The same pattern of expression was observed in all experiment (n ≥ 3).

+ : strong expression

+/- : barely detectable

- : no signal detected



### 5.4.2 Regulation of P2X<sub>7</sub> functions by NTPDase1 (CD39)

In order to assess whether NTPDase1 can regulate P2X<sub>7</sub>-associated functions, we first verified whether *Entpd1*<sup>+/+</sup> and *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages have similar expression level of this receptor. As shown in Fig. 2, *Entpd1*<sup>+/+</sup> and *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages did not significantly differ in the expression of P2X<sub>7</sub> receptor at both mRNA and protein levels. Moreover, these cells have similar expression of other P2 receptors (Table 16).

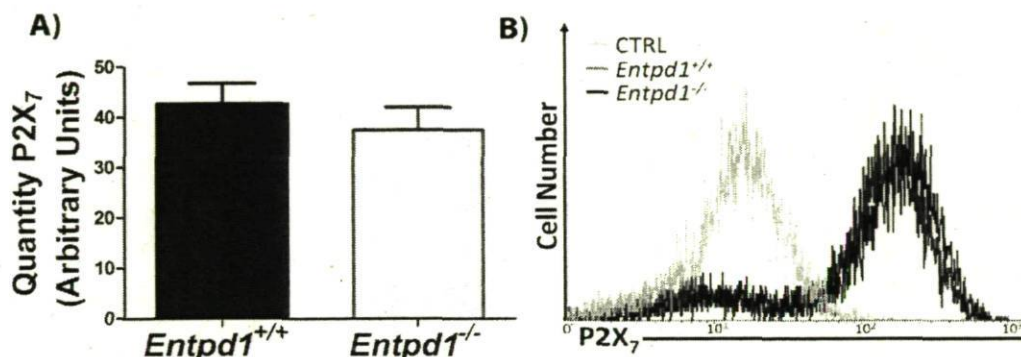


Figure 23 : NTPDase1 deficiency does not impact P2X<sub>7</sub> receptor expression by peritoneal macrophages.

A) P2X<sub>7</sub> mRNA expression was quantified by qPCR. Data show mean + SEM for qPCR experiments performed in duplicate with RNA purified from macrophages obtained from 8 to 10 individual mice done separately. There were no significant differences in the expression of P2X<sub>7</sub> mRNA between *Entpd1*<sup>+/+</sup> and *Entpd1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages (Student's *t*-test).

B) Flow cytometric analysis of surface P2X<sub>7</sub> expression in *Entpd1*<sup>+/+</sup> and *Entpd1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages. Data are representative of three independent experiments with pooled macrophages from 2 to 4 mice per experiment.

#### 5.4.2.1 NTPDase1 deficient peritoneal macrophages are more susceptible to ATP-induced death

One function attributed to P2X<sub>7</sub> receptor activation is cellular death [646, 654]. To induce this response, we incubated macrophages with 2 mM ATP for 12 hours and measured either trypan blue incorporation or LDH release, as death indicators. This treatment killed 83 ± 4% of *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages as compared to 13 ± 4% of *Entpd1*<sup>+/+</sup> macrophages (Fig. 24) as measured by trypan blue incorporation. Similar data were obtained for LDH release (measured 3 hours after ATP addition; data not shown). Noteworthy, 4 mM ATP

killed *Entpd1*<sup>+/+</sup> (either from C57BL/6 or CD-1 strains) and *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages at a similar rate (data not shown). Adenosine (0.1-2.0 mM) had no effect on macrophage viability (data not shown). In keeping with the role of NTPDase1 in ATP-induced death, exogenous NTPDase1 activity (potato apyrase, 2U/well; Fig. 24) prevented death in both null and wild type macrophages. In agreement with a role of P2X<sub>7</sub> in ATP-induced macrophage death, P2X<sub>7</sub> antagonists (KN-62, RB-2 and oATP) prevented this effect, and cell viability was unaffected by nucleotides other than ATP (Fig. 24). Taken together, these results suggest that the increased macrophage susceptibility to ATP-induced death in absence of NTPDase1 is due to the loss of P2X<sub>7</sub> receptor regulation.

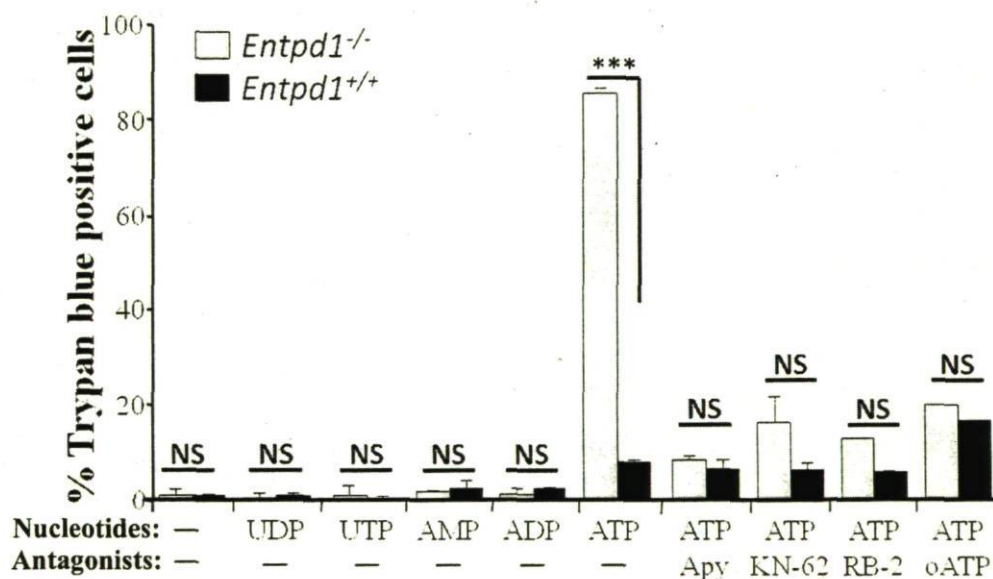


Figure 24 : *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages are highly susceptible to ATP-induced death.

Peritoneal macrophages were treated 12 hours with 2 mM of the indicated nucleotides in the presence or absence of potato apyrase (Apy; 2 U) or with and without P2X<sub>7</sub> receptor antagonists (3 μM KN-62, 100 μM RB-2, 600 μM oATP). Cells positive for trypan blue incorporation were counted in a minimum of two random fields each containing over 150 cells. Data show mean + SEM of three or more experiments for each condition tested. \*\*\**p*<0.001, two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test; NS (no significant differences), *p*>0.05.



#### 5.4.2.2 NTPDase1 regulates P2X<sub>7</sub>-induced IL-1 $\beta$ and IL-18 secretion

We next tested whether NTPDase1 could also regulate earlier P2X<sub>7</sub>-activated macrophage responses such as IL-1 $\beta$  and IL-18 release, and pore formation.

*NTPDase1 controls IL-1 $\beta$  and IL-18 release by macrophages in vitro:* Macrophages accumulate pro-IL-1 $\beta$  in their cytosol following activation of MAPK and NF- $\kappa$ B [528, 532, 655] due to, for example, Toll-like receptor (TLR)-4-activation by LPS. ATP alone is a poor trigger of the synthesis of these cytokines (Figure 25A; [516, 528]), but it is necessary for their maturation and release from macrophages and other cell types [515, 516, 528, 656].

*Entpd1<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages primed for 3 hours with LPS and then stimulated for 60-min with 2 mM ATP released significantly more IL-1 $\beta$  than their wild type counterparts (Fig. 25A). Congruent with the role of P2X<sub>7</sub>, nucleotides that are not P2X<sub>7</sub> ligands, e.g. ADP, AMP, UTP and UDP, did not induce IL-1 $\beta$  release from LPS-primed macrophages (Fig. 25A and data not shown). In addition, apyrase and various P2X<sub>7</sub> antagonists (RB-2, A438079, and KN-62) abrogated IL-1 $\beta$  secretion by cells of both genotypes (Figure 25A). Thus, P2X<sub>7</sub> activation induced IL-1 $\beta$  release by peritoneal macrophages, which is controlled by the ectonucleotidase NTPDase1. Noteworthy, as for cell death, at concentration of ATP > 3 mM *Entpd1<sup>+/+</sup>* and *Entpd1<sup>-/-</sup>* macrophages acted similarly and secreted comparable amounts of IL-1 $\beta$  ( $p > 0.05$ ; Fig. 25B).*

Next, we investigated whether NTPDase1 controls IL-1 $\beta$  at the level of biosynthesis, maturation, or release. To limit the effect of ATP-induced death in these assays, IL-1 $\beta$  was measured after 30 min (instead of 60 min in Figure 25B, D-F) already sufficient for a maximal release of this cytokine (data not shown). Firstly, the differences in IL-1 $\beta$  release between *Entpd1<sup>+/+</sup>* and *Entpd1<sup>-/-</sup>* cells were not due to increased IL-1 $\beta$  transcription in *Entpd1<sup>-/-</sup>* macrophages. Low basal levels of IL-1 $\beta$  mRNA were detected in both naive *Entpd1<sup>+/+</sup>* and *Entpd1<sup>-/-</sup>* macrophages, and were increased to a similar extent by LPS (~20 fold; Figure 25C). Comparable results were obtained for the pro-IL-1 $\beta$  protein expression assessed by western blot ( $n=1$ , data not shown). Furthermore, when inhibitors of

transcription (actinomycin D) and of translation (cycloheximide) were added to peritoneal macrophages before LPS pre-stimulation, these near abolished IL-1 $\beta$  release (Figure 25D). In contrast, these inhibitors had no significant effect when added after LPS priming, at 15 min before the addition of ATP (Figure 25D). Taken together, these data suggest that NTPDase1 control of ATP-induced IL-1 $\beta$  release occurs at a level prior to biosynthesis of pro-IL-1 $\beta$  by peritoneal macrophages. Noteworthy, IL-1 $\beta$  release was also measured 60 min after the addition of ATP in at least one experiment for all conditions presented in figure 25, and data similar to 30 min incubation were obtained (data not shown). The difference in IL-1 $\beta$  release between *Entpd1*<sup>-/-</sup> and *Entpd1*<sup>+/+</sup> peritoneal macrophages was more substantive at 1 mM than at 2 mM ATP (Figure 25B), further supporting the fact that higher IL-1 $\beta$  release in *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages was not due to cell death. Indeed, although some trypan blue positive cells could be observed in some experiments as early as 1 hour after the addition of 2 mM ATP, this observation was never seen with 1 mM ATP.

Finally, a general caspase inhibitor z-VAD, or the caspase-1 specific inhibitor YVAD, decreased the release of IL-1 $\beta$  by LPS-primed peritoneal macrophages when stimulated with ATP (Fig. 25D). In addition, nigericin, a drug that stimulates IL-1 $\beta$  release independently of P2X<sub>7</sub> activation, induced the secretion of comparable amounts of IL-1 $\beta$  in cells from both genotypes (Fig. 25D). These data suggest that NTPDase1 controls IL-1 $\beta$  release by specifically modulating P2X<sub>7</sub>-induced maturation/release of IL-1 $\beta$  by caspase-1.

As for IL-1 $\beta$ , IL-18 release was also heightened in *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages compared to *Entpd1*<sup>+/+</sup> cells after ATP treatment, and equivalent after nigericin treatment (Fig. 26). Also similarly to IL-1 $\beta$ , the release of IL-18 was efficiently blocked by apyrase, P2X<sub>7</sub> antagonists (KN-62, A438079) and caspases inhibitors (zVAD, YVAD; Fig. 26 and data not shown). Note however that the level of IL-18 production by elicited peritoneal macrophages was low compared to IL-1 $\beta$  (25-150 pg (Fig. 26) vs 2 ng (Fig. 25)).



*NTPDase1 modulates IL-1 $\beta$  secretion also in TLR-2 primed macrophages:* To determine whether TLR agonists other than LPS, the TLR4 agonist, stimulate the production of pro-IL-1 $\beta$  in peritoneal cells, and to examine whether NTPDase1 also plays a role in this process, we pre-stimulated these cells for 3 hours with the agonists of TLR expressed by macrophages, namely TLR2 (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>), TLR5 (flagellin) and TLR3 (poly I:C) [504], and then added 1 mM ATP for 30 min (Figure 25E). Only *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages pre-stimulated with TLR2 and TLR4 agonists, but not with TLR3 and TLR5 agonists, released significantly more IL-1 $\beta$  than *Entpd1*<sup>+/+</sup> cells ( $p < 0.001$ ; Figure 25E).

*NTPDase1 modulates IL-1 $\beta$  secretion by BMM $\Phi$ :* We verified whether the increased IL-1 $\beta$  release from *Entpd1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages could be extrapolated to another source of macrophages. Figure 25F shows that *Entpd1*<sup>-/-</sup> BMM $\Phi$  released more IL-1 $\beta$  than *Entpd1*<sup>+/+</sup> cells due to either 0.5 mM or 1.0 mM ATP.

*Enhanced levels of IL-1 $\beta$  in Entpd1<sup>-/-</sup> mice in vivo:* Next, we investigated whether NTPDase1 regulates IL-1 $\beta$  production in vivo using LPS-treated mouse air-pouches. LPS was chosen as an inflammatory inducer as it stimulates ATP release from monocytes, peritoneal macrophages as well as from other cells [489, 515, 657, 658], and because LPS-primed cells can release IL-1 $\beta$  upon ATP stimulation (Figure 25). LPS injection in the air pouches resulted in a robust migration of leukocytes peaking at 4 hours post injection that was comparable in *Entpd1*<sup>+/+</sup> and *Entpd1*<sup>-/-</sup> mice (data not shown). However, *Entpd1*<sup>-/-</sup> mice produced significantly more IL-1 $\beta$  at this time point when compared to wild type mice (Figure 27). Thus, NTPDase1 also controls IL-1 $\beta$  production in vivo.

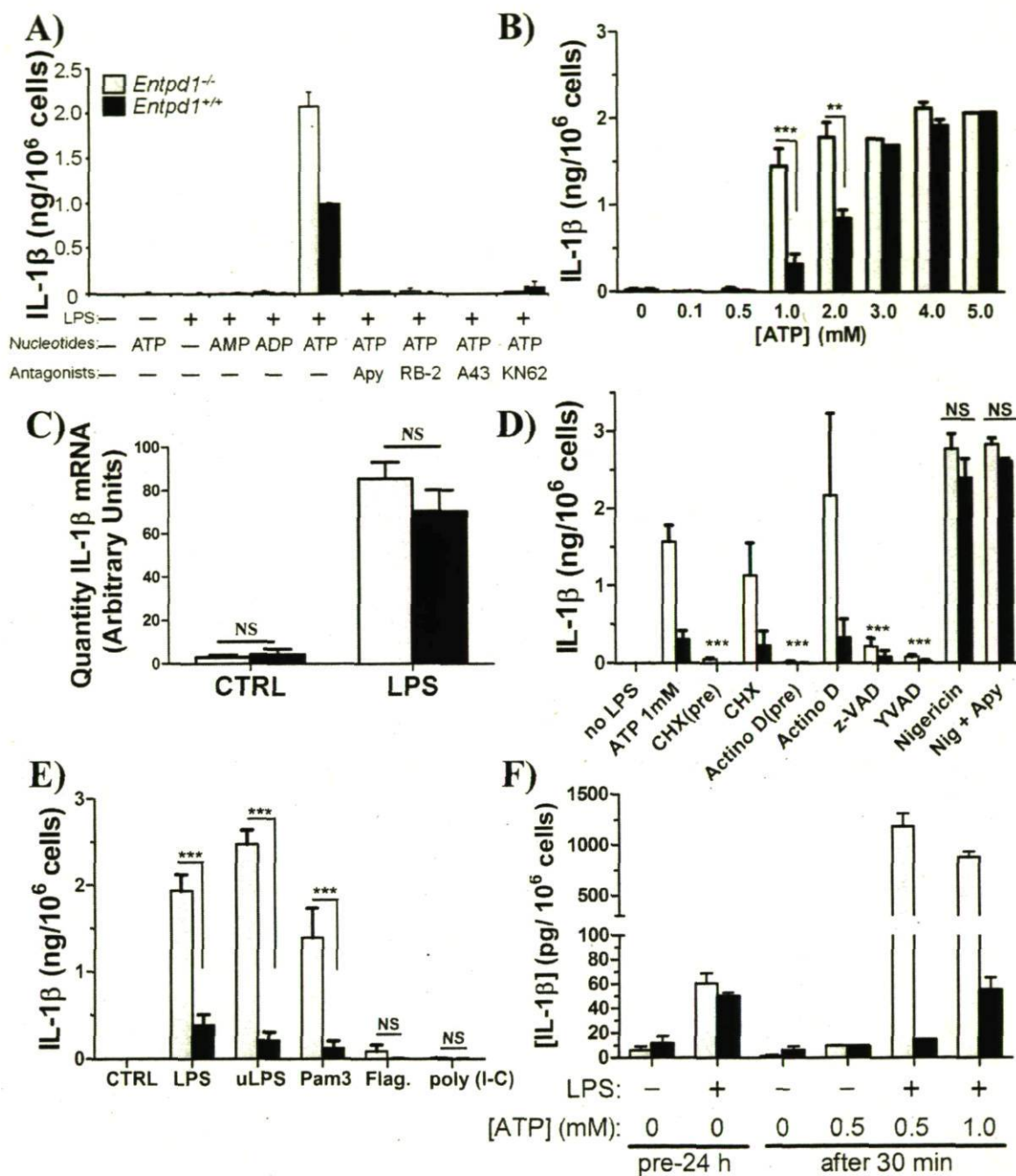


Figure 25 : NTPDase1 modulates P2X<sub>7</sub>-dependant IL-1β release from macrophages.

Macrophages (peritoneal or BMMΦ) were primed with LPS (or other TLR ligands as indicated), washed, and the medium was replaced with fresh medium containing ATP (0.1 to 5 mM) or nigericin (5 μM). Supernatants were analyzed for IL-1β concentration by ELISA. (*suite de la description à la page suivante*)



A) IL-1 $\beta$  released by LPS-primed peritoneal macrophages 60 min after treatment with 2 mM ATP in the presence or absence of apyrase (Apy; 2 U) or P2X<sub>7</sub> antagonists (100  $\mu$ M RB-2, 25  $\mu$ M A438079 or 3  $\mu$ M KN-62). Data show mean + SD of one representative experiment performed in duplicate and are representative of at least three independent experiments. Data show mean + SD of one representative experiment performed out of at least three independent experiments. In the presence of 2 mM ATP IL-1 $\beta$  levels ranged from 1.7 to 2.3 ng/10<sup>6</sup> cells and 0.8 to 1.1 ng/10<sup>6</sup> cells for *Entpd1*<sup>-/-</sup> (gray bars) and *Entpd1*<sup>+/+</sup> (filled bars) macrophages, respectively.

B) IL-1 $\beta$  released by LPS-primed peritoneal macrophages 30 min after ATP treatment (0.1 to 4.0 mM). Data show mean + SEM of  $n \geq 3$  independent experiments. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.

C) IL-1 $\beta$  mRNA in *Entpd1*<sup>-/-</sup> and *Entpd1*<sup>+/+</sup> peritoneal macrophages primed for 3 hours with LPS (10 ng/mL) or not (CTRL) was measured by qPCR. Data show mean + SEM of RNA purified from macrophages obtained from 9 (*Entpd1*<sup>-/-</sup>) and 8 (*Entpd1*<sup>+/+</sup>) mice, respectively. NS (no significant differences),  $p > 0.05$ .

D) IL-1 $\beta$  released by LPS-primed peritoneal macrophages 30 min after 1 mM ATP or nigericin treatment was measured. The inhibitors of transcription (8  $\mu$ M Actinomycin D), protein synthesis (10  $\mu$ g/mL cycloheximide [CHX]), caspases (20  $\mu$ M z-VAD), or caspase-1 (20  $\mu$ M YVAD), were added either 15 min before LPS pre-stimulation/priming (pre) and removed before ATP stimulation, or 15 min prior to the addition of ATP when LPS was not yet removed from the media. Data show mean + SEM of  $n \geq 3$  experiments. After the indicated treatment, significantly less IL-1 $\beta$  was measured when compared to ATP 1mM (\*\* $p < 0.001$ ) for both *Entpd1*<sup>-/-</sup> (gray bars) and *Entpd1*<sup>+/+</sup> (filled bars). There were no significant differences between *Entpd1*<sup>-/-</sup> and *Entpd1*<sup>+/+</sup> macrophages for both nigericin (Nig) and Nig + Apy (NS,  $p > 0.05$ ), two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.

E) ATP-induced IL-1 $\beta$  release by peritoneal macrophages primed with various TLR ligands. Cells were pre-stimulated with an agonist to either TLR4 (10 ng/mL LPS, or ultra pure LPS (uLPS); positive controls), TLR2 (100 ng/mL Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> [Pam<sub>3</sub>]), TLR5 (1  $\mu$ g/mL flagellin, "Flag") or TLR3 (1  $\mu$ g/mL poly I:C) and then further stimulated for 30 min with 1 mM ATP. IL-1 $\beta$  released by these cells was quantified by ELISA. Data show mean + SEM of 3 to 8 independent experiments. \*\* $p < 0.001$ , two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.

F) IL-1 $\beta$  released by BMM $\Phi$  primed for 24 hours with LPS (+) or DMEM (-) and then stimulated 30 min with or without ATP (0, 0.5 or 1.0 mM), was measured. Data show mean + SEM of one experiment performed in triplicate.

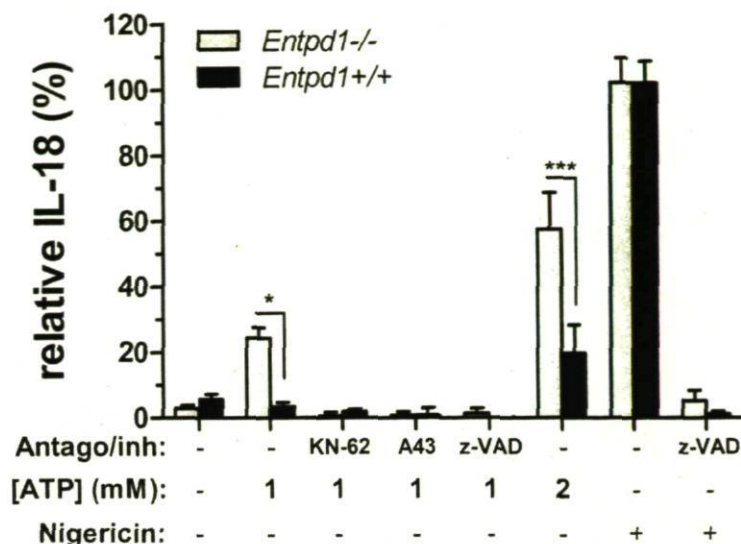


Figure 26 NTPDase1 modulates P2X<sub>7</sub>-dependent IL-18 release from peritoneal macrophages.

Macrophages were primed with LPS (10 ng/mL) for 3 hours and then treated for 30 min with either 1 or 2 mM ATP in the presence or absence of P2X<sub>7</sub> antagonists (25 μM A438079 or 3 μM KN-62). The supernatants were analyzed for IL-18 by ELISA. Data show mean + SEM of n = 3-4 experiments. IL-18 release was normalized with nigericin as a stimulus; 100% release varied from 15 to 150 pg/10<sup>6</sup> cells depending on the experiment. \**p*<0.05, \*\*\**p*<0.001, two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.

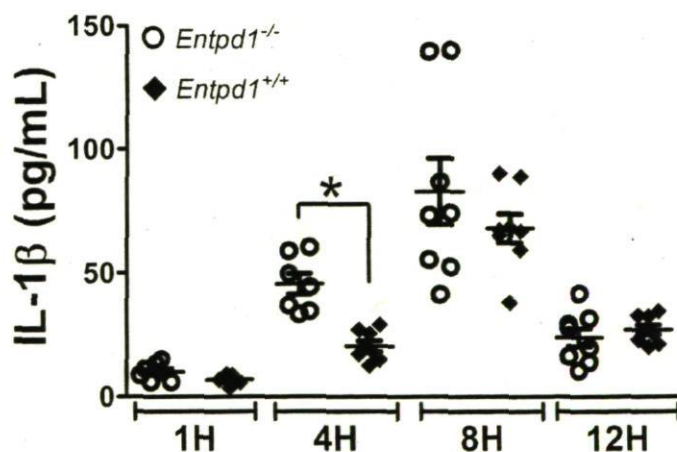


Figure 27 NTPDase1 deficiency increases IL-1β production in inflammatory air pouches.

Air pouches were raised on the back of female *Entpd1*<sup>+/+</sup> and *Entpd1*<sup>-/-</sup> C57BL/6 mice. At the indicated time in hours (H) post s.c. injection of LPS in the pouches, inflammatory exudates were collected and analyzed for IL-1β level by ELISA. Data show mean ± SEM of n = 7-8 mice per group. \**p*<0.05, one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test.



#### 5.4.3.3 *Entpd1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages exhibit increased pore formation.

ATP, via P2X<sub>7</sub> activation, induces a pannexin-1 (panx-1)-dependent pore formation that can be detected by measuring uptake of fluorescent dyes, such as Yo-Pro-1 [197, 199]. This effect takes place a few minutes after ATP addition to the cells, well before IL-1 $\beta$  release. Here, we investigated whether NTPDase1 regulates Yo-Pro-1 uptake in macrophages stimulated with or without ATP (0.1 to 4.0 mM). A linear model with a common slope and 12 additional individual slopes (deviations from the common slope) was adjusted for each ATP concentration. Pairwise comparisons of individual slope coefficients showed significantly higher intensity increase for *Entpd1*<sup>-/-</sup> compared to *Entpd1*<sup>+/+</sup> macrophages for all ATP concentrations tested ( $p \leq 0.002$ ). When we evaluated Yo-Pro-1 uptake compared to the absence of ATP, slope coefficients were significantly different only at concentration of 2 and 4 mM ( $p < 0.0001$ ; Figure 28A and data not shown). Yo-Pro-1 intensities were not significantly different from baseline at either 0.1, 0.5 or 1.0 mM ATP ( $p > 0.05$ ; not shown).

Moreover, the addition of KN-62 and apyrase decreased Yo-Pro-1 incorporation in cells of both genotypes (Figure 28B). A linear model with a common slope and six additional individual slopes (deviations from the common slope) was adjusted for each treatment (ATP 2 mM; ATP+KN-62 and ATP+Apy) for *Entpd1*<sup>-/-</sup> and *Entpd1*<sup>+/+</sup> macrophages. Pairwise comparisons of individual slope coefficients showed significantly lower fluorescence intensity increase for both ATP+KN-62 and ATP+Apy when compared to ATP 2 mM for *Entpd1*<sup>-/-</sup> and *Entpd1*<sup>+/+</sup> macrophages ( $p < 0.0001$ ). These data demonstrate that NTPDase1 modulates P2X<sub>7</sub>-dependent pore formation in murine macrophages.

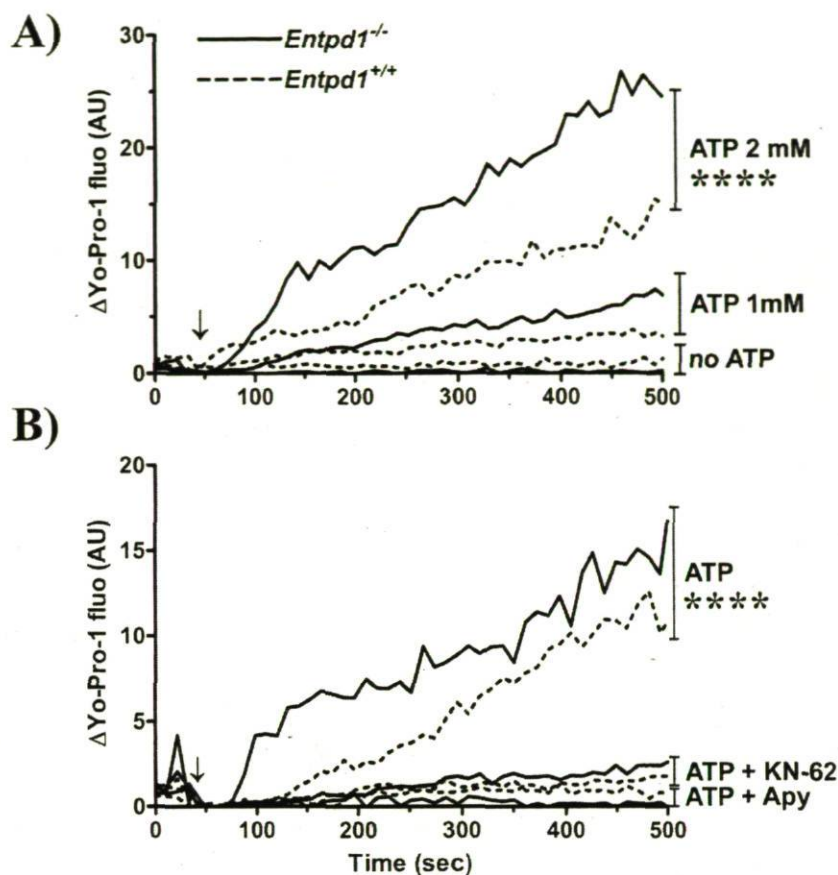


Figure 28 : NTPDase1 deficiency increases P2X<sub>7</sub>-associated Yo-Pro-1 uptake by macrophages.

A) ATP dose-dependent Yo-Pro-1 uptake by peritoneal macrophages (*Entpd1*<sup>-/-</sup> [—], *Entpd1*<sup>+/+</sup> [----]) was evaluated by measuring differences in Yo-Pro-1 mean fluorescence intensity ( $\Delta$ Yo-Pro-1 MFI) using flow cytometry. Cells were incubated with or without ATP (0, 1.0 and 2.0 mM) for the indicated time period. Data show  $\Delta$ Yo-Pro-1 expressed in arbitrary units (AU) for 275-550 cells per 11 seconds. A representative experiment out of 3 is shown. The time point corresponding to ATP addition to the cells (60 sec) is indicated on the graphs by an arrow ( $\downarrow$ ). Note that statistical analyses were carried out on complete data ( $n = 15-30$  cells per 0.6 sec). Pairwise comparison of individual slope indicate significantly higher intensity growth for *Entpd1*<sup>-/-</sup> when compared to *Entpd1*<sup>+/+</sup> macrophages ( $p \leq 0.002$ ), but slope were significantly different from the baseline slope only when indicated (\*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

B) Effect of KN-62 and apyrase (Apy) on ATP-induced Yo-Pro-1 uptake by peritoneal macrophages (*Entpd1*<sup>-/-</sup> [—], *Entpd1*<sup>+/+</sup> [----]). The cells were stimulated with 2 mM ATP alone or in combination with KN-62 (3  $\mu$ M) or Apy (2U) for the indicated period of time. Yo-Pro-1 incorporation measurement and statistical analysis were done as above. Pairwise comparison of individual slope indicate significantly higher intensity growth compared to KN-62 and Apy treatment (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) for both genotype.



## 5.5. Discussion

### 5.5.1 NTPDase1 is the dominant ecto-nucleotidase on macrophages

We have demonstrated that resident and thioglycollate-elicited peritoneal macrophages, as well as BMM $\Phi$ , express the ectonucleotidase NTPDase1. Moreover, *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages were almost completely devoid of ATPase and ADPase activities. These results are in agreement with previous works reporting the presence of an ecto-ATPase activity on macrophages [539-541] and immunoreactivity with NTPDase1/CD39 antibodies in resident macrophages of skin and testis [548, 553]. Macrophages may also express low levels of NTPDase2 as a faint mRNA signal was detected by RT-PCR (Table 16). This would also explain the hydrolysis, albeit minor, of ATP to ADP seen in figure 1D. Finally, thioglycollate-elicited peritoneal macrophages do not express ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Table 16) and lack AMPase activity (data not shown). These data are in agreement with the important decrease in ecto-5'-nucleotidase activity reported in elicited or activated peritoneal macrophages when compared to resident macrophages [543].

### 5.5.2 NTPDase1 regulates P2X<sub>7</sub> receptor functions

*NTPDase1 influences ATP-induced cell death:* In this study, we show that NTPDase1 protects peritoneal macrophages from ATP-induced death via the suppression of P2X<sub>7</sub> activation by 2 mM ATP (Fig. 24). These results are in agreement with a previous work that reported a high Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase activity in cytotoxic T lymphocytes (CTL), which protected these cells from P2X<sub>7</sub>-mediated LDH release [659]. In contrast to peritoneal macrophages, CTL ATPase activity was attributed to more than one ectonucleotidase, although their identity has not yet been established [659]. Another study has shown that the over expression of NTPDase1 in HUVEC decreased ATP-induced DNA degradation [660]. This cell death was ascribed to P2X<sub>7</sub> that is upregulated in activated HUVEC [259, 661]. At ATP concentrations higher than 4 mM, NTPDase1 could not prevent ATP-induced death in wild type peritoneal macrophages which is in agreement with previous works [646, 662].

In contrast, no differences in LDH release were observed between *Entpd1*<sup>-/-</sup> and *Entpd1*<sup>+/+</sup> DC exposed for 4 hours to 2.5 mM ATP, and apyrase added to DC together with ATP enhanced LDH release in both, *Entpd1*<sup>-/-</sup> and *Entpd1*<sup>+/+</sup> DC, after 1 hour incubation [649]. This LDH release might have been induced by ATP and/or adenosine. Indeed, adenosine was reported to induce death in several cell lines [663-665], but had no effect on the viability of peritoneal macrophages (*Entpd1*<sup>+/+</sup> or *Entpd1*<sup>-/-</sup>) even at 2 mM (not shown).

*NTPDase1 modulates release of IL-1 $\beta$  and IL-18:* Extracellular ATP via P2X<sub>7</sub> activation causes K<sup>+</sup> efflux essential in the process of caspase-1 activation [513, 514] and the release of bioactive IL-1 $\beta$  and IL-18 [516, 666, 667] from activated macrophages which represent the major source of these cytokines during inflammation [532, 533]. Here, we have demonstrated that NTPDase1 controls the release of these cytokines by mouse macrophages as *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages stimulated with ATP released more IL-1 $\beta$  and IL-18 than *Entpd1*<sup>+/+</sup> cells (Figure 25 and 26). NTPDase1 might have a general role in the control of IL-1 $\beta$  release from macrophages as BMM $\Phi$  devoid of NTPDase1 also released more IL-1 $\beta$  than wild type BMM $\Phi$  (Figure 25F). Furthermore, our results indicate that NTPDase1 controls IL-1 $\beta$  release upstream of caspase-1/inflammasome complex activation, and downstream of pro-IL-1 $\beta$  synthesis, which is in agreement with the control of P2X<sub>7</sub> activation. In keeping with the idea that the control of IL-1 cytokine release is regulated by NTPDase1, we have previously shown that IL-1 $\alpha$  is decreased by NTPDase1 overexpression in HUVEC [660].

Murine macrophages express several TLR [504] and the primary stimulation of some of these receptors results in IL-1 $\beta$  and IL-18 release after a subsequent addition of 5 mM ATP [513, 518]. *Entpd1*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages primed for 3 hours with LPS (an agonist of TLR4) and Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR1/2), (but not when primed with poly I:C (TLR3) and flagellin (TLR5)), released high level of IL-1 $\beta$  after stimulation with 2 mM ATP (Figure 25E). The failure of IL-1 $\beta$  release by macrophages when primed with flagellin was unexpected as Mariathason et al. reported the opposite result [666]. It is possible that TLR5 was absent in peritoneal macrophages which is consistent with the fact that it is not expressed by all mouse macrophage lines, being present in J774 and SV-40 MES-13 macrophages but



absent in RAW264.7 cells [504]. Another possibility is that flagellin and poly I:C require longer incubation times. Indeed, poly I:C needs to be internalized to activate TLR3 which is present in intracellular vesicles and flagellin might have its effect via the activation of IPAF-inflammasome in the cytosol of macrophages as it was recently suggested [668].

NTPDase1 has also a role in IL-1 $\beta$  production in vivo as IL-1 $\beta$  levels in exudates from air pouch were increased in *Entpd1*<sup>-/-</sup> compared to *Entpd1*<sup>+/+</sup> mice when LPS was injected in the air pouch of these mice. Although macrophages are present in air pouches, it is unclear whether these cells were responsible for all IL-1 $\beta$  production in this mode as the majority of cells migrating into the air pouch are neutrophils. However, no functional P2X<sub>7</sub> has been shown on neutrophils and their ability to release IL-1 $\beta$  upon LPS stimulation remains to be established, even though neutrophils can produce pro-IL-1 $\beta$  mRNA and protein [669].

*NTPDase1 controls pore formation:* ATP-induced cell death and IL-1 $\beta$  release are often linked to an earlier feature of P2X<sub>7</sub> activation, namely pore formation which happen after short exposure to ATP (2-3 min). *Entpd1*<sup>-/-</sup> macrophages incorporated more Yo-Pro-1 and in a faster way when compared to wild type cells (Figure 28) indicating a regulation of NTPDase1 on the P2X<sub>7</sub>-associated pore formation. In agreement with early control of P2X<sub>7</sub> activation by NTPDase1, high ATPase activity and expression of NTPDase1 correlated with a lack of Ca<sup>2+</sup> mobilization in response to 5 mM ATP in the leukemia B cell line LCL-H [670]. In the latter cells, Ca<sup>2+</sup> was mobilized when this ATPase activity was blocked with  $\beta\gamma$ MeATP, and this mobilization could be inhibited by the P2X<sub>7</sub> antagonist KN-62 [670]. Interestingly, figure 1D reveals that NTPDase1 present on *Entpd1*<sup>+/+</sup> macrophages converted less than 2% of 2 mM ATP after 15 min. This small change in the bulk ATP concentration cannot directly explain the dramatic effect observed on P2X<sub>7</sub> activation in absence of NTPDase1. This suggests that NTPDase1 may be impressed adjacent to P2X<sub>7</sub> in macrophage plasma membrane and could impact local concentration more importantly than what could be seen in the bulk phase. In agreement, both P2X<sub>7</sub> and NTPDase1 can be palmitoylated and localized in detergent-resistant membrane domains, where these proteins might partially colocalize with caveolin [671-673].

### **5.5.3 NTPDase1 may impact inflammation by controlling P2X<sub>7</sub> receptor activation.**

Regulation of P2X<sub>7</sub> activation by NTPDase1 can help maintain low inflammation in resting conditions and favour homeostasis. Inflammatory conditions can modulate NTPDase1 expression and/or activity which is decreased in ischemia reperfusion injury [322, 674] and brain ischemia [675], and increased in certain chronic inflammatory conditions such as colitis and pancreatitis [556-558, 676]. This modulation of NTPDase1 expression and activity may in turn affect P2X<sub>7</sub> mediated signaling and alter inflammation. Indeed, the lack of P2X<sub>7</sub> receptor in knockout mice or the addition of antagonists to wild type animals have been shown to attenuate inflammation in rat brain [677] and in mice unilateral ureteral obstruction [678], to reduce inflammatory and neuropathic pain [645], and to diminish IL-1 $\beta$  and IL-18 release [516].

## **5.6 Conclusions and perspectives**

In conclusion, NTPDase1 is the major ectonucleotidase on murine macrophages, where this ecto-enzyme governs P2X<sub>7</sub>-mediated responses such as ATP-induced death, IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion, and Yo-Pro-1 permeable pore formation. As NTPDase1 participates in the regulation of the extracellular concentrations of both nucleotides and adenosine, it might solely impact P2X<sub>7</sub> activation, but also other P2 and P1 receptors. NTPDase1 and could therefore influence inflammation in a more general manner.

In addition to leukocytes, P2X<sub>7</sub> has also been reported on other cell types. In the central nervous system, P2X<sub>7</sub> seems important in controlling the expression of other P2 receptors like P2Y<sub>2</sub> in rat astrocytes [679] and P2X<sub>3</sub> in neighboring neuron of the P2X<sub>7</sub> expressing glial satellite cell [254] for example. Moreover, this receptor and/or IL-1 $\beta$ , which require P2X<sub>7</sub> receptor sensing of ATP for release, have recently been reported to be involved in several neurological conditions such as depression [680] and HIV-associated dementia [681]. How CD39 impacts these other P2X<sub>7</sub> related processes remains to be determined.



## 5.7 Acknowledgements

We acknowledge the contribution of the Gene Quantification core laboratory of the *Centre de Génomique de Québec*, CRCHUL, for qPCR experiments and of Olga Gordynska, M.Sc., Statistical Consulting Service, Department of mathematics and statistics, *Université Laval*, for the statistical analysis of Yo-Pro-1 uptake data. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and from The Arthritis Society of Canada to JS, and the NIH HL08 and HL094400 to SCR. SAL was a recipient of scholarships from *Fond Hydro-Québec* established at *La Fondation de l'Université Laval*, and from the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ), F.K. of a fellowship from the CIHR/Wyeth Pharmaceuticals, and JS of a New Investigator award from the CIHR and of a junior 2 scholarship from FRSQ.

## 5.8 Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

## 6 Conclusion

En résumé, mes travaux de doctorat ont permis de caractériser une nouvelle ecto-NTPDase chez la souris (Chapitre 2) et le rat (Chapitre 3), soit la NTPDase8, et de confirmer que ses propriétés biochimiques diffèrent un peu des autres NTPDases connues. De plus la comparaison des propriétés biochimiques des NTPDases humaines et de souris retrouvées aux niveaux de la membrane plasmique (Chapitre 3) a permis de montrer que les NTPDases peuvent influencer différemment la concentration des nucléotides liant les récepteurs P2 soit l'ATP, l'ADP, l'UTP et l'UDP et suggère un contrôle fin de l'activation de ces récepteurs. Cette étude a aussi montré certaines différences inter espèces entre les NTPDases. Ensuite, le chapitre 4 décrit la spécificité d'inhibition de l'ARL 67156. Cette molécule est un faible inhibiteur compétitif des NTPDase1, NTPDase3 et la NPP1 et a très peu d'effet sur l'activité de la NTPDase2, la NPP3 et l'ecto-5'-nucléotidase. La NTPDase8, quant à elle, est inhibée par l'ARL 67156 chez la souris, surtout son activité ADPase, mais ne l'est pas chez l'humain. Cette étude montre également que l'ARL 67156 n'est pas hydrolysé par les différentes ecto-nucléotidases et confirme que l'ARL 67156 est efficace en présence de nucléotides libérés par les cellules, mais peu efficace lorsque la concentration de nucléotides est trop élevée comme dans les expériences où des nucléotides sont ajoutés. Finalement, au chapitre 5, j'ai démontré que la NTPDase1 est l'ecto-nucléotidase majeure exprimée par le macrophage péritonéal murin. En absence de cette enzyme, les fonctions associées au récepteur P2X<sub>7</sub>, telles que la mort induite par l'ATP, la relâche d'IL-1 et l'ouverture d'un pore membranaire perméable à la molécule fluorescente Yo-Pro-1, étaient exacerbées. Le contrôle de l'activation par la NTPDase1 du récepteur P2X<sub>7</sub>, ayant surtout un rôle pro-inflammatoire, suggère qu'elle peut moduler la réponse inflammatoire de cette façon en plus de générer de l'adénosine qui a principalement un effet anti-inflammatoire.



## 6.1 Clonage et caractérisation de la NTPDase8 de souris.

Depuis la publication de cette étude en 2004 (Chapitre 2), la NTPDase8 a aussi été clonée chez le rat [86, 308] et l'humain [308, 682]. Cette enzyme possède une bonne homologie avec l'ecto-ATPDase purifiée et clonée du foie chez la poule [596] ainsi qu'une NTPDase de la grenouille *Xenopus* [683]. Comme nous l'avons démontré dans une étude subséquente publiée dans « *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology* » en 2007 [308], la NTPDase8 correspond à l'ecto-ATPDase hépatique du porc [343]. L'expression de la NTPDase8 semble beaucoup plus restreinte que celle des autres NTPDases retrouvées au niveau de la membrane plasmique, et se retrouve principalement au niveau du foie (Figure 10 ; [308, 596, 682]). Chez la souris, comme chez le porc [343], elle est aussi retrouvée dans l'intestin et les reins (Figure 10). Chez la souris, elle est également absente du système reproducteur [553]. Chez la grenouille *Xenopus* son profil d'expression semble un peu plus étendu et son ARNm a aussi été détecté dans d'autres tissus dont le pancréas et les poumons [683].

Dans le foie, la NTPDase8 est présente dans la membrane des hépatocytes au niveau des canalicules biliaires et est l'ecto-nucléotidase majeure du foie [308]. Cependant, vu le manque d'outils disponibles, les fonctions physiologiques jouées par cette enzyme restent à être déterminées. Néanmoins, la forte capacité d'hydrolyser les nucléotides triphosphates et diphosphates à des pH entre 5,5 et 8,0 devrait permettre la régulation de l'activation des récepteurs P2 présents au niveau des hépatocytes et par le fait même, le contrôle de certaines fonctions associées à ces récepteurs, comme la régulation du volume cellulaire, la sécrétion d'ions et la formation de la bile [308]. Comme le foie est la source des purines pour les tissus incapables de synthèse *de novo* tels que le cerveau, la muqueuse intestinale, les muscles et la moelle osseuse, une hydrolyse adéquate en nucléoside dans les canalicules biliaires par la NTPDase8 est probablement aussi essentielle pour la recapture et le maintien des niveaux de purines par les hépatocytes. Finalement, comme pour le foie, le rôle joué par la NTPDase8 dans les autres tissus tels que le rein et l'intestin demeure aussi à être déterminé. D'ailleurs, nous travaillons actuellement dans le laboratoire à la génération de souris déficientes en NTPDase8 afin de nous doter d'outils nécessaires à l'élucidation des rôles joués par cette enzyme.

## 6.2 Comparaison de l'hydrolyse des agonistes des récepteurs P2 par les NTPDase1, 2, 3 et 8.

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs ecto-nucléotidases et ecto-kinases peuvent être exprimées par les cellules et peuvent participer à la régulation de la concentration et de la disponibilité des nucléotides à l'extérieur des cellules. Dans le travail publié dans la revue « Purinergic Signalling » en 2005 [86] et présenté au chapitre 3, nous avons comparé les propriétés biochimiques et le profil d'hydrolyse des différentes NTPDases retrouvées au niveau de la membrane plasmique. Ce travail nous a permis de mieux comprendre le devenir des agonistes des récepteurs P2 soit l'ATP, l'ADP, l'UTP et l'UDP et suggère une certaine finesse du contrôle de la concentration des nucléotides.

La cristallisation du domaine extracellulaire de la NTPDase1 [684] et de la NTPDase2 [285] du rat a été publiée depuis le travail présenté au chapitre 3. La cristallisation de la NTPDase2 a permis la détermination de sa structure tridimensionnelle et celle du site de liaison de l'ATP et de l'ADP et permet d'expliquer en partie l'incapacité de ces enzymes à hydrolyser l'AMP [285]. Récemment, une étude utilisant la technique de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) a montré que chez le rat la NTPDase1 se situait très proche des récepteurs P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, A<sub>1</sub> et A<sub>2a</sub>, ainsi que de la NTPDase2, mais pas du récepteur P2X<sub>2</sub> (les autres récepteurs n'ont pas été étudiés). Pour sa part la NTPDase2 n'interagirait avec aucun des récepteurs P2 de cette étude, seulement avec la NTPDase1 [142]. Cette proximité de la NTPDase1 avec plusieurs récepteurs P2 suggère fortement que cette enzyme régule la signalisation par ces récepteurs. En effet, la désensibilisation des récepteurs P2Y<sub>1</sub> [338, 340] et P2X<sub>1</sub> [341] en absence de NTPDase1 a déjà été rapportée. De plus, le contrôle de l'activation des récepteurs P2Y<sub>2</sub> [340], P2Y<sub>6</sub> [342] et P2X<sub>7</sub> (Chapitre 5) par la NTPDase1 a été observé. Néanmoins, le contrôle de la signalisation P2 par la NTPDase1 a été montré essentiellement chez la souris à l'aide des souris *entpdl*<sup>-/-</sup> et il n'est pas exclu que la régulation des récepteurs P2 soit différente d'une espèce à l'autre. De plus, très peu d'études montrent l'influence que pourraient avoir les autres ecto-nucléotidases et les ecto-kinases que l'on peut retrouver à la surface cellulaire et la détermination de la localisation de ces enzymes est encore en cours dans plusieurs cas.



Une étude récente a modélisé la signalisation par les nucléotides au niveau du liquide à la surface de l'épithélium des voies respiratoires en intégrant plusieurs aspects de la signalisation par les nucléotides, soit la relâche des nucléotides, le métabolisme et le catabolisme des nucléotides et nucléosides ainsi que la réintégration des nucléosides à l'intérieur de la cellule [125]. Ce travail pionnier ouvre la voie à une compréhension intégrée du réseau biochimique influençant la concentration des nucléotides. Ce réseau pourrait être désigné par le terme purinome, comme proposé récemment [685, 686]. Cependant, le modèle proposé pour le liquide à la surface de l'épithélium respiratoire demeure encore difficile à transposer à d'autres tissus ou systèmes physiologiques car l'analyse de l'expression des joueurs impliqués (relâche, récepteurs, enzymes, transporteurs) est en cours. En plus, ce modèle ne tient pas compte de la biodisponibilité des nucléotides qui peuvent être liés aux récepteurs P1 et P2 ou à des protéines circulantes ou de la matrice. Néanmoins, cette étude est très intéressante et pourrait servir de plateforme à l'élaboration de modèles pour d'autres tissus.

### **6.3 Spécificité d'inhibition de l'ARL 67156 pour les ecto-nucléotidases murines et humaines.**

Au début de mes études doctorales très peu d'inhibiteurs spécifiques pour les différentes ecto-nucléotidases étaient disponibles. Nonobstant, plusieurs molécules pouvant inhiber l'activité des NTPDases avaient été rapportées incluant certains agonistes non-hydrolysables ou antagonistes de récepteurs P2 [12, 687]. L'ARL 67156 était le seul inhibiteur commercial disponible de l'activité ecto-ATPase, bien que d'autres molécules telles que le BG0136 (acide 1-naphthol-3, 6-disulfonique) [687], le 8-BuS-ATP [688] et les ions gadoliniums [689] ont été proposés. Il n'y avait donc que deux voies possibles pour évaluer le rôle de la NTPDase1 chez le macrophage, soit l'utilisation de l'ARL 67156 et les souris déficientes en NTPDase1 comme je l'ai mentionné précédemment. La spécificité de l'ARL 67156 n'étant pas connue, j'ai voulu déterminer quelle(s) ecto-nucléotidase(s) capable(s) d'hydrolyser l'ATP étai(en)t inhibée(s) par cette molécule. Comme il est rapporté au chapitre 4, l'ARL 67156 est finalement un faible inhibiteur compétitif de la NTPDase1, la NTPDase3 et la NPP1.

De prime abord, je pouvais utiliser cette molécule pour étudier le rôle potentiel de la NTPDase1 dans le macrophage. Cependant, la faible affinité de l'ARL 67156 pour les ecto-nucléotidases dont la NTPDase1, comparativement à l'ATP, suggère qu'il faille l'utiliser en excès par rapport à l'ATP. Au chapitre 5, nous avons mis en évidence un rôle de la NTPDase1 dans la modulation du récepteur P2X<sub>7</sub> en utilisant les souris *Entpd1*<sup>-/-</sup>. Cependant, nous n'avons pas pu utiliser l'ARL 67156 comme inhibiteur de la NTPDase1, car le récepteur P2X<sub>7</sub> était activé à des concentrations supérieures à 1 mM. Il aurait fallu utiliser l'ARL 67156 à plus de 10 mM et à cette concentration des effets non-spécifiques sur certains récepteurs P2 ont été rapportés comme je le mentionne dans la discussion du chapitre 4.

#### **6.4 NTPDase1 régule les fonctions associées au récepteur P2X<sub>7</sub> des macrophages murins.**

Dans le chapitre 5, nous avons démontré que la NTPDase1 est l'ecto-nucléotidase majeure présente à la surface des macrophages péritonéaux élicités au thioglycollate. La NTPDase1 est aussi l'ecto-nucléotidase majeure des cellules de Langerhans [551], une cellule dendritique résidente de la peau d'origine monocytaire, et des cellules endothéliales [338, 548]. La présence de cette enzyme favorise la génération d'adénosine suite à une relâche d'ATP qui se produit en condition inflammatoire [35, 63] et joue ainsi un rôle anti-inflammatoire comme l'ont montré quelques études [73, 690-692]. Cependant, sa capacité à hydrolyser les nucléotides (Chapitre 5 ; [12]) et la proximité avec certains récepteurs P2 [142] devrait aussi permettre à cette enzyme de contrôler l'activation des récepteurs aux nucléotides.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les nucléotides joueraient un rôle de signaux de danger. Le récepteur P2X<sub>7</sub> semble jouer un rôle clef comme « détecteur » de ce signal de danger car il répond à de fortes concentrations d'ATP et est nécessaire à la relâche d'IL-1 $\beta$ , une cytokine pro-inflammatoire précoce. À la lumière de mes résultats (Chapitre 5), il est facile d'imaginer qu'en présence de la NTPDase1, les cellules endothéliales et les leucocytes soient maintenus dans un état de « repos ». En condition inflammatoire, des



nucléotides peuvent être libérés en grande quantité dans le milieu extracellulaire [35, 63]. De plus, il y a production massive de ROS, surtout par les neutrophiles arrivant au site inflammatoire, qui inhibe l'activité de la NTPDase1. Dans ces conditions, l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> sera favorisée. Ce dernier semble aussi participer à la production de ROS par certains types cellulaires, dont le neutrophile, [693-695] et pourrait favoriser sa propre activation. Une fois que le niveau de ROS est descendu, la NTPDase1 pourra reprendre le contrôle de l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> en déphosphorylant l'ATP.

Dans les macrophages péritonéaux élicités au thioglycollate, l'absence de la NTPDase1 permet une libération accrue des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18 (Chapitre 5). Nous avons aussi observé que tout comme les macrophages péritonéaux, les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMM) *entpd1*<sup>-/-</sup> relâchent plus d'IL-1 $\beta$  que les macrophages issus de souris sauvages. Une étude récente montre aussi que les souris *entpd1*<sup>-/-</sup> présentent, lors d'ischémie, des dommages cérébraux importants qui seraient dus à la migration leucocytaire liée à la présence de l'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  et du récepteur P2X<sub>7</sub> [696]. Ces données suggèrent que la NTPDase1 peut, du moins chez la souris, contrôler l'inflammation en influençant directement l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub>. Cependant, ce mode de contrôle de l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> par la NTPDase1 reste à être vérifié dans d'autres types cellulaires exprimant ce récepteur.

Dans les lymphocytes T, un autre mécanisme de régulation de l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> a été décrit. Ces cellules expriment l'ecto-enzyme ART2.2 qui peut ADP-ribosyler le récepteur P2X<sub>7</sub> en présence de NAD, lui aussi libéré pendant l'inflammation. L'ADP-ribosylation du récepteur P2X<sub>7</sub> permet son activation ou une augmentation de sa sensibilité à l'ATP [104, 697, 698]. Dans les macrophages, cette enzyme est absente, mais récemment Hong et al., ont montré qu'une autre enzyme, la mono(ADP-ribosyl)transférase 2.1 (ART2.1) était exprimée. Cette enzyme est active uniquement en conditions réductrices et pourrait être activée en conditions ischémiques [699, 700]. Cependant, l'expression d'ART2.1 est aussi induite par le LPS, l'interféron  $\beta$  et l'interféron  $\gamma$ , ce qui suggère une régulation à la hausse en conditions inflammatoires [699, 700]. Le rôle joué par cette enzyme et l'influence qu'elle aura sur l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> reste à être démontré.

De plus, il serait intéressant de vérifier l'effet combiné de cette enzyme et de la NTPDase1 sur le contrôle de l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> lors de l'inflammation. Dans un autre ordre d'idée, le peptide LL-37 a aussi été montré comme agoniste du récepteur P2X<sub>7</sub> humain et il est peu probable qu'une nucléotidase comme la NTPDase1 puisse moduler l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> par un peptide. Il serait donc très intéressant d'investiguer la contribution de la NTPDase1 dans le contrôle de l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> dans différents contextes physiologiques ainsi qu'au niveau des diverses cellules exprimant P2X<sub>7</sub>.

Finalement, de nombreuses études récentes semblent suggérer un rôle important de P2X<sub>7</sub> dans des pathologies telles que le cancer [701, 702], la maladie d'Alzheimer [703], la maladie bipolaire et la dépression [680, 704]. Il serait aussi intéressant de voir si et comment la NTPDase1 influence ces pathologies.



## 7 Bibliographie

1. Miller, S.L., *A production of amino acids under possible primitive earth conditions*. Science, 1953. **117**(3046): p. 528-9.
2. Miller, S.L., *The formation of organic compounds on the primitive earth*. Ann N Y Acad Sci, 1957. **69**(2): p. 260-75.
3. Dworkin, J.P., A. Lazcano, and S.L. Miller, *The roads to and from the RNA world*. J Theor Biol, 2003. **222**(1): p. 127-34.
4. Copley, S.D., E. Smith, and H.J. Morowitz, *The origin of the RNA world: co-evolution of genes and metabolism*. Bioorg Chem, 2007. **35**(6): p. 430-43.
5. Abbracchio, M.P., G. Burnstock, J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, G.E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K.A. Jacobson, and G.A. Weisman, *International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 281-341.
6. Boeynaems, J.M., D. Communi, N.S. Gonzalez, B. Hechler, C. Léon, and C. Gachet, *Les récepteurs P2Y des nucleotides extracellulaires : du clonage à la physiologie*. Médecine/Sciences, 2002. **18**: p. 965-73.
7. Burnstock, G., *Purinergic signalling*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S172-81.
8. Burnstock, G., *Historical review: ATP as a neurotransmitter*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(3): p. 166-76.
9. Burnstock, G., *Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(1): p. 58-86.
10. Jacobson, K.A., S. Costanzi, M. Ohno, B.V. Joshi, P. Besada, B. Xu, and S. Tchilibon, *Molecular recognition at purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors*. Curr Top Med Chem, 2004. **4**(8): p. 805-19.
11. Jacobson, K.A. and Z.G. Gao, *Adenosine receptors as therapeutic targets*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 247-64.
12. Robson, S.C., J. Sévigny, and H. Zimmermann, *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 409-30.
13. Stefan, C., S. Jansen, and M. Bollen, *Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 361-70.
14. Surprenant, A. and R.A. North, *Signaling at Purinergic P2X Receptors*. Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 333-59.
15. Burnstock, G. and A. Verkhratsky, *Evolutionary origins of the purinergic signalling system*. Acta Physiol (Oxf), 2009. **195**(4): p. 415-47.
16. Ouellet, D.L., M.P. Perron, L.A. Gobeil, P. Plante, and P. Provost, *MicroRNAs in Gene Regulation: When the Smallest Governs It All*. J Biomed Biotechnol, 2006. **2006**(4): p. 69616.
17. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
18. Cori, C.F., *Some highlights of the early period of bioenergetics*. Mol Cell Biochem, 1974. **5**(1-2): p. 47-53.



19. Boulikas, T., *Phosphorylation of transcription factors and control of the cell cycle*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1995. **5**(1): p. 1-77.
20. Langen, P. and F. Hucho, *Karl Lohmann and the discovery of ATP*. Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(10): p. 1824-7.
21. Drury, A.N. and A. Szent-Gyorgyi, *The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart*. J Physiol, 1929. **68**(3): p. 213-37.
22. Bennet, D.W. and A.N. Drury, *Further observations relating to the physiological activity of adenine compounds*. J Physiol, 1931. **72**(3): p. 288-320.
23. Rawn, J.D., *Traité de Biochimie*. 1990, Bruxelles: DeBoeck Université et Éditions du renouveau pédagogique. 1146.
24. Bradbury, N.A., *cAMP signaling cascades and CFTR: is there more to learn?* Pflugers Arch, 2001. **443 Suppl 1**: p. S85-91.
25. Emmelin, N. and W. Feldberg, *Systemic effects of adenosine triphosphate*. Br J Pharmacol Chemother, 1948. **3**(4): p. 273-84.
26. Holton, F.A. and P. Holton, *The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings*. J Physiol, 1954. **126**(1): p. 124-40.
27. Holton, P., *The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves*. J Physiol, 1959. **145**(3): p. 494-504.
28. Burnstock, G., *Purinergic nerves*. Pharmacol Rev, 1972. **24**(3): p. 509-81.
29. Linden, J., *Adenosine in tissue protection and tissue regeneration*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(5): p. 1385-7.
30. McLennan, A.G., *Dinucleoside polyphosphates-friend or foe?* Pharmacol Ther, 2000. **87**(2-3): p. 73-89.
31. Kisselev, L.L., J. Justesen, A.D. Wolfson, and L.Y. Frolova, *Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules?* FEBS Lett, 1998. **427**(2): p. 157-63.
32. Jankowski, V., M. Tolle, R. Vanholder, G. Schonfelder, M. van der Giet, L. Henning, H. Schluter, M. Paul, W. Zidek, and J. Jankowski, *Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium-derived vasoconstrictive factor*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 223-7.
33. Kalckar, H.M., *The role of phosphoglycosyl compounds in the biosynthesis of nucleosides and nucleotides*. Biochim Biophys Acta, 1953. **12**(1-2): p. 250-64.
34. Schrecker, A.W. and A. Kornberg, *Reversible enzymatic synthesis of flavin-adenine dinucleotide*. J Biol Chem, 1950. **182**(2): p. 795-803.
35. Bodin, P. and G. Burnstock, *Purinergic signalling: ATP release*. Neurochem Res, 2001. **26**(8-9): p. 959-69.
36. Vollmayer, P., T. Clair, J.W. Goding, K. Sano, J. Servos, and H. Zimmermann, *Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases*. Eur J Biochem, 2003. **270**(14): p. 2971-8.
37. Chiao, J. J., J.P. Roberts, H.P. Illner, and G.T. Shires, *Permeability of red-cell membrane to adenosine triphosphate (ATP) molecules during hemorrhagic shock*. Surgery, 1987. **102**(3): p. 528-33.
38. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 1013-67.



39. Ciana, P., M. Fumagalli, M.L. Trincavelli, C. Verderio, P. Rosa, D. Lecca, S. Ferrario, C. Parravicini, V. Capra, P. Gelosa, U. Guerrini, S. Belcredito, M. Cimino, L. Sironi, E. Tremoli, G.E. Rovati, C. Martini, and M.P. Abbracchio, *The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor*. *Embo J*, 2006. **25**(19): p. 4615-27.
40. von Kugelgen, I., *Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes*. *Pharmacol Ther*, 2006. **110**(3): p. 415-32.
41. Cusack, N.J., J.D. Pearson, and J.L. Gordon, *Stereoselectivity of ectonucleotidases on vascular endothelial cells*. *Biochem J*, 1983. **214**(3): p. 975-81.
42. Pearson, J.D., J.S. Carleton, and J.L. Gordon, *Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture*. *Biochem J*, 1980. **190**(2): p. 421-9.
43. Baldwin, S.A., P.R. Beal, S.Y. Yao, A.E. King, C.E. Cass, and J.D. Young, *The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29*. *Pflugers Arch*, 2004. **447**(5): p. 735-43.
44. Gray, J.H., R.P. Owen, and K.M. Giacomini, *The concentrative nucleoside transporter family, SLC28*. *Pflugers Arch*, 2004. **447**(5): p. 728-34.
45. Traut, T.W., *Physiological concentrations of purines and pyrimidines*. *Mol Cell Biochem*, 1994. **140**(1): p. 1-22.
46. Silver, I.A., J. Deas, and M. Erecinska, *Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells*. *Neuroscience*, 1997. **78**(2): p. 589-601.
47. Coade, S.B. and J.D. Pearson, *Metabolism of adenine nucleotides in human blood*. *Circ Res*, 1989. **65**(3): p. 531-7.
48. Ryan, L.M., J.W. Rachow, B.A. McCarty, and D.J. McCarty, *Adenosine triphosphate levels in human plasma*. *J Rheumatol*, 1996. **23**(2): p. 214-9.
49. Ryan, L.M., J.W. Rachow, and D.J. McCarty, *Synovial fluid ATP: a potential substrate for the production of inorganic pyrophosphate*. *J Rheumatol*, 1991. **18**(5): p. 716-20.
50. Bours, M.J., E.L. Swennen, F. Di Virgilio, B.N. Cronstein, and P.C. Dagnelie, *Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation*. *Pharmacol Ther*, 2006. **112**(2): p. 358-404.
51. Bodin, P. and G. Burnstock, *Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001. **38**(6): p. 900-8.
52. Scheuplein, F., N. Schwarz, S. Adriouch, C. Krebs, P. Bannas, B. Rissiek, M. Seman, F. Haag, and F. Koch-Nolte, *NAD<sup>+</sup> and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells*. *J Immunol*, 2009. **182**(5): p. 2898-908.
53. Born, G.V. and M.A. Kratzer, *Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man*. *J Physiol*, 1984. **354**: p. 419-29.
54. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. 6th ed. 2002, New York: W. H. Freeman and Co. 1120 pages.



55. Yegutkin, G.G., *Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(5): p. 673-94.
56. Pintor, J., P. Rotllan, M. Torres, and M.T. Miras-Portugal, *Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release*. *Anal Biochem*, 1992. **200**(2): p. 296-300.
57. Dowdall, M.J., A.F. Boyne, and V.P. Whittaker, *Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles*. *Biochem J*, 1974. **140**(1): p. 1-12.
58. Rathbone, M.P., P.J. Middlemiss, J.W. Gysbers, C. Andrew, M.A. Herman, J.K. Reed, R. Ciccarelli, P. Di Iorio, and F. Caciagli, *Trophic effects of purines in neurons and glial cells*. *Prog Neurobiol*, 1999. **59**(6): p. 663-90.
59. Homolya, L., T.H. Steinberg, and R.C. Boucher, *Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia*. *J Cell Biol*, 2000. **150**(6): p. 1349-60.
60. Schwiebert, E.M. and A. Zsembery, *Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1615**(1-2): p. 7-32.
61. Okada, S.F., R.A. Nicholas, S.M. Kreda, E.R. Lazarowski, and R.C. Boucher, *Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(32): p. 22992-3002.
62. Pearson, J.D. and J.L. Gordon, *Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides*. *Nature*, 1979. **281**(5730): p. 384-6.
63. Bodin, P. and G. Burnstock, *Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation*. *Inflamm Res*, 1998. **47**(8): p. 351-4.
64. Buxton, I.L., R.A. Kaiser, B.C. Oxhorn, and D.J. Cheek, *Evidence supporting the Nucleotide Axis Hypothesis: ATP release and metabolism by coronary endothelium*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **281**(4): p. H1657-66.
65. Grierson, J.P. and J. Meldolesi, *Shear stress-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients and oscillations in mouse fibroblasts are mediated by endogenously released ATP*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(9): p. 4451-6.
66. Gerasimovskaya, E.V., S. Ahmad, C.W. White, P.L. Jones, T.C. Carpenter, and K.R. Stenmark, *Extracellular ATP is an autocrine/paracrine regulator of hypoxia-induced adventitial fibroblast growth. Signaling through extracellular signal-regulated kinase-1/2 and the Egr-1 transcription factor*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(47): p. 44638-50.
67. Roman, R.M. and J.G. Fitz, *Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function*. *Gastroenterology*, 1999. **116**(4): p. 964-79.
68. Fabre, A.C., P. Vantourout, E. Champagne, F. Terce, C. Rolland, B. Perret, X. Collet, R. Barbaras, and L.O. Martinez, *Cell surface adenylate kinase activity regulates the F(1)-ATPase/P2Y (13)-mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(23): p. 2829-37.
69. Mizumoto, N., M.E. Mummert, D. Shalhevet, and A. Takashima, *Keratinocyte ATP Release Assay for Testing Skin-Irritating Potentials of Structurally Diverse Chemicals*. *J Invest Dermatol*, 2003. **121**: p. 1066-72.
70. Burrell, H.E., B. Wlodarski, B.J. Foster, K.A. Buckley, G.R. Sharpe, J.M. Quayle, A.W. Simpson, and J.A. Gallagher, *Human keratinocytes release ATP and utilize*



- three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface.* J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29667-76.
71. Gordon, G.R., D.V. Baimoukhametova, S.A. Hewitt, W.R. Rajapaksha, T.E. Fisher, and J.S. Bains, *Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy.* Nat Neurosci, 2005. **8**(8): p. 1078-86.
  72. Wong, C.W., T. Christen, I. Roth, C.E. Chadjichristos, J.P. Derouette, B.F. Foglia, M. Chanson, D.A. Goodenough, and B.R. Kwak, *Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion.* Nat Med, 2006. **12**(8): p. 950-4.
  73. Eltzschig, H.K., T. Eckle, A. Mager, N. Kuper, C. Karcher, T. Weissmuller, K. Boengler, R. Schulz, S.C. Robson, and S.P. Colgan, *ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function.* Circ Res, 2006. **99**(10): p. 1100-8.
  74. Bergfeld, G.R. and T. Forrester, *Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia.* Cardiovasc Res, 1992. **26**(1): p. 40-7.
  75. Sprague, R.S., A.H. Stephenson, and M.L. Ellsworth, *Red not dead: signaling in and from erythrocytes.* Trends Endocrinol Metab, 2007. **18**(9): p. 350-5.
  76. Boudreault, F. and R. Grygorczyk, *Cell swelling-induced ATP release and gadolinium-sensitive channels.* Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(1): p. C219-26.
  77. Praetorius, H.A. and J. Leipziger, *ATP release from non-excitabile cells.* Purinergic Signal, 2009.
  78. Dahl, G. and S. Locovei, *Pannexin: to gap or not to gap, is that a question?* IUBMB Life, 2006. **58**(7): p. 409-19.
  79. Schock, S.C., D. Leblanc, A.M. Hakim, and C.S. Thompson, *ATP release by way of connexin 36 hemichannels mediates ischemic tolerance in vitro.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **368**(1): p. 138-44.
  80. Anselmi, F., V.H. Hernandez, G. Crispino, A. Seydel, S. Ortolano, S.D. Roper, N. Kessaris, W. Richardson, G. Rickheit, M.A. Filippov, H. Monyer, and F. Mammano, *ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca<sup>2+</sup> signals across the inner ear.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 18770-5.
  81. Bao, L., S. Locovei, and G. Dahl, *Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP.* FEBS Lett, 2004. **572**(1-3): p. 65-8.
  82. Lazarowski, E.R. and R.C. Boucher, *UTP as an extracellular signaling molecule.* News Physiol Sci, 2001. **16**: p. 1-5.
  83. Lazarowski, E.R. and T.K. Harden, *Quantitation of extracellular UTP using a sensitive enzymatic assay.* Br J Pharmacol, 1999. **127**(5): p. 1272-8.
  84. Koizumi, S., Y. Shigemoto-Mogami, K. Nasu-Tada, Y. Shinozaki, K. Ohsawa, M. Tsuda, B.V. Joshi, K.A. Jacobson, S. Kohsaka, and K. Inoue, *UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis.* Nature, 2007. **446**(7139): p. 1091-5.
  85. Tatur, S., S. Kreda, E. Lazarowski, and R. Grygorczyk, *Calcium-dependent release of adenosine and uridine nucleotides from A549 cells.* Purinergic Signal, 2008. **4**(2): p. 139-46.



86. Kukulski, F., S.A. Lévesque, E.G. Lavoie, J. Lecka, F. Bigonnesse, A.F. Knowles, S.C. Robson, T.L. Kirley, and J. Sévigny, *Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8*. Purinergic Signal, 2005. **1**(2): p. 193-204.
87. Pagé, G., A.R. Beaudoin, and E. Rousseau, *Modulation des activités électrophysiologiques des fibres du Purkinje de mouton par le CTP extracellulaire.*, in *69ème congrès de l'ACFAS*. 2001: Sherbrooke, QC, Canada.
88. Davoren, P.R. and E.W. Sutherland, *The Effect of L-Epinephrine and Other Agents on the Synthesis and Release of Adenosine 3',5'-Phosphate by Whole Pigeon Erythrocytes*. J Biol Chem, 1963. **238**: p. 3009-15.
89. Rindler, M.J., M.M. Bashor, N. Spitzer, and M.H. Saier, Jr., *Regulation of adenosine 3':5'-monophosphate efflux from animal cells*. J Biol Chem, 1978. **253**(15): p. 5431-6.
90. Chiavegatti, T., V.L. Costa, Jr., M.S. Araujo, and R.O. Godinho, *Skeletal muscle expresses the extracellular cyclic AMP-adenosine pathway*. Br J Pharmacol, 2008. **153**(6): p. 1331-40.
91. Chen, Z.S., K. Lee, and G.D. Kruh, *Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33747-54.
92. van Aubel, R.A., P.H. Smeets, J.G. Peters, R.J. Bindels, and F.G. Russel, *The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(3): p. 595-603.
93. Wielinga, P.R., I. van der Heijden, G. Reid, J.H. Beijnen, J. Wijnholds, and P. Borst, *Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 17664-71.
94. Suzuki, T., H. Sasaki, H.J. Kuh, M. Agui, Y. Tatsumi, S. Tanabe, M. Terada, N. Saijo, and K. Nishio, *Detailed structural analysis on both human MRP5 and mouse mrp5 transcripts*. Gene, 2000. **242**(1-2): p. 167-73.
95. Jedlitschky, G., B. Burchell, and D. Keppler, *The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides*. J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30069-74.
96. Guo, Y., E. Kotova, Z.S. Chen, K. Lee, E. Hopper-Borge, M.G. Belinsky, and G.D. Kruh, *MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29509-14.
97. Gorin, E. and T. Brenner, *Extracellular metabolism of cyclic AMP* Biochim Biophys Acta, 1976. **451**(1): p. 20-8
98. Smoake, J.A., K.L. McMahon, R.K. Wright, and S.S. Solomon, *Hormonally sensitive cyclic AMP phosphodiesterase in liver cells. An ecto-enzyme*. J Biol Chem, 1981. **256**(16): p. 8531-5.
99. Jackson, E.K. and D.K. Raghvendra, *The extracellular cyclic AMP-adenosine pathway in renal physiology*. Annu Rev Physiol, 2004. **66**: p. 571-99.
100. Jackson, E.K., J. Ren, L.C. Zacharia, and Z. Mi, *Characterization of renal ecto-phosphodiesterase*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(2): p. 810-5.



101. Zacher, L.A. and G.B. Carey, *Cyclic AMP metabolism by swine adipocyte microsomal and plasma membranes*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1999. **124**(1): p. 61-71.
102. Smyth, L.M., J. Bobalova, M.G. Mendoza, C. Lew, and V.N. Mutafova-Yambolieva, *Release of beta-nicotinamide adenine dinucleotide upon stimulation of postganglionic nerve terminals in blood vessels and urinary bladder*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 48893-903.
103. Bruzzone, S., L. Guida, E. Zocchi, L. Franco, and A. De Flora, *Connexin 43 hemichannels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells*. *FASEB J*, 2001. **15**(1): p. 10-2.
104. Seman, M., S. Adriouch, F. Scheuplein, C. Krebs, D. Freese, G. Glowacki, P. Deterre, F. Haag, and F. Koch-Nolte, *NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor*. *Immunity*, 2003. **19**(4): p. 571-82.
105. Sesma, J.I., C.R. Esther, Jr., S.M. Kreda, L. Jones, W. O'Neal, S. Nishihara, R.A. Nicholas, and E.R. Lazarowski, *ER/golgi nucleotide sugar transporters contribute to the cellular release of UDP-sugar signaling molecules*. *J Biol Chem*, 2009.
106. Picher, M. and R.C. Boucher, *Biochemical evidence for an ecto alkaline phosphodiesterase I in human airways*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000. **23**(2): p. 255-61.
107. Hilderman, R.H. and E.F. Christensen, *P1,P4-diadenosine 5' tetraphosphate induces nitric oxide release from bovine aortic endothelial cells*. *FEBS Lett*, 1998. **427**(3): p. 320-4.
108. Pintor, J., A. Bautista, G. Carracedo, and A. Peral, *UTP and diadenosine tetraphosphate accelerate wound healing in the rabbit cornea*. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2004. **24**(3): p. 186-93.
109. Zamecnik, P.C., B. Kim, M.J. Gao, G. Taylor, and G.M. Blackburn, *Analogues of diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate (Ap4A) as potential anti-platelet-aggregation agents*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(6): p. 2370-3.
110. Shaver, S.R., J.L. Rideout, W. Pendergast, J.G. Douglass, E.G. Brown, J.L. Boyer, R.I. Patel, C.C. Redick, A.C. Jones, M. Picher, and B.R. Yerxa, *Structure-activity relationships of dinucleotides: Potent and selective agonists of P2Y receptors*. *Purinergic Signal*, 2005. **1**(2): p. 183-91.
111. Pintor, J., B.F. King, M.T. Miras-Portugal, and G. Burnstock, *Selectivity and activity of adenine dinucleotides at recombinant P2X2 and P2Y1 purinoceptors*. *Br J Pharmacol*, 1996. **119**(5): p. 1006-12.
112. Pintor, J. and M.T. Miras-Portugal, *P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system*. *Gen Pharmacol*, 1995. **26**(2): p. 229-35.
113. Pintor, J., J. Gualix, and M.T. Miras-Portugal, *Diinosine polyphosphates, a group of dinucleotides with antagonistic effects on diadenosine polyphosphate receptor*. *Mol Pharmacol*, 1997. **51**(2): p. 277-84.
114. Hoyle, C.H., J. Pintor, J. Gualix, and M.T. Miras-Portugal, *Antagonism of P2X receptors in guinea-pig vas deferens by diinosine pentaphosphate*. *Eur J Pharmacol*, 1997. **333**(2-3): p. R1-2.



115. Judkins, C.P., C.G. Sobey, T.T. Dang, A.A. Miller, G.J. Dusting, and G.R. Drummond, *NADPH-induced contractions of mouse aorta do not involve NADPH oxidase: a role for P2X receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **317**(2): p. 644-50.
116. Broetto-Biazon, A.C., M.M. Kangussu, F. Padilha, F. Bracht, A.M. Kelmer-Bracht, and A. Bracht, *Transformation and actions of extracellular NADP(+) in the rat liver*. Mol Cell Biochem, 2008. **317**(1-2): p. 85-95.
117. Hashmi-Hill, M.P., K. Sandock, J.N. Bates, T.P. Robertson, and S.J. Lewis, *Flavin adenine dinucleotide may release preformed stores of nitrosyl factors from the vascular endothelium of conscious rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **50**(2): p. 142-54.
118. Ralevic, V., C.H. Hoyle, and G. Burnstock, *Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries*. J Physiol, 1995. **483** ( Pt 3): p. 703-13.
119. Kontani, K., H. Nishina, Y. Ohoka, K. Takahashi, and T. Katada, *NAD glycohydrolase specifically induced by retinoic acid in human leukemic HL-60 cells. Identification of the NAD glycohydrolase as leukocyte cell surface antigen CD38*. J Biol Chem, 1993. **268**(23): p. 16895-8.
120. Partida-Sanchez, S., L. Rivero-Nava, G. Shi, and F.E. Lund, *CD38: an ecto-enzyme at the crossroads of innate and adaptive immune responses*. Adv Exp Med Biol, 2007. **590**: p. 171-83.
121. Funaro, A., E. Ortolan, P. Bovino, N. Lo Buono, G. Nacci, R. Parrotta, E. Ferrero, and F. Malavasi, *Ectoenzymes and innate immunity: the role of human CD157 in leukocyte trafficking*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 929-43.
122. Dong, C., J. Wang, P. Neame, and M.D. Cooper, *The murine BP-3 gene encodes a relative of the CD38/NAD glycohydrolase family*. Int Immunol, 1994. **6**(9): p. 1353-60.
123. Bortell, R., T. Kanaitsuka, L.A. Stevens, J. Moss, J.P. Mordes, A.A. Rossini, and D.L. Greiner, *The RT6 (Art2) family of ADP-ribosyltransferases in rat and mouse*. Mol Cell Biochem, 1999. **193**(1-2): p. 61-8.
124. Koch-Nolte, F., S. Kernstock, C. Mueller-Dieckmann, M.S. Weiss, and F. Haag, *Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 6716-29.
125. Zuo, P., M. Picher, S.F. Okada, E.R. Lazarowski, B. Button, R.C. Boucher, and T.C. Elston, *Mathematical model of nucleotide regulation on airway epithelia. Implications for airway homeostasis*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26805-19.
126. Yegutkin, G.G., S.S. Samburski, S. Jalkanen, and I. Novak, *ATP-consuming and ATP-generating enzymes secreted by pancreas*. J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 29441-7.
127. Communi, D., C. Govaerts, M. Parmentier, and J.M. Boeynaems, *Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 31969-73.
128. Saunders-Wage, E. and A. Townsend-Nicholson, *Comparative genomics of the P2Y11 receptor*, in *Purine 2008*, D. Erlinge, I. Novak, and J. Leipziger, Editors. 2008, Purinergic Signal: Copenhagen, Denmark. p. S7.



129. Devader, C., C.M. Drew, T.J. Geach, J. Tabler, A. Townsend-Nicholson, and L. Dale, *A novel nucleotide receptor in Xenopus activates the cAMP second messenger pathway*. FEBS Lett, 2007. **581**(27): p. 5332-6.
130. Webb, T.E., D. Henderson, B.F. King, S. Wang, J. Simon, A.N. Bateson, G. Burnstock, and E.A. Barnard, *A novel G protein-coupled P2 purinoceptor (P2Y3) activated preferentially by nucleoside diphosphates*. Mol Pharmacol, 1996. **50**(2): p. 258-65.
131. Bogdanov, Y.D., L. Dale, B.F. King, N. Whittock, and G. Burnstock, *Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of Xenopus embryos*. J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12583-90.
132. Murakami, M., A. Shiraishi, K. Tabata, and N. Fujita, *Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(4): p. 707-12.
133. Noguchi, K., S. Ishii, and T. Shimizu, *Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25600-6.
134. Pasternack, S.M., I. von Kugelgen, K.A. Aboud, Y.A. Lee, F. Ruschendorf, K. Voss, A.M. Hillmer, G.J. Molderings, T. Franz, A. Ramirez, P. Nurnberg, M.M. Nothen, and R.C. Betz, *G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth*. Nat Genet, 2008. **40**(3): p. 329-34.
135. Webb, T.E., M.G. Kaplan, and E.A. Barnard, *Identification of 6H1 as a P2Y purinoceptor: P2Y5*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **219**(1): p. 105-10.
136. Yokomizo, T., T. Izumi, K. Chang, Y. Takuwa, and T. Shimizu, *A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 620-4.
137. von Kugelgen, I. and A. Wetter, *Molecular pharmacology of P2Y-receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 310-23.
138. Choi, R.C., J. Simon, K.W. Tsim, and E.A. Barnard, *Constitutive and agonist-induced dimerizations of the P2Y1 receptor: relationship to internalization and scaffolding*. J Biol Chem, 2008. **283**(16): p. 11050-63.
139. Ecke, D., T. Hanck, M.E. Tulapurkar, R. Schafer, M. Kassack, R. Stricker, and G. Reiser, *Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor*. Biochem J, 2008. **409**(1): p. 107-16.
140. Yoshioka, K., R. Hosoda, Y. Kuroda, and H. Nakata, *Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains*. FEBS Lett, 2002. **531**(2): p. 299-303.
141. Nakata, H., K. Yoshioka, T. Kamiya, H. Tsuga, and K. Oyanagi, *Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors*. J Mol Neurosci, 2005. **26**(2-3): p. 233-8.
142. Schicker, K., S. Hussl, G.K. Chandaka, K. Kosenburger, J.W. Yang, M. Waldhoer, H.H. Sitte, and S. Boehm, *A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(2): p. 325-34.



143. D'Ambrosi, N., M. Iafrate, E. Saba, P. Rosa, and C. Volonte, *Comparative analysis of P2Y4 and P2Y6 receptor architecture in native and transfected neuronal systems*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(6): p. 1592-9.
144. Suzuki, T., K. Namba, H. Tsuga, and H. Nakata, *Regulation of pharmacology by hetero-oligomerization between A1 adenosine receptor and P2Y2 receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **351**(2): p. 559-65.
145. Camaioni, E., J.L. Boyer, A. Mohanram, T.K. Harden, and K.A. Jacobson, *Deoxyadenosine bisphosphate derivatives as potent antagonists at P2Y1 receptors*. *J Med Chem*, 1998. **41**(2): p. 183-90.
146. Boyer, J.L., M. Adams, R.G. Ravi, K.A. Jacobson, and T.K. Harden, *2-Chloro N(6)-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y(1) receptor antagonist*. *Br J Pharmacol*, 2002. **135**(8): p. 2004-10.
147. Kim, H.S., M. Ohno, B. Xu, H.O. Kim, Y. Choi, X.D. Ji, S. Maddileti, V.E. Marquez, T.K. Harden, and K.A. Jacobson, *2-Substitution of adenine nucleotide analogues containing a bicyclo[3.1.0]hexane ring system locked in a northern conformation: enhanced potency as P2Y1 receptor antagonists*. *J Med Chem*, 2003. **46**(23): p. 4974-87.
148. Bourdon, D.M., S.K. Mahanty, K.A. Jacobson, J.L. Boyer, and T.K. Harden, *(N)-methanocarpa-2MeSADP (MRS2365) is a subtype-specific agonist that induces rapid desensitization of the P2Y1 receptor of human platelets*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(4): p. 861-8.
149. Tokuyama, Y., M. Hara, E.M. Jones, Z. Fan, and G.I. Bell, *Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **211**(1): p. 211-8.
150. Ayyanathan, K., T.E. Webbs, A.K. Sandhu, R.S. Athwal, E.A. Barnard, and S.P. Kunapuli, *Cloning and chromosomal localization of the human P2Y1 purinoceptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **218**(3): p. 783-8.
151. Janssens, R., D. Communi, S. Piroton, M. Samson, M. Parmentier, and J.M. Boeynaems, *Cloning and tissue distribution of the human P2Y1 receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **221**(3): p. 588-93.
152. Parr, C.E., D.M. Sullivan, A.M. Paradiso, E.R. Lazarowski, L.H. Burch, J.C. Olsen, L. Erb, G.A. Weisman, R.C. Boucher, and J.T. Turner, *Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(26): p. 13067.
153. Lustig, K.D., A.K. Shiau, A.J. Brake, and D. Julius, *Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(11): p. 5113-7.
154. Erb, L., K.D. Lustig, D.M. Sullivan, J.T. Turner, and G.A. Weisman, *Functional expression and photoaffinity labeling of a cloned P2U purinergic receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(22): p. 10449-53.
155. Yerxa, B.R., J.R. Sabater, C.W. Davis, M.J. Stutts, M. Lang-Furr, M. Picher, A.C. Jones, M. Cowlen, R. Dougherty, J. Boyer, W.M. Abraham, and R.C. Boucher, *Pharmacology of INS37217 [P(1)-(uridine 5')-P(4)-(2'-deoxycytidine 5')tetrphosphate, tetrasodium salt], a next-generation P2Y(2) receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **302**(3): p. 871-80.



156. Communi, D., S. Pirotton, M. Parmentier, and J.M. Boeynaems, *Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor*. J Biol Chem, 1995. **270**(52): p. 30849-52.
157. Charlton, S.J., C.A. Brown, G.A. Weisman, J.T. Turner, L. Erb, and M.R. Boarder, *Cloned and transfected P2Y4 receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP*. Br J Pharmacol, 1996. **119**(7): p. 1301-3.
158. Suarez-Huerta, N., V. Pouillon, J. Boeynaems, and B. Robaye, *Molecular cloning and characterization of the mouse P2Y4 nucleotide receptor*. Eur J Pharmacol, 2001. **416**(3): p. 197-202.
159. Lazarowski, E.R., L.G. Rochelle, W.K. O'Neal, C.M. Ribeiro, B.R. Grubb, V. Zhang, T.K. Harden, and R.C. Boucher, *Cloning and functional characterization of two murine uridine nucleotide receptors reveal a potential target for correcting ion transport deficiency in cystic fibrosis gallbladder*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(1): p. 43-9.
160. Communi, D., M. Parmentier, and J.M. Boeynaems, *Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **222**(2): p. 303-8.
161. Southey, M.C., F. Hammet, A.M. Hutchins, M. Paidhungat, G.R. Somers, and D.J. Venter, *Molecular cloning and sequencing of a novel human P2 nucleotide receptor*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1309**(1-2): p. 77-80.
162. Mamedova, L.K., B.V. Joshi, Z.G. Gao, I. von Kugelgen, and K.A. Jacobson, *Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y6 nucleotide receptors*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(9): p. 1763-70.
163. Ullmann, H., S. Meis, D. Hongwiset, C. Marzian, M. Wiese, P. Nickel, D. Communi, J.M. Boeynaems, C. Wolf, R. Hausmann, G. Schmalzing, and M.U. Kassack, *Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y11 receptor antagonists with nanomolar potency*. J Med Chem, 2005. **48**(22): p. 7040-8.
164. Johnson, F.L., J.L. Boyer, P.T. Leese, C. Crean, R. Krishnamoorthy, T. Durham, A.W. Fox, and D.J. Kellerman, *Rapid and reversible modulation of platelet function in man by a novel P2Y(12) ADP-receptor antagonist, INS50589*. Platelets, 2007. **18**(5): p. 346-56.
165. Takasaki, J., M. Kamohara, T. Saito, M. Matsumoto, S. Matsumoto, T. Ohishi, T. Soga, H. Matsushime, and K. Furuichi, *Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y(1) receptor*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(3): p. 432-9.
166. Zhang, F.L., L. Luo, E. Gustafson, J. Lachowicz, M. Smith, X. Qiao, Y.H. Liu, G. Chen, B. Pramanik, T.M. Laz, K. Palmer, M. Bayne, and F.J. Monsma, Jr., *ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8608-15.
167. Foster, C.J., D.M. Prosser, J.M. Agans, Y. Zhai, M.D. Smith, J.E. Lachowicz, F.L. Zhang, E. Gustafson, F.J. Monsma, Jr., M.T. Wiekowski, S.J. Abbondanzo, D.N. Cook, M.L. Bayne, S.A. Lira, and M.S. Chintala, *Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs*. J Clin Invest, 2001. **107**(12): p. 1591-8.



168. Pausch, M.H., M. Lai, E. Tseng, J. Paulsen, B. Bates, and S. Kwak, *Functional expression of human and mouse P2Y12 receptors in Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **324**(1): p. 171-7.
169. Hasegawa, M., A. Sugidachi, T. Ogawa, T. Isobe, J.A. Jakubowski, and F. Asai, *Stereoselective inhibition of human platelet aggregation by R-138727, the active metabolite of CS-747 (prasugrel, LY640315), a novel P2Y12 receptor inhibitor*. *Thromb Haemost*, 2005. **94**(3): p. 593-8.
170. Ingall, A.H., J. Dixon, A. Bailey, M.E. Coombs, D. Cox, J.I. McNally, S.F. Hunt, N.D. Kindon, B.J. Teobald, P.A. Willis, R.G. Humphries, P. Leff, J.A. Clegg, J.A. Smith, and W. Tomlinson, *Antagonists of the platelet P2T receptor: a novel approach to antithrombotic therapy*. *J Med Chem*, 1999. **42**(2): p. 213-20.
171. Nonaka, Y., T. Hiramoto, and N. Fujita, *Identification of endogenous surrogate ligands for human P2Y12 receptors by in silico and in vitro methods*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **337**(1): p. 281-8.
172. El-Tayeb, A., K.J. Griessmeier, and C.E. Muller, *Synthesis and preliminary evaluation of [3H]PSB-0413, a selective antagonist radioligand for platelet P2Y12 receptors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005. **15**(24): p. 5450-2.
173. Scarborough, R.M., A.M. Laibelman, L.A. Clizbe, L.J. Fretto, P.B. Conley, E.E. Reynolds, D.M. Sedlock, and H. Jantzen, *Novel tricyclic benzothiazolo[2,3-c]thiadiazine antagonists of the platelet ADP receptor (P2Y(12))*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001. **11**(14): p. 1805-8.
174. Zhang, F.L., L. Luo, E. Gustafson, K. Palmer, X. Qiao, X. Fan, S. Yang, T.M. Laz, M. Bayne, and F. Monsma, Jr., *P2Y(13): identification and characterization of a novel Galphai-coupled ADP receptor from human and mouse*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **301**(2): p. 705-13.
175. Kim, Y.C., J.S. Lee, K. Sak, F. Marteau, L. Mamedova, J.M. Boeynaems, and K.A. Jacobson, *Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y13 receptor*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **70**(2): p. 266-74.
176. Freeman, K., P. Tsui, D. Moore, P.C. Emson, L. Vawter, S. Naheed, P. Lane, H. Bawagan, N. Herrity, K. Murphy, H.M. Sarau, R.S. Ames, S. Wilson, G.P. Livi, and J.K. Chambers, *Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001) rodent orthologs*. *Genomics*, 2001. **78**(3): p. 124-8.
177. Abbracchio, M.P., J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, M.T. Miras-Portugal, B.F. King, C. Gachet, K.A. Jacobson, G.A. Weisman, and G. Burnstock, *Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family*. *Trends Pharmacol Sci*, 2003. **24**(2): p. 52-5.
178. Fricks, I.P., S. Maddileti, R.L. Carter, E.R. Lazarowski, R.A. Nicholas, K.A. Jacobson, and T.K. Harden, *UDP is a competitive antagonist at the human P2Y14 receptor*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. **325**(2): p. 588-94.
179. Carter, R.L., I.P. Fricks, M.O. Barrett, L.E. Buriianek, Y. Zhou, H. Ko, A. Das, K.A. Jacobson, E.R. Lazarowski, and T.K. Harden, *Quantification of Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity reveals that UDP is a potent agonist of the human P2Y14 receptor*. *Mol Pharmacol*, 2009. **76**(6): p. 1341-8.



180. Nicke, A., H.G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler, and G. Schmalzing, *P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels*. EMBO J, 1998. **17**(11): p. 3016-28.
181. Aschrafi, A., S. Sadtler, C. Niculescu, J. Rettinger, and G. Schmalzing, *Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes*. J Mol Biol, 2004. **342**(1): p. 333-43.
182. Kawate, T., J.C. Michel, W.T. Birdsong, and E. Gouaux, *Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state*. Nature, 2009. **460**(7255): p. 592-8.
183. Chakfe, Y., R. Seguin, J.P. Antel, C. Morissette, D. Malo, D. Henderson, and P. Seguela, *ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels*. J Neurosci, 2002. **22**(8): p. 3061-9.
184. Torres, G.E., T.M. Egan, and M.M. Voigt, *Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6653-9.
185. Nicke, A., D. Kerschensteiner, and F. Soto, *Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits*. J Neurochem, 2005. **92**(4): p. 925-33.
186. Haines, W.R., G.E. Torres, M.M. Voigt, and T.M. Egan, *Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(4): p. 720-7.
187. Surprenant, A., D.A. Schneider, H.L. Wilson, J.J. Galligan, and R.A. North, *Functional properties of heteromeric P2X(1/5) receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles*. J Auton Nerv Syst, 2000. **81**(1-3): p. 249-63.
188. Le, K.T., E. Boue-Grabot, V. Archambault, and P. Seguela, *Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits*. J Biol Chem, 1999. **274**(22): p. 15415-9.
189. Lewis, C., S. Neidhart, C. Holy, R.A. North, G. Buell, and A. Surprenant, *Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons*. Nature, 1995. **377**(6548): p. 432-5.
190. Neelands, T.R., E.C. Burgard, M.E. Uchic, H.A. McDonald, W. Niforatos, C.R. Faltynek, K.J. Lynch, and M.F. Jarvis, *2', 3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP and A-317491 are competitive antagonists at a slowly desensitizing chimeric human P2X3 receptor*. Br J Pharmacol, 2003. **140**(1): p. 202-10.
191. King, B.F., A. Townsend-Nicholson, S.S. Wildman, T. Thomas, K.M. Spyer, and G. Burnstock, *Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in Xenopus oocytes*. J Neurosci, 2000. **20**(13): p. 4871-7.
192. Le, K.T., K. Babinski, and P. Seguela, *Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor*. J Neurosci, 1998. **18**(18): p. 7152-9.
193. Guo, C., M. Masin, O.S. Qureshi, and R.D. Murrell-Lagnado, *Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors*. Mol Pharmacol, 2007. **72**(6): p. 1447-56.



194. Khakh, B.S., X.R. Bao, C. Labarca, and H.A. Lester, *Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds*. *Nat Neurosci*, 1999. **2**(4): p. 322-30.
195. Khakh, B.S. and H.A. Lester, *Dynamic selectivity filters in ion channels*. *Neuron*, 1999. **23**(4): p. 653-8.
196. Rassendren, F., G.N. Buell, C. Virginio, G. Collo, R.A. North, and A. Surprenant, *The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(9): p. 5482-6.
197. Steinberg, T.H., A.S. Newman, J.A. Swanson, and S.C. Silverstein, *ATP4-permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(18): p. 8884-8.
198. Pelegrin, P. and A. Surprenant, *Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor*. *Embo J*, 2006. **25**(21): p. 5071-82.
199. Pelegrin, P. and A. Surprenant, *The P2X(7) receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1beta release*. *Purinergic Signal*, 2009. **5**(2): p. 129-37.
200. Longhurst, P.A., T. Schwegel, K. Folander, and R. Swanson, *The human P2x1 receptor: molecular cloning, tissue distribution, and localization to chromosome 17*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1308**(3): p. 185-8.
201. Damer, S., B. Niebel, S. Czeche, P. Nickel, U. Ardanuy, G. Schmalzing, J. Rettinger, E. Mutschler, and G. Lambrecht, *NF279: a novel potent and selective antagonist of P2X receptor-mediated responses*. *Eur J Pharmacol*, 1998. **350**(1): p. R5-6.
202. Braun, K., J. Rettinger, M. Ganso, M. Kassack, C. Hildebrandt, H. Ullmann, P. Nickel, G. Schmalzing, and G. Lambrecht, *NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X1 receptors*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2001. **364**(3): p. 285-90.
203. Valera, S., F. Talabot, R.J. Evans, A. Gos, S.E. Antonarakis, M.A. Morris, and G.N. Buell, *Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder*. *Receptors Channels*, 1995. **3**(4): p. 283-9.
204. Liang, S.X., N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, and W.D. Phillips, *Structure and chromosome location of the mouse P2X(1) purinoceptor gene (P2rx1)*. *Cytogenet Cell Genet*, 2001. **92**(3-4): p. 333-6.
205. Bultmann, R., H. Wittenburg, B. Pause, G. Kurz, P. Nickel, and K. Starke, *P2-purinoceptor antagonists: III. Blockade of P2-purinoceptor subtypes and ectonucleotidases by compounds related to suramin*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1996. **354**(4): p. 498-504.
206. King, B.F., M. Liu, J. Pintor, J. Gualix, M.T. Miras-Portugal, and G. Burnstock, *Diinosine pentaphosphate (IP5I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors*. *Br J Pharmacol*, 1999. **128**(5): p. 981-8.
207. Lynch, K.J., E. Touma, W. Niforatos, K.L. Kage, E.C. Burgard, T. van Biesen, E.A. Kowaluk, and M.F. Jarvis, *Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors*. *Mol Pharmacol*, 1999. **56**(6): p. 1171-81.
208. Koshimizu, T.A., K. Kretschmannova, M.L. He, S. Ueno, A. Tanoue, N. Yanagihara, S.S. Stojilkovic, and G. Tsujimoto, *Carboxyl-terminal splicing*



- enhances physical interactions between the cytoplasmic tails of purinergic P2X receptors.* Mol Pharmacol, 2006. **69**(5): p. 1588-98.
209. Hausmann, R., C. Wolf, C. Rosefort, M. Kassack, and G. Schmalzing, *The suramin derivatives NF770 and NF778 are nanomolar potent antagonists of recombinant rat P2X2 receptors.* Purinergic Signal, 2008. **S1**: p. S19-20.
  210. Garcia-Guzman, M., W. Stuhmer, and F. Soto, *Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor.* Brain Res Mol Brain Res, 1997. **47**(1-2): p. 59-66.
  211. Souslova, V., S. Ravenall, M. Fox, D. Wells, J.N. Wood, and A.N. Akopian, *Structure and chromosomal mapping of the mouse P2X3 gene.* Gene, 1997. **195**(1): p. 101-11.
  212. Ford, K.K., M. Matchett, J.E. Krause, and W. Yu, *The P2X3 antagonist P1, P5-di[inosine-5'] pentaphosphate binds to the desensitized state of the receptor in rat dorsal root ganglion neurons.* J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(1): p. 405-13.
  213. Honore, P., J. Mikusa, B. Bianchi, H. McDonald, J. Cartmell, C. Faltynek, and M.F. Jarvis, *TNP-ATP, a potent P2X3 receptor antagonist, blocks acetic acid-induced abdominal constriction in mice: comparison with reference analgesics.* Pain, 2002. **96**(1-2): p. 99-105.
  214. Hausmann, R., J. Rettinger, Z. Gerevich, S. Meis, M.U. Kassack, P. Illes, G. Lambrecht, and G. Schmalzing, *The suramin analog 4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis (carbonylimino)))tetra-kis-benzenesulfonic acid (NF110) potently blocks P2X3 receptors: subtype selectivity is determined by location of sulfonic acid groups.* Mol Pharmacol, 2006. **69**(6): p. 2058-67.
  215. Garcia-Guzman, M., F. Soto, J.M. Gomez-Hernandez, P.E. Lund, and W. Stuhmer, *Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue.* Mol Pharmacol, 1997. **51**(1): p. 109-18.
  216. Townsend-Nicholson, A., B.F. King, S.S. Wildman, and G. Burnstock, *Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X4 and P2X4a receptors.* Brain Res Mol Brain Res, 1999. **64**(2): p. 246-54.
  217. Cox, J.A., O. Barmina, and M.M. Voigt, *Gene structure, chromosomal localization, cDNA cloning and expression of the mouse ATP-gated ionotropic receptor P2X5 subunit.* Gene, 2001. **270**(1-2): p. 145-52.
  218. Bo, X., L.H. Jiang, H.L. Wilson, M. Kim, G. Burnstock, A. Surprenant, and R.A. North, *Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor.* Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1407-16.
  219. Le, K.T., M. Paquet, D. Nouel, K. Babinski, and P. Seguela, *Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system.* FEBS Lett, 1997. **418**(1-2): p. 195-9.
  220. Nawa, G., T. Urano, T. Tokino, T. Ochi, and Y. Miyoshi, *Cloning and characterization of the murine P2XM receptor gene.* J Hum Genet, 1998. **43**(4): p. 262-7.
  221. Urano, T., H. Nishimori, H. Han, T. Furuhashi, Y. Kimura, Y. Nakamura, and T. Tokino, *Cloning of P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53.* Cancer Res, 1997. **57**(15): p. 3281-7.



222. Chessell, I.P., J. Simon, A.D. Hibell, A.D. Michel, E.A. Barnard, and P.P. Humphrey, *Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor*. FEBS Lett, 1998. **439**(1-2): p. 26-30.
223. Broom, D.C., D.J. Matson, E. Bradshaw, M.E. Buck, R. Meade, S. Coombs, M. Matchett, K.K. Ford, W. Yu, J. Yuan, S.H. Sun, R. Ochoa, J.E. Krause, D.J. Wustrow, and D.N. Cortright, *Characterization of N-(adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-amino-pyrrolidin-1-yl)methyl]-2-chloro-benzamide, a P2X7 antagonist in animal models of pain and inflammation*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **327**(3): p. 620-33.
224. Nelson, D.W., R.J. Gregg, M.E. Kort, A. Perez-Medrano, E.A. Voight, Y. Wang, G. Grayson, M.T. Namovic, D.L. Donnelly-Roberts, W. Niforatos, P. Honore, M.F. Jarvis, C.R. Faltynek, and W.A. Carroll, *Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists*. J Med Chem, 2006. **49**(12): p. 3659-66.
225. Humphreys, B.D., C. Virginio, A. Surprenant, J. Rice, and G.R. Dubyak, *Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(1): p. 22-32.
226. Elssner, A., M. Duncan, M. Gavrilin, and M.D. Wewers, *A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4987-94.
227. Lee, G.E., B.V. Joshi, W. Chen, L.S. Jeong, H.R. Moon, K.A. Jacobson, and Y.C. Kim, *Synthesis and structure-activity relationship studies of tyrosine-based antagonists at the human P2X7 receptor*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(2): p. 571-5.
228. Evans, J.F., *The cysteinyl leukotriene receptors*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **69**(2-3): p. 117-22.
229. Capra, V., S. Ravasi, M.R. Accomazzo, S. Citro, M. Grimoldi, M.P. Abbracchio, and G.E. Rovati, *CysLT1 receptor is a target for extracellular nucleotide-induced heterologous desensitization: a possible feedback mechanism in inflammation*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 23): p. 5625-36.
230. Mamedova, L., V. Capra, M.R. Accomazzo, Z.G. Gao, S. Ferrario, M. Fumagalli, M.P. Abbracchio, G.E. Rovati, and K.A. Jacobson, *CysLT1 leukotriene receptor antagonists inhibit the effects of nucleotides acting at P2Y receptors*. Biochem Pharmacol, 2005. **71**(1-2): p. 115-25.
231. del Rey, A., V. Renigunta, A.H. Dalpke, J. Leipziger, J.E. Matos, B. Robaye, M. Zuzarte, A. Kavelaars, and P.J. Hanley, *Knock-out mice reveal the contributions of P2Y and P2X receptors to nucleotide-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in macrophages*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 35147-55.
232. Coutinho-Silva, R., D.M. Ojcius, D.C. Gorecki, P.M. Persechini, R.C. Bisaggio, A.N. Mendes, J. Marks, G. Burnstock, and P.M. Dunn, *Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages*. Biochem Pharmacol, 2005. **69**(4): p. 641-55.
233. Bar, I., P.J. Guns, J. Metallo, D. Cammarata, F. Wilkin, J.M. Boeynants, H. Bult, and B. Robaye, *Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(3): p. 777-84.



234. Brone, B., D. Moechars, R. Marrannes, M. Mercken, and T. Meert, *P2X currents in peritoneal macrophages of wild type and P2X4 -/- mice*. *Immunol Lett*, 2007. **113**(2): p. 83-9.
235. Kreckler, L.M., T.C. Wan, Z.D. Ge, and J.A. Auchampach, *Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **317**(1): p. 172-80.
236. Chivasa, S., B.K. Ndimba, W.J. Simon, K. Lindsey, and A.R. Slabas, *Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability*. *Plant Cell*, 2005. **17**(11): p. 3019-34.
237. Demidchik, V., Z. Shang, R. Shin, E. Thompson, L. Rubio, A. Laohavisit, J.C. Mortimer, S. Chivasa, A.R. Slabas, B.J. Glover, D.P. Schachtman, S.N. Shabala, and J.M. Davies, *Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca(2+) channels*. *Plant J*, 2009. **58**(6): p. 903-13.
238. Feng, Y.H., X. Li, L. Wang, L. Zhou, and G.I. Gorodeski, *A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(25): p. 17228-37.
239. Feng, Y.H., X. Li, R. Zeng, and G.I. Gorodeski, *Endogenously expressed truncated P2X7 receptor lacking the C-terminus is preferentially upregulated in epithelial cancer cells and fails to mediate ligand-induced pore formation and apoptosis*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2006. **25**(9-11): p. 1271-6.
240. Cheewatrakoolpong, B., H. Gilchrest, J.C. Anthes, and S. Greenfeder, *Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **332**(1): p. 17-27.
241. Mellor, E.A., A. Maekawa, K.F. Austen, and J.A. Boyce, *Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinergic receptor and is expressed by human mast cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(14): p. 7964-9.
242. Lynch, K.R., G.P. O'Neill, Q. Liu, D.S. Im, N. Sawyer, K.M. Metters, N. Coulombe, M. Abramovitz, D.J. Figueroa, Z. Zeng, B.M. Connolly, C. Bai, C.P. Austin, A. Chateaneuf, R. Stocco, G.M. Greig, S. Kargman, S.B. Hooks, E. Hosfield, D.L. Williams, Jr., A.W. Ford-Hutchinson, C.T. Caskey, and J.F. Evans, *Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor*. *Nature*, 1999. **399**(6738): p. 789-93.
243. Sarau, H.M., R.S. Ames, J. Chambers, C. Ellis, N. Elshourbagy, J.J. Foley, D.B. Schmidt, R.M. Muccitelli, O. Jenkins, P.R. Murdock, N.C. Herrity, W. Halsey, G. Sathe, A.I. Muir, P. Nuthulaganti, G.M. Dytko, P.T. Buckley, S. Wilson, D.J. Bergsma, and D.W. Hay, *Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor*. *Mol Pharmacol*, 1999. **56**(3): p. 657-63.
244. Maekawa, A., Y. Kanaoka, B.K. Lam, and K.F. Austen, *Identification in mice of two isoforms of the cysteinyl leukotriene 1 receptor that result from alternative splicing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(5): p. 2256-61.
245. Mollerup, J., S.T. Jorgensen, C. Hougaard, and E.K. Hoffmann, *Identification of a murine cysteinyl leukotriene receptor by expression in Xenopus laevis oocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1517**(3): p. 455-9.



246. Martin, V., N. Sawyer, R. Stocco, D. Unett, M.R. Lerner, M. Abramovitz, and C.D. Funk, *Molecular cloning and functional characterization of murine cysteinyl-leukotriene 1 (CysLT(1)) receptors*. *Biochem Pharmacol*, 2001. **62**(9): p. 1193-200.
247. Ogasawara, H., S. Ishii, T. Yokomizo, T. Kakinuma, M. Komine, K. Tamaki, T. Shimizu, and T. Izumi, *Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors mCysLT1 and mCysLT2: differential pharmacological properties and tissue distribution*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(21): p. 18763-8.
248. Takasaki, J., M. Kamohara, M. Matsumoto, T. Saito, T. Sugimoto, T. Ohishi, H. Ishii, T. Ota, T. Nishikawa, Y. Kawai, Y. Masuho, T. Isogai, Y. Suzuki, S. Sugano, and K. Furuichi, *The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **274**(2): p. 316-22.
249. Heise, C.E., B.F. O'Dowd, D.J. Figueroa, N. Sawyer, T. Nguyen, D.S. Im, R. Stocco, J.N. Bellefeuille, M. Abramovitz, R. Cheng, D.L. Williams, Jr., Z. Zeng, Q. Liu, L. Ma, M.K. Clements, N. Coulombe, Y. Liu, C.P. Austin, S.R. George, G.P. O'Neill, K.M. Metters, K.R. Lynch, and J.F. Evans, *Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(39): p. 30531-6.
250. Hui, Y., G. Yang, H. Galczenski, D.J. Figueroa, C.P. Austin, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, and C.D. Funk, *The murine cysteinyl leukotriene 2 (CysLT2) receptor. cDNA and genomic cloning, alternative splicing, and in vitro characterization*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(50): p. 47489-95.
251. Mellor, E.A., N. Frank, D. Soler, M.R. Hodge, J.M. Lora, K.F. Austen, and J.A. Boyce, *Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT2R) by human mast cells: Functional distinction from CysLT1R*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(20): p. 11589-93.
252. Strausberg, R.L., E.A. Feingold, L.H. Grouse, J.G. Derge, R.D. Klausner, F.S. Collins, L. Wagner, C.M. Shenmen, G.D. Schuler, S.F. Altschul, B. Zeeberg, K.H. Buetow, C.F. Schaefer, N.K. Bhat, R.F. Hopkins, H. Jordan, T. Moore, S.I. Max, J. Wang, F. Hsieh, L. Diatchenko, K. Marusina, A.A. Farmer, G.M. Rubin, L. Hong, M. Stapleton, M.B. Soares, M.F. Bonaldo, T.L. Casavant, T.E. Scheetz, M.J. Brownstein, T.B. Usdin, S. Toshiyuki, P. Carninci, C. Prange, S.S. Raha, N.A. Loquellano, G.J. Peters, R.D. Abramson, S.J. Mullahy, S.A. Bosak, P.J. McEwan, K.J. McKernan, J.A. Malek, P.H. Gunaratne, S. Richards, K.C. Worley, S. Hale, A.M. Garcia, L.J. Gay, S.W. Hulyk, D.K. Villalon, D.M. Muzny, E.J. Sodergren, X. Lu, R.A. Gibbs, J. Fahey, E. Helton, M. Kettelman, A. Madan, S. Rodrigues, A. Sanchez, M. Whiting, A.C. Young, Y. Shevchenko, G.G. Bouffard, R.W. Blakesley, J.W. Touchman, E.D. Green, M.C. Dickson, A.C. Rodriguez, J. Grimwood, J. Schmutz, R.M. Myers, Y.S. Butterfield, M.I. Krzywinski, U. Skalska, D.E. Smailus, A. Schnerch, J.E. Schein, S.J. Jones, and M.A. Marra, *Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(26): p. 16899-903.
253. Blasius, R., R.G. Weber, P. Lichter, and A. Ogilvie, *A novel orphan G protein-coupled receptor primarily expressed in the brain is localized on human chromosomal band 2q21*. *J Neurochem*, 1998. **70**(4): p. 1357-65.
254. Chen, Y., X. Zhang, C. Wang, G. Li, Y. Gu, and L.Y. Huang, *Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3*



- receptors in nociceptive neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16773-8.
255. Narcisse, L., E. Scemes, Y. Zhao, S.C. Lee, and C.F. Brosnan, *The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes*. Glia, 2005. **49**(2): p. 245-58.
256. Dona, F., H. Ulrich, D.S. Persike, I.M. Conceicao, J.P. Blini, E.A. Cavalheiro, and M.J. Fernandes, *Alteration of purinergic P2X4 and P2X7 receptor expression in rats with temporal-lobe epilepsy induced by pilocarpine*. Epilepsy Res, 2009. **83**(2-3): p. 157-67.
257. Fan, J., L.H. Yu, Y. Zhang, X. Ni, B. Ma, and G. Burnstock, *Estrogen altered visceromotor reflex and P2X(3) mRNA expression in a rat model of colitis*. In press Steroids, 2009.
258. Horvath, R.J. and J.A. DeLeo, *Morphine enhances microglial migration through modulation of P2X4 receptor signaling*. J Neurosci, 2009. **29**(4): p. 998-1005.
259. Zandberg, M., W.J. van Son, M.C. Harmsen, and W.W. Bakker, *Infection of human endothelium in vitro by cytomegalovirus causes enhanced expression of purinergic receptors: a potential virus escape mechanism?* Transplantation, 2007. **84**(10): p. 1343-7.
260. Reis, J., *La nucléotidase et sa relation avec la désamination des nucléotides dans le cur et dans le muscle*. Bull Soc Chim Biol, 1934. **16**: p. 385-399.
261. Kalckar, H.M., *Adenylpyrophosphatase and myokinase*. J Biol Chem, 1944. **153**: p. 355-67.
262. Meyerhof, O., *The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation*. J Biol Chem, 1945. **157**: p. 105-19.
263. Komoszynski, M.A., *Comparative studies on animal and plant apyrases (ATP diphosphohydrolase EC 3.6.1.5) with application of immunological techniques and various ATPase inhibitors*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1996. **113**(3): p. 581-91.
264. Sarkis, J.J., A.M. Battastini, E.M. Oliveira, S.S. Frassetto, and R.D. Dias, *ATP diphosphohydrolase: An overview*. Ciência e Cultura, 1995. **47**(3): p. 131-6.
265. Lévesque, S.A., *Développement et caractérisation de nouveaux inhibiteurs de la nucléoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase)*, in *Département de Biologie, Faculté des Sciences*. 2002, Université de Sherbrooke: Sherbrooke. p. 111.
266. LeBel, D., G.G. Poirier, S. Phaneuf, P. St Jean, J.F. Laliberté, and A.R. Beaudoin, *Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas*. J Biol Chem, 1980. **255**(3): p. 1227-33.
267. Miura, Y., K. Hirota, Y. Arai, and K. Yagi, *Purification and partial characterization of adenosine diphosphatase activity in bovine aorta microsomes*. Thromb Res, 1987. **46**(5): p. 685-95.
268. Côté, Y.P., M. Picher, P. St-Jean, R. Béliveau, M. Potier, and A.R. Beaudoin, *Identification and localization of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) in bovine aorta: relevance to vascular tone and platelet aggregation*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1078**(2): p. 187-91.



269. Knowles, A.F., R.E. Isler, and J.F. Reece, *The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes*. Biochim Biophys Acta, 1983. **731**(1): p. 88-96.
270. Yagi, K., N. Kato, M. Shinbo, L.S. Shimba, and Y. Miura, *Purification and characterization of adenosine diphosphatase from human umbilical vessels*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1992. **40**(8): p. 2143-6.
271. Gangadharan, S.P., M. Imai, K.K. Rhyhart, J. Sevigny, S.C. Robson, and M.S. Conte, *Targeting platelet aggregation: CD39 gene transfer augments nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in injured rabbit arteries*. Surgery, 2001. **130**(2): p. 296-303.
272. Beaudoin, A.R., L. Gilbert, P. St-Jean, G. Grondin, and C. Cabana, *Heterogeneity of the zymogen granule membranes in rat pancreas*. Eur J Cell Biol, 1988. **47**(2): p. 233-40.
273. Picher, M., Y.P. Cote, R. Beliveau, M. Potier, and A.R. Beaudoin, *Demonstration of a novel type of ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in the bovine lung*. J Biol Chem, 1993. **268**(7): p. 4699-703.
274. Lin, S.H. and G. Guidotti, *Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. The primary structure of the ecto-ATPase is similar to that of the human biliary glycoprotein I*. J Biol Chem, 1989. **264**(24): p. 14408-14.
275. Plesner, L., *Ecto-ATPases: identities and functions*. Int Rev Cytol, 1995. **158**: p. 141-214.
276. Beeler, T.J., K.S. Gable, and J.M. Keffer, *Characterization of the membrane bound Mg<sup>2+</sup>-ATPase of rat skeletal muscle*. Biochim Biophys Acta, 1983. **734**(2): p. 221-34.
277. Treuheit, M.J., P.L. Vaghy, and T.L. Kirley, *Mg(2+)-ATPase from rabbit skeletal muscle transverse tubules is 67-kilodalton glycoprotein*. J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 11777-82.
278. Zimmermann, H., A.R. Beaudoin, M. Bollen, J.W. Goding, G. Guidotti, T.L. Kirley, S.C. Robson, and K. Sano. *Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface*. In: L. Vanduffel, Editor, *Ecto-ATPases and related ectonucleotidases*. 1999. Diepenbeek, Belgium: Shaker Publishing BV.
279. Zimmermann, H., *Ectonucleotidases: Some recent developments and note on nomenclature*. Drug Dev Res, 2001. **52**: p. 44-56.
280. Laliberté, J.F., P. St-Jean, and A.R. Beaudoin, *Kinetic effects of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on ATP hydrolysis by the purified ATP diphosphohydrolase*. J Biol Chem, 1982. **257**(7): p. 3869-74.
281. Laliberté, J.F. and A.R. Beaudoin, *Sequential hydrolysis of the gamma- and beta-phosphate groups of ATP by the ATP diphosphohydrolase from pig pancreas*. Biochim Biophys Acta, 1983. **742**(1): p. 9-15.
282. Handa, M. and G. Guidotti, *Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (Solanum tuberosum)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(3): p. 916-23.



283. Smith, T.M. and T.L. Kirley, *Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily*. *Biochemistry*, 1999. **38**(1): p. 321-8.
284. Bork, P., C. Sander, and A. Valencia, *An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(16): p. 7290-4.
285. Zebisch, M. and N. Strater, *Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(19): p. 6882-7.
286. Kaczmarek, E., K. Koziak, J. Sévigny, J.B. Siegel, J. Anrather, A.R. Beaudoin, F.H. Bach, and S.C. Robson, *Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(51): p. 33116-22.
287. Maliszewski, C.R., G.J. Delespesse, M.A. Schoenborn, R.J. Armitage, W.C. Fanslow, T. Nakajima, E. Baker, G.R. Sutherland, K. Poindexter, C. Birks, and . *The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization*. *J.Immunol.*, 1994. **153**(8): p. 3574-3583.
288. Sévigny, J., F.P. Lévesque, G. Grondin, and A.R. Beaudoin, *Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1334**(1): p. 73-88.
289. Wang, T.F. and G. Guidotti, *CD39 is an ecto-(Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>)-apyrase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(17): p. 9898-901.
290. Chadwick, B.P. and A.M. Frischauf, *Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes*. *Mamm Genome*, 1997. **8**(9): p. 668-72.
291. Heine, P., N. Braun, A. Heilbronn, and H. Zimmermann, *Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells*. *Eur J Biochem*, 1999. **262**(1): p. 102-7.
292. Mateo, J., T.K. Harden, and J.L. Boyer, *Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase*. *Br J Pharmacol*, 1999. **128**(2): p. 396-402.
293. Vlajkovic, S.M., G.D. Housley, D. Greenwood, and P.R. Thorne, *Evidence for alternative splicing of ecto-ATPase associated with termination of purinergic transmission*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999. **73**(1-2): p. 85-92.
294. Chadwick, B.P. and A.M. Frischauf, *The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from Drosophila melanogaster*. *Genomics*, 1998. **50**(3): p. 357-67.
295. Smith, T.M. and T.L. Kirley, *Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases I*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1386**(1): p. 65-78.
296. Lavoie, E.G., F. Kukulski, S.A. Levesque, J. Lecka, and J. Sevigny, *Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **67**(10): p. 1917-26.
297. Wang, T.F. and G. Guidotti, *Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase*. *J.Biol.Chem.*, 1998. **273**(18): p. 11392-11399.
298. Biederbick, A., C. Kosan, J. Kunz, and H.P. Elsasser, *First apyrase splice variants have different enzymatic properties*. *J.Biol.Chem.*, 2000. **275**(25): p. 19018-19024.



299. Mulero, J.J., G. Yeung, S.T. Nelken, and J.E. Ford, *CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20064-7.
300. Trombetta, E.S. and A. Helenius, *Glycoprotein reglucosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum*. EMBO J, 1999. **18**(12): p. 3282-92.
301. Paez, J.G., J.A. Recio, A. Rouzaut, and V. Notario, *Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD39L4 (ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene*. Int J Oncol, 2001. **19**(6): p. 1249-54.
302. Braun, N., S. Fengler, C. Ebeling, J. Servos, and H. Zimmermann, *Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 3): p. 639-47.
303. Hicks-Berger, C.A., B.P. Chadwick, A.M. Frischauf, and T.L. Kirley, *Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2)*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34041-5.
304. Yeung, G., J.J. Mulero, D.W. McGowan, S.S. Bajwa, and J.E. Ford, *CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart*. Biochemistry, 2000. **39**(42): p. 12916-23.
305. Shi, J.D., T. Kukar, C.Y. Wang, Q.Z. Li, P.E. Cruz, A. Davoodi-Semiromi, P. Yang, Y. Gu, W. Lian, D.H. Wu, and J.X. She, *Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1)*. J.Biol.Chem., 2001. **276**(20): p. 17474-17478.
306. Sévigny, J., S.C. Robson, E. Waelkens, E. Csizmadia, R.N. Smith, and R. Lemmens, *Identification and characterization of a novel hepatic canalicular ATP diphosphohydrolase*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5640-7.
307. Bigonnesse, F., S.A. Lévesque, F. Kukulski, J. Lecka, S.C. Robson, M.J. Fernandes, and J. Sévigny, *Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8*. Biochemistry, 2004. **43**(18): p. 5511-9.
308. Fausther, M., J. Lecka, F. Kukulski, S.A. Lévesque, J. Pelletier, H. Zimmermann, J.A. Dranoff, and J. Sévigny, *Cloning, purification and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8*. Am J Physiol Gastroenterol liver physiol, 2007. **292**: p. G785-G795.
309. Wang, T.F., Y. Ou, and G. Guidotti, *The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24814-21.
310. Zimmermann, H., *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 299-309.
311. Murphy, D.M. and T.L. Kirley, *Asparagine 81, an invariant glycosylation site near apyrase conserved region 1, is essential for full enzymatic activity of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3*. Arch Biochem Biophys, 2003. **413**(1): p. 107-15.
312. Schulte am Esch, J., 2nd, J. Sévigny, E. Kaczmarek, J.B. Siegel, M. Imai, K. Koziak, A.R. Beaudoin, and S.C. Robson, *Structural elements and limited*



- proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity.* Biochemistry, 1999. **38**(8): p. 2248-58.
313. Javed, R., K. Yarimizu, N. Pelletier, C. Li, and A.F. Knowles, *Mutagenesis of lysine 62, asparagine 64, and conserved region 1 reduces the activity of human ecto-ATPase (NTPDase 2).* Biochemistry, 2007. **46**(22): p. 6617-27.
314. Grinthal, A. and G. Guidotti, *CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why?* Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 391-8.
315. Chiang, W.C. and A.F. Knowles, *Transmembrane domain interactions affect the stability of the extracellular domain of the human NTPDase 2.* Arch Biochem Biophys, 2008. **472**(2): p. 89-99.
316. Grinthal, A. and G. Guidotti, *Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras.* Biochemistry, 2002. **41**(6): p. 1947-56.
317. Papanikolaou, A., A. Papafotika, C. Murphy, T. Papamarcaki, O. Tsolas, M. Drab, T.V. Kurzchalia, M. Kasper, and S. Christoforidis, *Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39.* J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26406-14.
318. Stout, J.G. and T.L. Kirley, *Control of cell membrane ecto-ATPase by oligomerization state: intermolecular cross-linking modulates ATPase activity.* Biochemistry, 1996. **35**(25): p. 8289-98.
319. Smith, T.M. and T.L. Kirley, *Glycosylation is essential for functional expression of a human brain ecto-apyrase.* Biochemistry, 1999. **38**(5): p. 1509-16.
320. Christoforidis, S., T. Papamarcaki, and O. Tsolas, *Human placental ATP diphosphohydrolase is a highly N-glycosylated plasma membrane enzyme.* Biochim Biophys Acta, 1996. **1282**(2): p. 257-62.
321. Koziak, K., E. Kaczmarek, A. Kittel, J. Sévigny, J.K. Blusztajn, J. Schulte Am Esch, 2nd, M. Imai, O. Guckelberger, C. Goepfert, I. Qawi, and S.C. Robson, *Palmitoylation targets CD39/endothelial ATP diphosphohydrolase to caveolae.* J Biol Chem, 2000. **275**(3): p. 2057-62.
322. Robson, S.C., E. Kaczmarek, J.B. Siegel, D. Candinas, K. Koziak, M. Millan, W.W. Hancock, and F.H. Bach, *Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation.* J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 153-63.
323. Zimmermann, H., N. Braun, B. Kegel, and P. Heine, *New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system.* Neurochem Int, 1998. **32**(5-6): p. 421-5.
324. Basu, S. and T.L. Kirley, *Identification of a tyrosine residue responsible for N-acetylimidazole-induced increase of activity of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3.* Purinergic Signal, 2005. **1**(3): p. 271-80.
325. Lemmens, R., L. Vanduffel, A. Kittel, A.R. Beaudoin, O. Benrezzak, and J. Sevigny, *Distribution, cloning, and characterization of porcine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-I.* Eur J Biochem, 2000. **267**(13): p. 4106-14.
326. Matsumoto, M., Y. Sakurai, T. Kokubo, H. Yagi, K. Makita, T. Matsui, K. Titani, Y. Fujimura, and N. Narita, *The cDNA cloning of human placental ecto-ATP diphosphohydrolases I and II.* FEBS Lett, 1999. **453**(3): p. 335-40.



327. Wang, C.J., S.M. Vlajkovic, G.D. Housley, N. Braun, H. Zimmermann, S.C. Robson, J. Sévigny, C. Soeller, and P.R. Thorne, *C-terminal splicing of NTPDase2 provides distinctive catalytic properties, cellular distribution and enzyme regulation*. *Biochem J*, 2005. **385**(Pt 3): p. 729-36.
328. Mateo, J., S. Kreda, C.E. Henry, T.K. Harden, and J.L. Boyer, *Requirement of Cys399 for processing of the human ecto-ATPase (NTPDase2) and its implications for determination of the activities of splice variants of the enzyme*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(41): p. 39960-8.
329. Crawford, P.A., K.J. Gaddie, T.M. Smith, and T.L. Kirley, *Characterization of an alternative splice variant of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): a possible modulator of nucleotidase activity and purinergic signaling*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **457**(1): p. 7-15.
330. Munkonda, M.N., J. Pelletier, V.V. Ivanenkov, M. Fausther, A. Tremblay, B. Kunzli, T.L. Kirley, and J. Sévigny, *Characterization of a monoclonal antibody as the first specific inhibitor of human NTP diphosphohydrolase-3 : partial characterization of the inhibitory epitope and potential applications*. *FEBS J*, 2009. **276**(2): p. 479-96.
331. Dzhandzhugazyan, K.N., A.F. Kirkin, S.P. thor, and J. Zeuthen, *Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas*. *FEBS Lett.*, 1998. **430**(3): p. 227-30.
332. Lu, W., D. Reigada, J. Sévigny, and C.H. Mitchell, *Stimulation of the P2Y1 receptor up-regulates nucleoside-triphosphate diphosphohydrolase-1 in human retinal pigment epithelial cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **323**(1): p. 157-64.
333. Kapojos, J.J., A. van den Berg, T. Borghuis, B. Banas, S. Huitema, K. Poelstra, and W.W. Bakker, *Enhanced ecto-apyrase activity of stimulated endothelial or mesangial cells is downregulated by glucocorticoids in vitro*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **501**(1-3): p. 191-8.
334. Gao, L., L. Dong, and J.P. Whitlock, Jr., *A novel response to dioxin. Induction of ecto-ATPase gene expression*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(25): p. 15358-65.
335. Gao, L. and J.P. Whitlock, Jr., *Accessibility and activity of the promoter for a dioxin-inducible ecto-ATPase gene*. *Arch Biochem Biophys*, 2001. **392**(2): p. 270-8.
336. Lu, Q., L.D. Porter, X. Cui, and B.M. Sanborn, *Ecto-ATPase mRNA is regulated by FSH in Sertoli cells*. *J Androl*, 2001. **22**(2): p. 289-301.
337. Yu, J., E.G. Lavoie, N. Sheung, J.J. Tremblay, J. Sévigny, and J.A. Dranoff, *IL-6 downregulates transcription of NTPDase2 via specific promoter elements*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(3): p. G748-56.
338. Enjyoji, K., J. Sévigny, Y. Lin, P.S. Frenette, P.D. Christie, J.S. Esch, 2nd, M. Imai, J.M. Edelberg, H. Rayburn, M. Lech, D.L. Beeler, E. Csizmadia, D.D. Wagner, S.C. Robson, and R.D. Rosenberg, *Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation*. *Nat Med*, 1999. **5**(9): p. 1010-7.
339. Pinsky, D.J., M.J. Broekman, J.J. Peschon, K.L. Stocking, T. Fujita, R. Ramasamy, E.S. Connolly, Jr., J. Huang, S. Kiss, Y. Zhang, T.F. Choudhri, R.A. McTaggart, H. Liao, J.H. Drosopoulos, V.L. Price, A.J. Marcus, and C.R. Maliszewski, *Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(8): p. 1031-40.



340. Kauffenstein, G., C.R. Fürstenau, P. D'Orléans-Juste, and J. Sévigny, *NTPDase1 distinctly regulates P2Y1 and P2Y2 receptor-dependent vasorelaxation*. soumis à Br J Pharmacol, 2009.
341. Faria, M., T. Magalhaes-Cardoso, J.M. Lafuente-de-Carvalho, and P. Correia-de Sa, *Decreased ecto-NTPDase1/CD39 activity leads to desensitization of P2 purinoceptors regulating tonus of corpora cavernosa in impotent men with endothelial dysfunction*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2008. **27**(6): p. 761-8.
342. Kauffenstein, G., A. Drouin, N. Thorin-Trescases, H. Bachelard, B. Robaye, P. D'Orleans-Juste, F. Marceau, E. Thorin, and J. Sevigny, *NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse*. Sous presse dans Cardiovasc Res, 2009.
343. Sévigny, J., C. Sundberg, N. Braun, O. Guckelberger, E. Csizmadia, I. Qawi, M. Imai, H. Zimmermann, and S.C. Robson, *Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2801-9.
344. Munkonda, M.N., G. Kauffenstein, F. Kukulski, S.A. Lévesque, C. Legendre, J. Pelletier, E.G. Lavoie, J. Lecka, and J. Sévigny, *Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists*. Biochem Pharmacol, 2007. **74**(10): p. 1524-34.
345. Wu, Y., X. Sun, E. Kaczmarek, K.M. Dwyer, E. Bianchi, A. Usheva, and S.C. Robson, *RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity*. Biochem J, 2006. **396**(1): p. 23-30.
346. Jansen, S., C. Stefan, J.W. Creemers, E. Waelkens, A. Van Eynde, W. Stalmans, and M. Bollen, *Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 14): p. 3081-9.
347. Clair, T., H.Y. Lee, L.A. Liotta, and M.L. Stracke, *Autotaxin is an exoenzyme possessing 5'-nucleotide phosphodiesterase/ATP pyrophosphatase and ATPase activities*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 996-1001.
348. Wojcik, M., M. Cieslak, W.J. Stec, J.W. Goding, and M. Koziolkiewicz, *Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 is responsible for degradation of antisense phosphorothioate oligonucleotides*. Oligonucleotides, 2007. **17**(1): p. 134-45.
349. Cimpean, A., C. Stefan, R. Gijsbers, W. Stalmans, and M. Bollen, *Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2*. Biochem J, 2004. **381**(Pt 1): p. 71-7.
350. Gijsbers, R., J. Aoki, H. Arai, and M. Bollen, *The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site*. FEBS Lett, 2003. **538**(1-3): p. 60-4.
351. Buckley, M.F., K.A. Loveland, W.J. McKinstry, O.M. Garson, and J.W. Goding, *Plasma cell membrane glycoprotein PC-1. cDNA cloning of the human molecule, amino acid sequence, and chromosomal location*. J Biol Chem, 1990. **265**(29): p. 17506-11.



352. van Driel, I.R., A.F. Wilks, G.A. Pietersz, and J.W. Goding, *Murine plasma cell membrane antigen PC-1: molecular cloning of cDNA and analysis of expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(24): p. 8619-23.
353. Belli, S.I. and J.W. Goding, *Biochemical characterization of human PC-1, an enzyme possessing alkaline phosphodiesterase I and nucleotide pyrophosphatase activities*. Eur J Biochem, 1994. **226**(2): p. 433-43.
354. Piao, J.H., Y. Matsuda, H. Nakamura, and K. Sano, *Assignment of Pdnp2, the gene encoding phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase 2, to mouse chromosome 15D2*. Cytogenet Cell Genet, 1999. **87**(3-4): p. 172-4.
355. Murata, J., H.Y. Lee, T. Clair, H.C. Krutzsch, A.A. Arestad, M.E. Sobel, L.A. Liotta, and M.L. Stracke, *cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases*. J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30479-84.
356. Jin-Hua, P., J.W. Goding, H. Nakamura, and K. Sano, *Molecular cloning and chromosomal localization of PD-Ibeta (PDNP3), a new member of the human phosphodiesterase I genes*. Genomics, 1997. **45**(2): p. 412-5.
357. Andrade, C.M., M.R. Wink, R. Margis, R. Borojevic, A.M. Battastini, and F.C. Guma, *Activity and expression of ecto-nucleotide pyrophosphate/phosphodiesterases in a hepatic stellate cell line*. Mol Cell Biochem, 2009. **325**(1-2): p. 179-85.
358. Gijsbers, R., H. Ceulemans, W. Stalmans, and M. Bollen, *Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1361-8.
359. Sakagami, H., J. Aoki, Y. Natori, K. Nishikawa, Y. Kakehi, and H. Arai, *Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 23084-93.
360. Duan, R.D., T. Bergman, N. Xu, J. Wu, Y. Cheng, J. Duan, S. Nelander, C. Palmberg, and A. Nilsson, *Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to the nucleotide phosphodiesterase family*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38528-36.
361. Goding, J.W., B. Grobbs, and H. Slegers, *Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1638**(1): p. 1-19.
362. Misumi, Y., S. Ogata, K. Ohkubo, S. Hirose, and Y. Ikehara, *Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form*. Eur J Biochem, 1990. **191**(3): p. 563-9.
363. Martinez-Martinez, A., E. Munoz-Delgado, F.J. Campoy, C. Flores-Flores, J.N. Rodriguez-Lopez, C. Fini, and C.J. Vidal, *The ecto-5'-nucleotidase subunits in dimers are not linked by disulfide bridges but by non-covalent bonds*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1478**(2): p. 300-8.
364. Resta, R., S.W. Hooker, K.R. Hansen, A.B. Laurent, J.L. Park, M.R. Blackburn, T.B. Knudsen, and L.F. Thompson, *Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution*. Gene, 1993. **133**(2): p. 171-7.



365. Hashikawa, T., M. Takedachi, M. Terakura, T. Saho, S. Yamada, L.F. Thompson, Y. Shimabukuro, and S. Murakami, *Involvement of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in adenosine generation by human gingival fibroblasts*. J Dent Res, 2003. **82**(11): p. 888-92.
366. Picher, M., L.H. Burch, A.J. Hirsh, J. Spychala, and R.C. Boucher, *Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 13468-79.
367. Airas, L., J. Niemela, M. Salmi, T. Puurunen, D.J. Smith, and S. Jalkanen, *Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells*. J Cell Biol, 1997. **136**(2): p. 421-31.
368. Eltzschig, H.K., L.F. Thompson, J. Karhausen, R.J. Cotta, J.C. Ibla, S.C. Robson, and S.P. Colgan, *Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism*. Blood, 2004. **104**(13): p. 3986-92.
369. Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson, *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
370. Colgan, S.P., H.K. Eltzschig, T. Eckle, and L.F. Thompson, *Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73)*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 351-60.
371. Naito, Y. and K. Tsushima, *Alkaline phosphatase of chicken liver microsomes. II. Activity with AMP and other substrates*. Biochim Biophys Acta, 1973. **327**(2): p. 398-404.
372. Millan, J.L., *Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 335-41.
373. Zimmermann, H., *Prostatic acid phosphatase, a neglected ectonucleotidase*. Purinergic Signal, 2009. **5**(3): p. 273-5.
374. Clark, H.F., A.L. Gurney, E. Abaya, K. Baker, D. Baldwin, J. Brush, J. Chen, B. Chow, C. Chui, C. Crowley, B. Currell, B. Deuel, P. Dowd, D. Eaton, J. Foster, C. Grimaldi, Q. Gu, P.E. Hass, S. Heldens, A. Huang, H.S. Kim, L. Klimowski, Y. Jin, S. Johnson, J. Lee, L. Lewis, D. Liao, M. Mark, E. Robbie, C. Sanchez, J. Schoenfeld, S. Seshagiri, L. Simmons, J. Singh, V. Smith, J. Stinson, A. Vagts, R. Vandlen, C. Watanabe, D. Wieand, K. Woods, M.H. Xie, D. Yansura, S. Yi, G. Yu, J. Yuan, M. Zhang, Z. Zhang, A. Goddard, W.I. Wood, P. Godowski, and A. Gray, *The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment*. Genome Res, 2003. **13**(10): p. 2265-70.
375. Kawai, J., A. Shinagawa, K. Shibata, M. Yoshino, M. Itoh, Y. Ishii, T. Arakawa, A. Hara, Y. Fukunishi, H. Konno, J. Adachi, S. Fukuda, K. Aizawa, M. Izawa, K. Nishi, H. Kiyosawa, S. Kondo, I. Yamanaka, T. Saito, Y. Okazaki, T. Gojobori, H. Bono, T. Kasukawa, R. Saito, K. Kadota, H. Matsuda, M. Ashburner, S. Batalov, T. Casavant, W. Fleischmann, T. Gaasterland, C. Gissi, B. King, H. Kochiwa, P. Kuehl, S. Lewis, Y. Matsuo, I. Nikaido, G. Pesole, J. Quackenbush, L.M. Schriml,



- F. Staubli, R. Suzuki, M. Tomita, L. Wagner, T. Washio, K. Sakai, T. Okido, M. Furuno, H. Aono, R. Baldarelli, G. Barsh, J. Blake, D. Boffelli, N. Bojunga, P. Carninci, M.F. de Bonaldo, M.J. Brownstein, C. Bult, C. Fletcher, M. Fujita, M. Gariboldi, S. Gustincich, D. Hill, M. Hofmann, D.A. Hume, M. Kamiya, N.H. Lee, P. Lyons, L. Marchionni, J. Mashima, J. Mazzairelli, P. Mombaerts, P. Nordone, B. Ring, M. Ringwald, I. Rodriguez, N. Sakamoto, H. Sasaki, K. Sato, C. Schonbach, T. Seya, Y. Shibata, K.F. Storch, H. Suzuki, K. Toyo-oka, K.H. Wang, C. Weitz, C. Whittaker, L. Wilming, A. Wynshaw-Boris, K. Yoshida, Y. Hasegawa, H. Kawaji, S. Kohtsuki, and Y. Hayashizaki, *Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection*. *Nature*, 2001. **409**(6821): p. 685-90.
376. Quintero, I.B., C.L. Araujo, A.E. Pulkka, R.S. Wirkkala, A.M. Herrala, E.L. Eskelinen, E. Jokitalo, P.A. Hellstrom, H.J. Tuominen, P.P. Hirvikoski, and P.T. Vihko, *Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target*. *Cancer Res*, 2007. **67**(14): p. 6549-54.
377. Zylka, M.J., N.A. Sowa, B. Taylor-Blake, M.A. Twomey, A. Herrala, V. Voikar, and P. Vihko, *Prostatic acid phosphatase is an ectonucleotidase and suppresses pain by generating adenosine*. *Neuron*, 2008. **60**(1): p. 111-22.
378. Silverman, J.D. and L. Kruger, *Acid phosphatase as a selective marker for a class of small sensory ganglion cells in several mammals: spinal cord distribution, histochemical properties, and relation to fluoride-resistant acid phosphatase (FRAP) of rodents*. *Somatosens Res*, 1988. **5**(3): p. 219-46.
379. Sanyal, S. and A. Rustioni, *Phosphatases in the substantia gelatinosa and motoneurons: a comparative histochemical study*. *Brain Res*, 1974. **76**(1): p. 161-6.
380. Smith, T.M. and T.L. Kirley, *The calcium activated nucleotidases: A diverse family of soluble and membrane associated nucleotide hydrolyzing enzymes*. *Purinergic Signal*, 2006. **2**(2): p. 327-33.
381. Failer, B.U., N. Braun, and H. Zimmermann, *Cloning, expression, and functional characterization of a Ca(2+)-dependent endoplasmic reticulum nucleoside diphosphatase*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(40): p. 36978-86.
382. Smith, T.M., C.A. Hicks-Berger, S. Kim, and T.L. Kirley, *Cloning, expression, and characterization of a soluble calcium-activated nucleotidase, a human enzyme belonging to a new family of extracellular nucleotidases*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **406**(1): p. 105-15.
383. Hasko, G., D.G. Kuhel, Z.H. Nemeth, J.G. Mabley, R.F. Stachlewitz, L. Virag, Z. Lohinai, G.J. Southan, A.L. Salzman, and C. Szabo, *Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 1013-9.
384. Gomez, G. and M.V. Sitkovsky, *Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo*. *Blood*, 2003. **102**(13): p. 4472-8.
385. Gelain, D.P., L.F. De Souza, G.R. Ribeiro, M. Zim, F.R. Jardim, J.C. Moreira, and E.A. Bernard, *Extracellular inosine is modulated by H2O2 and protects sertoli cells against lipoperoxidation and cellular injury*. *Free Radic Res*, 2004. **38**(1): p. 37-47.



386. Naydenova, Z., J.B. Rose, and I.R. Coe, *Inosine and equilibrative nucleoside transporter 2 contribute to hypoxic preconditioning in the murine cardiomyocyte HL-1 cell line*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(6): p. H2687-92.
387. Fredholm, B.B., E. Irenius, B. Kull, and G. Schulte, *Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells*. *Biochem Pharmacol*, 2001. **61**(4): p. 443-8.
388. Jin, X., R.K. Shepherd, B.R. Duling, and J. Linden, *Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(11): p. 2849-57.
389. Hashikawa, T., S.W. Hooker, J.G. Maj, C.J. Knott-Craig, M. Takedachi, S. Murakami, and L.F. Thompson, *Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase*. *FASEB J*, 2004. **18**(1): p. 131-3.
390. Kemeny-Beke, A., A. Jakab, J. Zsuga, M. Vecsernyes, D. Karsai, F. Pasztor, M. Grenzner, A.J. Szentmiklosi, A. Berta, and R. Gesztelyi, *Adenosine deaminase inhibition enhances the inotropic response mediated by A1 adenosine receptor in hyperthyroid guinea pig atrium*. *Pharmacol Res*, 2007. **56**(2): p. 124-31.
391. Rathbone, M., L. Pilutti, F. Caciagli, and S. Jiang, *Neurotrophic effects of extracellular guanosine*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008. **27**(6): p. 666-72.
392. Abbracchio, M. and S. Ceruti, *P1 receptors and cytokine secretion*. *Purinergic Signal*, 2007. **3**(1-2): p. 13-25.
393. Gessi, S., S. Merighi, K. Varani, E. Leung, S. Mac Lennan, and P.A. Borea, *The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology*. *Pharmacol Ther*, 2008. **117**(1): p. 123-40.
394. Hasko, G., J. Linden, B. Cronstein, and P. Pacher, *Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(9): p. 759-70.
395. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. *Pharmacol Rev*, 1998. **50**(3): p. 413-92
396. Eltzschig, H.K., J.C. Ibla, G.T. Furuta, M.O. Leonard, K.A. Jacobson, K. Enjyoji, S.C. Robson, and S.P. Colgan, *Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors*. *J Exp Med*, 2003. **198**(5): p. 783-96.
397. Bilkei-Gorzo, A., O.M. Abo-Salem, A.M. Hayallah, K. Michel, C.E. Muller, and A. Zimmer, *Adenosine receptor subtype-selective antagonists in inflammation and hyperalgesia*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008. **377**(1): p. 65-76.
398. Lohse, M.J., K.N. Klotz, U. Schwabe, G. Cristalli, S. Vittori, and M. Grifantini, *2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A1 adenosine receptors*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1988. **337**(6): p. 687-9.
399. Tatsis-Kotsidis, I. and B.F. Erlanger, *A1 adenosine receptor of human and mouse adipose tissues: cloning, expression, and characterization*. *Biochem Pharmacol*, 1999. **58**(8): p. 1269-77.
400. Libert, F., J. Van Sande, A. Lefort, A. Czernilofsky, J.E. Dumont, G. Vassart, H.A. Ensinger, and K.D. Mendla, *Cloning and functional characterization of a human A1 adenosine receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **187**(2): p. 919-26.



401. Townsend-Nicholson, A. and J. Shine, *Molecular cloning and characterisation of a human brain A1 adenosine receptor cDNA*. Brain Res Mol Brain Res, 1992. **16**(3-4): p. 365-70.
402. Libert, F., E. Passage, M. Parmentier, M.J. Simons, G. Vassart, and M.G. Mattei, *Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor*. Genomics, 1991. **11**(1): p. 225-7.
403. Shimada, J., F. Suzuki, H. Nonaka, and A. Ishii, *8-Polycycloalkyl-1,3-dipropylxanthines as potent and selective antagonists for A1-adenosine receptors*. J Med Chem, 1992. **35**(5): p. 924-30.
404. Lee, K.S. and M. Reddington, *1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX) inhibition of [3H]N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) binding allows the visualization of putative non-A1 adenosine receptors*. Brain Res, 1986. **368**(2): p. 394-8.
405. Ongini, E., S. Dionisotti, S. Gessi, E. Irenius, and B.B. Fredholm, *Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999. **359**(1): p. 7-10.
406. Kalk, P., B. Eggert, K. Relle, M. Godes, S. Heiden, Y. Sharkovska, Y. Fischer, D. Ziegler, G.W. Bielenberg, and B. Hofer, *The adenosine A1 receptor antagonist SLV320 reduces myocardial fibrosis in rats with 5/6 nephrectomy without affecting blood pressure*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(7): p. 1025-32.
407. Fredholm, B.B., *Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine*. Pharmacol Toxicol, 1995. **76**(2): p. 93-101.
408. Marquardt, D.L., L.L. Walker, and S. Heinemann, *Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells*. J Immunol, 1994. **152**(9): p. 4508-15.
409. Le, F., A. Townsend-Nicholson, E. Baker, G.R. Sutherland, and P.R. Schofield, *Characterization and chromosomal localization of the human A2a adenosine receptor gene: ADORA2A*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **223**(2): p. 461-7.
410. Furlong, T.J., K.D. Pierce, L.A. Selbie, and J. Shine, *Molecular characterization of a human brain adenosine A2 receptor*. Brain Res Mol Brain Res, 1992. **15**(1-2): p. 62-6.
411. Hockemeyer, J., J.C. Burbiel, and C.E. Muller, *Multigram-scale syntheses, stability, and photoreactions of A2A adenosine receptor antagonists with 8-styrylxanthine structure: potential drugs for Parkinson's disease*. J Org Chem, 2004. **69**(10): p. 3308-18.
412. Pierce, K.D., T.J. Furlong, L.A. Selbie, and J. Shine, *Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **187**(1): p. 86-93.
413. Rivkees, S.A. and S.M. Reppert, *RFL9 encodes an A2b-adenosine receptor*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(10): p. 1598-604.
414. Jacobson, M.A., R.G. Johnson, C.J. Luneau, and C.A. Salvatore, *Cloning and chromosomal localization of the human A2b adenosine receptor gene (ADORA2B) and its pseudogene*. Genomics, 1995. **27**(2): p. 374-6.
415. Wilkie, T.M., Y. Chen, D.J. Gilbert, K.J. Moore, L. Yu, M.I. Simon, N.G. Copeland, and N.A. Jenkins, *Identification, chromosomal location, and genome*



- organization of mammalian G-protein-coupled receptors*. Genomics, 1993. **18**(2): p. 175-84.
416. Zhao, Z., S. Ravid, and K. Ravid, *Chromosomal mapping of the mouse A3 adenosine receptor gene, Adora3*. Genomics, 1995. **30**(1): p. 118-9.
417. Sajjadi, F.G. and G.S. Firestein, *cDNA cloning and sequence analysis of the human A3 adenosine receptor*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1179**(1): p. 105-7.
418. Salvatore, C.A., M.A. Jacobson, H.E. Taylor, J. Linden, and R.G. Johnson, *Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10365-9.
419. Atkinson, M.R., A. Townsend-Nicholson, J.K. Nicholl, G.R. Sutherland, and P.R. Schofield, *Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A3 receptor (ADORA3) gene*. Neurosci Res, 1997. **29**(1): p. 73-9.
420. Bender, E., A. Buist, M. Jurzak, X. Langlois, G. Baggerman, P. Verhasselt, M. Ercken, H.Q. Guo, C. Wintolders, I. Van den Wyngaert, I. Van Oers, L. Schoofs, and W. Luyten, *Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8573-8.
421. Matthews, E.A. and A.H. Dickenson, *Effects of spinally administered adenine on dorsal horn neuronal responses in a rat model of inflammation*. Neurosci Lett, 2004. **356**(3): p. 211-4.
422. von Kugelgen, I., A.C. Schiedel, K. Hoffmann, B.B. Alsdorf, A. Abdelrahman, and C.E. Muller, *Cloning and functional expression of a novel Gi protein-coupled receptor for adenine from mouse brain*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(2): p. 469-77.
423. Slominska, E.M., M. Szolkiewicz, R.T. Smolenski, B. Rutkowski, and J. Swierczynski, *High plasma adenine concentration in chronic renal failure and its relation to erythrocyte ATP*. Nephron, 2002. **91**(2): p. 286-91.
424. Borrmann, T., A. Abdelrahman, R. Volpini, C. Lambertucci, E. Alksnis, S. Gorzalka, M. Knospe, A.C. Schiedel, G. Cristalli, and C.E. Muller, *Structure-activity relationships of adenine and deazaadenine derivatives as ligands for adenine receptors, a new purinergic receptor family*. J Med Chem, 2009. **52**(19): p. 5974-89.
425. Hagberg, H., P. Andersson, J. Lacarewicz, I. Jacobson, S. Butcher, and M. Sandberg, *Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia*. J Neurochem, 1987. **49**(1): p. 227-31.
426. Franco, R., A. Valenzuela, C. Lluís, and J. Blanco, *Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes*. Immunol Rev, 1998. **161**: p. 27-42.
427. Wiginton, D.A., D.J. Kaplan, J.C. States, A.L. Akeson, C.M. Perme, I.J. Bilyk, A.J. Vaughn, D.L. Lattier, and J.J. Hutton, *Complete sequence and structure of the gene for human adenosine deaminase*. Biochemistry, 1986. **25**(25): p. 8234-44.
428. Zavialov, A.V. and A. Engstrom, *Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity*. Biochem J, 2005. **391**(Pt 1): p. 51-7.
429. Muraoka, T., T. Katsuramaki, H. Shiraishi, and M.M. Yokoyama, *Automated enzymatic measurement of adenosine deaminase isoenzyme activities in serum*. Anal Biochem, 1990. **187**(2): p. 268-72.



430. Pacheco, R., J.M. Martinez-Navio, M. Lejeune, N. Climent, H. Oliva, J.M. Gatell, T. Gallart, J. Mallol, C. Lluís, and R. Franco, *CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9583-8.
431. Skolnick, P., Y. Nimitkitpaisan, L. Stalvey, and J.W. Daly, *Inhibition of brain adenosine deaminase by 2'-deoxycoformycin and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine*. J Neurochem, 1978. **30**(6): p. 1479-82.
432. Conlon, B.A. and W.R. Law, *Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(1): p. 14-20.
433. Aghaei, M., F. Karami-Tehrani, S. Salami, and M. Atri, *Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: the assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities*. Clin Biochem, 2005. **38**(10): p. 887-91.
434. Blackburn, M.R. and R.E. Kellems, *Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation*. Adv Immunol, 2005. **86**: p. 1-41.
435. van Waeg, G. and G. Van den Berghe, *Purine catabolism in polymorphonuclear neutrophils. Phorbol myristate acetate-induced accumulation of adenosine owing to inactivation of extracellularly released adenosine deaminase*. J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 305-12.
436. Desrosiers, M.D., K.M. Cembrola, M.J. Fakir, L.A. Stephens, F.M. Jama, A. Shameli, W.Z. Mehal, P. Santamaria, and Y. Shi, *Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation*. J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1884-92.
437. Zamzow, C.R., W. Xiong, and F.E. Parkinson, *Adenosine produced by neurons is metabolized to hypoxanthine by astrocytes*. J Neurosci Res, 2008. **86**(15): p. 3447-55.
438. Ward, J.L., A. Sherali, Z.P. Mo, and C.M. Tse, *Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. ENT2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8375-81.
439. Yao, S.Y., A.M. Ng, W.R. Muzyka, M. Griffiths, C.E. Cass, S.A. Baldwin, and J.D. Young, *Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28423-30.
440. Kiss, A., K. Farah, J. Kim, R.J. Garriock, T.A. Drysdale, and J.R. Hammond, *Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain*. Biochem J, 2000. **352 Pt 2**: p. 363-72.
441. Acimovic, Y. and I.R. Coe, *Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes*. Mol Biol Evol, 2002. **19**(12): p. 2199-210.
442. Hyde, R.J., C.E. Cass, J.D. Young, and S.A. Baldwin, *The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of*



- structure/function relationships and the identification of novel isoforms.* Mol Membr Biol, 2001. **18**(1): p. 53-63.
443. Lu, H., C. Chen, and C. Klaassen, *Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice.* Drug Metab Dispos, 2004. **32**(12): p. 1455-61.
444. Sundaram, M., S.Y. Yao, J.C. Ingram, Z.A. Berry, F. Abidi, C.E. Cass, S.A. Baldwin, and J.D. Young, *Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs.* J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45270-5.
445. Barnes, K., H. Dobrzynski, S. Foppolo, P.R. Beal, F. Ismat, E.R. Scullion, L. Sun, J. Tellez, M.W. Ritzel, W.C. Claycomb, C.E. Cass, J.D. Young, R. Billeter-Clark, M.R. Boyett, and S.A. Baldwin, *Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH.* Circ Res, 2006. **99**(5): p. 510-9.
446. Pastor-Anglada, M., F.J. Casado, R. Valdes, J. Mata, J. Garcia-Manteiga, and M. Molina, *Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells.* Mol Membr Biol, 2001. **18**(1): p. 81-5.
447. Soler, C., A. Felipe, J.F. Mata, F.J. Casado, A. Celada, and M. Pastor-Anglada, *Regulation of nucleoside transport by lipopolysaccharide, phorbol esters, and tumor necrosis factor-alpha in human B-lymphocytes.* J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26939-45.
448. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 229-65.
449. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
450. Matzinger, P., *An innate sense of danger.* Ann N Y Acad Sci, 2002. **961**: p. 341-2.
451. Taylor, P.R., L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H.H. Lin, G.D. Brown, and S. Gordon, *Macrophage receptors and immune recognition.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 901-44.
452. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
453. Di Virgilio, F., *Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells.* Purinergic Signal, 2005. **1**(3): p. 205-9.
454. Wang, L., L. Karlsson, S. Moses, A. Hultgardh-Nilsson, M. Andersson, C. Borna, T. Gudbjartsson, S. Jern, and D. Erlinge, *P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells.* J Cardiovasc Pharmacol, 2002. **40**(6): p. 841-53.
455. Meshki, J., F. Tuluc, O. Bredeteau, Z. Ding, and S.P. Kunapuli, *Molecular mechanism of nucleotide-induced primary granule release in human neutrophils: role for the P2Y2 receptor.* Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(2): p. C264-71.
456. Celsus, A.C., *De Medicina -traité de médecine de Celse.* 1838, Paris: M. Gautret.
457. Virchow, R., *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre.* 1858.
458. Russo-Marie, F., A. Peltier, and B. Polla, *L'inflammation.* Éditions John Libbey Eurotext ed, ed. P. Briand. 1998, Paris: John Libbey Eurotext.



459. Ziganshina, L.E., A.U. Ziganshin, C.H. Hoyle, and G. Burnstock, *Acute paw oedema formation induced by ATP: re-evaluation of the mechanisms involved*. *Inflamm Res*, 1996. **45**(2): p. 96-102.
460. Coutts, A.A., J.L. Jorizzo, R.A. Eady, M.W. Greaves, and G. Burnstock, *Adenosine triphosphate-evoked vascular changes in human skin: mechanism of action*. *Eur J Pharmacol*, 1981. **76**(4): p. 391-401.
461. Hamilton, S.G., J. Warburton, A. Bhattacharjee, J. Ward, and S.B. McMahon, *ATP in human skin elicits a dose-related pain response which is potentiated under conditions of hyperalgesia*. *Brain*, 2000. **123** ( Pt 6): p. 1238-46.
462. Hamilton, S.G., A. Wade, and S.B. McMahon, *The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat*. *Br J Pharmacol*, 1999. **126**(1): p. 326-32.
463. Bland-Ward, P.A. and P.P. Humphrey, *Acute nociception mediated by hindpaw P2X receptor activation in the rat*. *Br J Pharmacol*, 1997. **122**(2): p. 365-71.
464. Green, P.G., A.I. Basbaum, C. Helms, and J.D. Levine, *Purinergic regulation of bradykinin-induced plasma extravasation and adjuvant-induced arthritis in the rat*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(10): p. 4162-5.
465. Meyer, R.A., J.N. Campbell, and S.N. Raja, *Peripheral neural mechanisms of nociception*. *Textbook of pain*, ed. W.P.D. Melzack R. 1994, Edinburgh: Churchill Livingstone.
466. Harrington, L.S., R.J. Evans, J. Wray, L. Norling, K.E. Swales, C. Vial, F. Ali, M.J. Carrier, and J.A. Mitchell, *Purinergic 2X1 receptors mediate endothelial dependent vasodilation to ATP*. *Mol Pharmacol*, 2007. **72**(5): p. 1132-6.
467. Boarder, M.R. and S.M. Hourani, *The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 1998. **19**(3): p. 99-107.
468. Yamamoto, K., T. Sokabe, T. Matsumoto, K. Yoshimura, M. Shibata, N. Ohura, T. Fukuda, T. Sato, K. Sekine, S. Kato, M. Isshiki, T. Fujita, M. Kobayashi, K. Kawamura, H. Masuda, A. Kamiya, and J. Ando, *Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice*. *Nat Med*, 2006. **12**(1): p. 133-7.
469. Donnelly-Roberts, D.L. and M.F. Jarvis, *Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states*. *Br J Pharmacol*, 2007. **151**(5): p. 571-9.
470. Donnelly-Roberts, D., S. McGaraughty, C.C. Shieh, P. Honore, and M.F. Jarvis, *Painful purinergic receptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. **324**(2): p. 409-15.
471. Burnstock, G., *Purinergic receptors and pain*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(15): p. 1717-35.
472. Okada, M., T. Nakagawa, M. Minami, and M. Satoh, *Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **303**(1): p. 66-73.
473. Sowa, N.A., K.I. Vadakkan, and M.J. Zylka, *Recombinant mouse PAP has pH-dependent ectonucleotidase activity and acts through A(1)-adenosine receptors to mediate antinociception*. *PLoS One*, 2009. **4**(1): p. e4248.



474. Zahn, P.K., H. Straub, M. Wenk, and E.M. Pogatzki-Zahn, *Adenosine A1 but not A2a receptor agonist reduces hyperalgesia caused by a surgical incision in rats: a pertussis toxin-sensitive G protein-dependent process*. *Anesthesiology*, 2007. **107**(5): p. 797-806.
475. Maione, S., V. de Novellis, L. Cappellacci, E. Palazzo, D. Vita, L. Luongo, L. Stella, P. Franchetti, I. Marabese, F. Rossi, and M. Grifantini, *The antinociceptive effect of 2-chloro-2'-C-methyl-N6-cyclopentyladenosine (2'-Me-CCPA), a highly selective adenosine A1 receptor agonist, in the rat*. *Pain*, 2007. **131**(3): p. 281-92.
476. Keshav, S., *Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(3): p. 500-8.
477. Nigrovic, P.A. and D.M. Lee, *Mast cells in inflammatory arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(1): p. 1-11.
478. Glaros, T., M. Larsen, and L. Li, *Macrophages and fibroblasts during inflammation, tissue damage and organ injury*. *Front Biosci*, 2009. **14**: p. 3988-93.
479. Morganti-Kossmann, M.C., L. Satgunaseelan, N. Bye, and T. Kossmann, *Modulation of immune response by head injury*. *Injury*, 2007. **38**(12): p. 1392-400.
480. Haelens, A., A. Wuyts, P. Proost, S. Struyf, G. Opdenakker, and J. van Damme, *Leukocyte migration and activation by murine chemokines*. *Immunobiology*, 1996. **195**(4-5): p. 499-521.
481. Baggiolini, M., P. Loetscher, and B. Moser, *Interleukin-8 and the chemokine family*. *Int J Immunopharmacol*, 1995. **17**(2): p. 103-8.
482. Eltzhig, H.K., C.F. Macmanus, and S.P. Colgan, *Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: functional consequences at the vascular interface*. *Trends Cardiovasc Med*, 2008. **18**(3): p. 103-7.
483. Madara, J.L., T.W. Patapoff, B. Gillece-Castro, S.P. Colgan, C.A. Parkos, C. Delp, and R.J. Mrsny, *5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(5): p. 2320-5.
484. Pulte, E.D., M.J. Broekman, K.E. Olson, J.H. Drosopoulos, J.R. Kizer, N. Islam, and A.J. Marcus, *CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes*. *Thromb Res*, 2007. **121**(3): p. 309-17.
485. Corriden, R., Y. Chen, Y. Inoue, G. Beldi, S.C. Robson, P.A. Insel, and W.G. Junger, *Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(42): p. 28480-6.
486. Pellme, S., C. Dahlgren, and A. Karlsson, *The two neutrophil plasma membrane markers alkaline phosphatase and HLA class I antigen localize differently in granule-deficient cytoplasts. An ideal plasma membrane marker in human neutrophils is still lacking*. *J Immunol Methods*, 2007. **325**(1-2): p. 88-95.
487. Jin, J., V.R. Dasari, F.D. Sistare, and S.P. Kunapuli, *Distribution of P2Y receptor subtypes on haematopoietic cells*. *Br J Pharmacol*, 1998. **123**(5): p. 789-94.
488. Chen, Y., R. Corriden, Y. Inoue, L. Yip, N. Hashiguchi, A. Zinkernagel, V. Nizet, P.A. Insel, and W.G. Junger, *ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors*. *Science*, 2006. **314**(5806): p. 1792-5.



489. Kukulski, F., F. Ben Yebdri, J. Lefebvre, M. Warny, P.A. Tessier, and J. Sévigny, *Extracellular nucleotides mediate LPS-induced neutrophil migration in vitro and in vivo*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(5): p. 1269-75.
490. Henderson, R.B., J.A. Hobbs, M. Mathies, and N. Hogg, *Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration*. *Blood*, 2003. **102**(1): p. 328-35.
491. Swirski, F.K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J.L. Figueiredo, R.H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T.R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet, *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. *Science*, 2009. **325**(5940): p. 612-6.
492. Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann, *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. *Science*, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
493. Tacke, F. and G.J. Randolph, *Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets*. *Immunobiology*, 2006. **211**(6-8): p. 609-18.
494. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 669-92.
495. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 958-69.
496. Nathan, C., *Points of control in inflammation*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 846-52.
497. Martinez, F.O., A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati, *Macrophage activation and polarization*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 453-61.
498. Warny, M., S. Aboudola, S.C. Robson, J. Sévigny, D. Communi, S.P. Soltoff, and C.P. Kelly, *P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 26051-6.
499. Lattin, J.E., K. Schroder, A.I. Su, J.R. Walker, J. Zhang, T. Wiltshire, K. Saijo, C.K. Glass, D.A. Hume, S. Kellie, and M.J. Sweet, *Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages*. *Immunome Res*, 2008. **4**(1): p. 5.
500. Marques da Silva, C., L. Miranda Rodrigues, A. Passos da Silva Gomes, M. Mantuano Barradas, F. Sarmiento Vieira, P.M. Persechini, and R. Coutinho-Silva, *Modulation of P2X7 receptor expression in macrophages from mineral oil-injected mice*. *Immunobiology*, 2008. **213**(6): p. 481-92.
501. Sim, J.A., C.K. Park, S.B. Oh, R.J. Evans, and R.A. North, *P2X1 and P2X4 receptor currents in mouse macrophages*. *Br J Pharmacol*, 2007. **152**(8): p. 1283-90.
502. Gay, N.J. and M. Gangloff, *Structure and function of Toll receptors and their ligands*. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 141-65.
503. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 335-76.
504. Applequist, S.E., R.P. Wallin, and H.G. Ljunggren, *Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines*. *Int Immunol*, 2002. **14**(9): p. 1065-74.



505. Hayashi, F., T.K. Means, and A.D. Luster, *Toll-like receptors stimulate human neutrophil function*. *Blood*, 2003. **102**(7): p. 2660-9.
506. Means, T.K., F. Hayashi, K.D. Smith, A. Aderem, and A.D. Luster, *The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells*. *J Immunol*, 2003. **170**(10): p. 5165-75.
507. Nam, N.H., *Naturally occurring NF-kappaB inhibitors*. *Mini Rev Med Chem*, 2006. **6**(8): p. 945-51.
508. Ben Yebdri, F., F. Kukulski, A. Tremblay, and J. Sévigny, *Extracellular nucleotides mediate TLR2-induced neutrophil migration by regulating IL-8 secretion in monocytes via P2Y2 and P2Y6*. *In press Eur J Immunol*, 2009.
509. Kanneganti, T.D., M. Lamkanfi, and G. Nunez, *Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease*. *Immunity*, 2007. **27**(4): p. 549-59.
510. Marina-Garcia, N., L. Franchi, Y.G. Kim, D. Miller, C. McDonald, G.J. Boons, and G. Nunez, *Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2*. *J Immunol*, 2008. **180**(6): p. 4050-7.
511. Qu, Y. and G.R. Dubyak, *P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways*. *Purinergic Signal*, 2009. **5**(2): p. 163-73.
512. Duncan, J.A., D.T. Bergstralh, Y. Wang, S.B. Willingham, Z. Ye, A.G. Zimmermann, and J.P. Ting, *Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(19): p. 8041-6.
513. Mariathasan, S., D.S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W.P. Lee, Y. Weinrauch, D.M. Monack, and V.M. Dixit, *Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP*. *Nature*, 2006. **440**(7081): p. 228-32.
514. Kahlenberg, J.M. and G.R. Dubyak, *Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(5): p. C1100-8.
515. Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, M. Dal Susino, L. Melchiorri, O.R. Baricordi, and F. Di Virgilio, *Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages*. *J Immunol*, 1997. **159**(3): p. 1451-8.
516. Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R.M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther, and F. Di Virgilio, *The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release*. *J Immunol*, 2006. **176**(7): p. 3877-83.
517. Franchi, L., T.D. Kanneganti, G.R. Dubyak, and G. Nunez, *Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K<sup>+</sup> for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(26): p. 18810-8.
518. Pelegrin, P. and A. Surprenant, *Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(4): p. 2386-94.
519. Di Virgilio, F., *Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome*. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. **28**(9): p. 465-72.



520. Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R.A. North, and G. Buell, *The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)*. *Science*, 1996. **272**(5262): p. 735-8.
521. Brough, D., R.A. Le Feuvre, Y. Iwakura, and N.J. Rothwell, *Purinergic (P2X7) receptor activation of microglia induces cell death via an interleukin-1-independent mechanism*. *Mol Cell Neurosci*, 2002. **19**(2): p. 272-80.
522. Spranzi, E., J.Y. Djeu, S.L. Hoffman, P.K. Epling-Burnette, and D.K. Blanchard, *Lysis of human monocytic leukemia cells by extracellular adenosine triphosphate: mechanism and characterization of the adenosine triphosphate receptor*. *Blood*, 1993. **82**(5): p. 1578-85.
523. Mackenzie, A.B., M.T. Young, E. Adinolfi, and A. Surprenant, *Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(40): p. 33968-76.
524. Yoon, M.J., H.J. Lee, Y.S. Lee, J.H. Kim, J.K. Park, W.K. Chang, H.C. Shin, and D.K. Kim, *Extracellular ATP is involved in the induction of apoptosis in murine hematopoietic cells*. *Biol Pharm Bull*, 2007. **30**(4): p. 671-6.
525. Vazquez-Cuevas, F.G., B. Juarez, E. Garay, and R.O. Arellano, *ATP-induced apoptotic cell death in porcine ovarian theca cells through P2X7 receptor activation*. *Mol Reprod Dev*, 2006. **73**(6): p. 745-55.
526. Franchi, L., A. Amer, M. Body-Malapel, T.D. Kanneganti, N. Ozoren, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E.P. Grant, and G. Nunez, *Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(6): p. 576-82.
527. Kanneganti, T.D., M. Lamkanfi, Y.G. Kim, G. Chen, J.H. Park, L. Franchi, P. Vandenabeele, and G. Nunez, *Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling*. *Immunity*, 2007. **26**(4): p. 433-43.
528. Pelegrin, P., *Targeting Interleukin-1 Signaling in Chronic Inflammation: Focus on P2X7 Receptor and Pannexin-1*. *Drug News Perspect*, 2008. **21**(8): p. 424-33.
529. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 519-50.
530. Sharma, S., N. Kulk, M.F. Nold, R. Graf, S.H. Kim, D. Reinhardt, C.A. Dinarello, and P. Bufler, *The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines*. *J Immunol*, 2008. **180**(8): p. 5477-82.
531. Martin, U., J. Scholler, J. Gurgel, B. Renshaw, J.E. Sims, and C.A. Gabel, *Externalization of the leaderless cytokine IL-1F6 occurs in response to lipopolysaccharide/ATP activation of transduced bone marrow macrophages*. *J Immunol*, 2009. **183**(6): p. 4021-30.
532. Dinarello, C.A., *The IL-1 family and inflammatory diseases*. *Clin Exp Rheumatol*, 2002. **20**(5 Suppl 27): p. S1-13.
533. Pelegrin, P., *Targeting Interleukin-1 Signaling in Chronic Inflammation: Focus on P2X7 Receptor and Pannexin-1*. *Drug News Perspect*, 2008. **21**(8): p. 424-433.
534. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme*. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. **856**: p. 1-11.
535. Subramaniam, S., C. Stansberg, and C. Cunningham, *The interleukin 1 receptor family*. *Dev Comp Immunol*, 2004. **28**(5): p. 415-28.



536. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism*. Blood, 1991. **77**(8): p. 1627-52.
537. Boraschi, D. and A. Tagliabue, *The interleukin-1 receptor family*. Vitam Horm, 2006. **74**: p. 229-54.
538. Cayrol, C. and J.P. Girard, *The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(22): p. 9021-6.
539. Beigi, R.D. and G.R. Dubyak, *Endotoxin activation of macrophages does not induce ATP release and autocrine stimulation of P2 nucleotide receptors*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7189-98.
540. Goepfert, C., C. Sundberg, J. Sévigny, K. Enjyoji, T. Hoshi, E. Csizmadia, and S. Robson, *Disordered cellular migration and angiogenesis in cd39-null mice*. Circulation, 2001. **104**(25): p. 3109-15.
541. Gordon, S., C.S. Ripps, and Z. Cohn, *The preparation and properties of macrophage-L cell hybrids*. J Exp Med, 1971. **134**(5): p. 1187-1200.
542. Glenn, J.R., A.E. White, A. Johnson, S.C. Fox, M.W. Behan, G. Dolan, and S. Heptinstall, *Leukocyte count and leukocyte ecto-nucleotidase are major determinants of the effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on platelet aggregation in human blood*. Platelets, 2005. **16**(3-4): p. 159-70.
543. Morahan, P.S., P.J. Edelson, and K. Gass, *Changes in macrophage ectoenzymes associated with anti-tumor activity*. J Immunol, 1980. **125**(3): p. 1312-7.
544. Sud'ina, G.F., O.K. Mirzoeva, S.I. Galkina, M.A. Pushkareva, and V. Ullrich, *Involvement of ecto-ATPase and extracellular ATP in polymorphonuclear granulocyte-endothelial interactions*. FEBS Lett, 1998. **423**(2): p. 243-8.
545. Purzyc, L. and I. Calkosinski, *The influence of mechlorethamine on the activity of ecto-ATPase of rat lymphocytes*. Ann Pharm Fr, 2001. **59**(1): p. 33-9.
546. Kobayashi, T., T. Okada, E. Garcia del Saz, and H. Seguchi, *Internalization of ecto-ATPase activity in human neutrophils upon stimulation with phorbol ester or formyl peptide*. Histochem Cell Biol, 1997. **107**(5): p. 353-63.
547. Hart, D.N. and J.L. McKenzie, *Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells*. J Exp Med, 1988. **168**(1): p. 157-70.
548. Kansas, G.S., G.S. Wood, and T.F. Tedder, *Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes*. J Immunol, 1991. **146**(7): p. 2235-44.
549. Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M.L. Dell'Acqua, P.M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk, *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
550. Beldi, G., Y. Wu, Y. Banz, M. Nowak, L. Miller, K. Enjyoji, A. Haschemi, G.G. Yegutkin, D. Candinas, M. Exley, and S.C. Robson, *Natural killer T cell dysfunction in CD39-null mice protects against concanavalin A-induced hepatitis*. Hepatology, 2008. **48**(3): p. 841-52.
551. Mizumoto, N., T. Kumamoto, S.C. Robson, J. Sévigny, H. Matsue, K. Enjyoji, and A. Takashima, *CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 358-65.



552. Berchtold, S., A.L. Ogilvie, C. Bogdan, P. Muhl-Zurbes, A. Ogilvie, G. Schuler, and A. Steinkasserer, *Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases*. FEBS Lett, 1999. **458**(3): p. 424-8.
553. Martin-Satué, M., E.G. Lavoie, J. Pelletier, M. Fausther, E. Csizmadia, O. Guckelberger, S.C. Robson, and J. Sévigny, *Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract*. Histochem Cell Biol, 2009. **131**(5): p. 615-28.
554. Dwyer, K.M., S. Deaglio, W. Gao, D. Friedman, T.B. Strom, and S.C. Robson, *CD39 and control of cellular immune responses*. Purinergic Signal, 2007. **3**(1-2): p. 171-80.
555. Robson, S.C., S. Daoud, M. Bégin, Y.P. Coté, J.B. Siegel, F.H. Bach, and A.R. Beaudoin, *Modulation of vascular ATP diphosphohydrolase by fatty acids*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1997. **8**(1): p. 21-27.
556. Neshat, S., M. deVries, A.R. Barajas-Espinosa, L. Skeith, S.P. Chisholm, and A.E. Lomax, *Loss of purinergic vascular regulation in the colon during colitis is associated with upregulation of CD39*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(2): p. G399-405.
557. Eltzschig, H.K., D. Kohler, T. Eckle, T. Kong, S.C. Robson, and S.P. Colgan, *Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection*. Blood, 2009. **113**(1): p. 224-32.
558. Kunzli, B.M., P. Nuhn, K. Enjyoji, Y. Banz, R.N. Smith, E. Csizmadia, D. Schuppan, P.O. Berberat, H. Friess, and S.C. Robson, *Disordered pancreatic inflammatory responses and inhibition of fibrosis in CD39-null mice*. Gastroenterology, 2008. **134**(1): p. 292-305.
559. Christensen, L.D., *No correlation between CD73 expression and ecto-5'-nucleotidase activity on blood mononuclear cells in vitro. Evidence of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) on blood mononuclear cells with distinct antigenic properties*. APMIS, 1996. **104**(2): p. 126-34.
560. Johnson, S.M., *The importance of B-cells and ecto-5'-nucleotidase in Mycoplasma fermentans infection and the relevance to rheumatoid arthritis*. Immunology, 2008. **123**(2): p. 187-96.
561. Napieralski, R., B. Kempkes, and W. Gutensohn, *Evidence for coordinated induction and repression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) and the A2a adenosine receptor in a human B cell line*. Biol Chem, 2003. **384**(3): p. 483-7.
562. Yegutkin, G.G., T. Henttinen, S.S. Samburski, J. Szychala, and S. Jalkanen, *The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells*. Biochem J, 2002. **367**(Pt 1): p. 121-8.
563. Christensen, L.D. and V. Andersen, *Natural killer cells lack ecto-5'-nucleotidase*. Nat Immun, 1992. **11**(1): p. 1-6.
564. Montesinos, M.C., A. Desai, J.F. Chen, H. Yee, M.A. Schwarzschild, J.S. Fink, and B.N. Cronstein, *Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors*. Am J Pathol, 2002. **160**(6): p. 2009-18.
565. Montesinos, M.C., A. Desai, D. Delano, J.F. Chen, J.S. Fink, M.A. Jacobson, and B.N. Cronstein, *Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of*



- inflammation by methotrexate and its analog MX-68*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(1): p. 240-7.
566. Montesinos, M.C., M. Takedachi, L.F. Thompson, T.F. Wilder, P. Fernandez, and B.N. Cronstein, *The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(5): p. 1440-5.
567. Deterre, P., L. Gelman, H. Gary-Gouy, C. Arrieumerlou, V. Berthelie, J.M. Tixier, S. Ktorza, J. Goding, C. Schmitt, and G. Bismuth, *Coordinated regulation in human T cells of nucleotide-hydrolyzing ecto-enzymatic activities, including CD38 and PC-1. Possible role in the recycling of nicotinamide adenine dinucleotide metabolites*. *J Immunol*, 1996. **157**(4): p. 1381-8.
568. Marty, L.M. and T.L. Feldbush, *Effect of anti-alkaline phosphatase monoclonal antibody on B lymphocyte function*. *Immunol Lett*, 1993. **38**(2): p. 87-95.
569. Côté, Y.P., J.G. Filep, B. Battistini, J. Gauvreau, P. Sirois, and A.R. Beaudoin, *Characterization of ATP-diphosphohydrolase activities in the intima and media of the bovine aorta: evidence for a regulatory role in platelet activation in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1139**(1-2): p. 133-42.
570. Marcus, A.J., L.B. Safier, K.A. Hajjar, H.L. Ullman, N. Islam, M.J. Broekman, and A.M. Eiroa, *Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(5): p. 1690-6.
571. Enjyoji, K., J. Sevigny, Y. Lin, P.S. Frenette, P.D. Christie, J.S. Esch, 2nd, M. Imai, J.M. Edelberg, H. Rayburn, M. Lech, D.L. Beeler, E. Csizmadia, D.D. Wagner, S.C. Robson, and R.D. Rosenberg, *Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation*. *Nat Med*, 1999. **5**(9): p. 1010-7.
572. Guckelberger, O., X.F. Sun, J. Sévigny, M. Imai, E. Kaczmarek, K. Enjyoji, J.B. Kruskal, and S.C. Robson, *Beneficial effects of CD39/ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 in murine intestinal ischemia-reperfusion injury*. *Thromb Haemost*, 2004. **91**(3): p. 576-86.
573. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **420**(19): p. 868-74.
574. Brennan, F.M. and I.B. McInnes, *Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(11): p. 3537-45.
575. Pope, R.M. and J. Tschopp, *The role of interleukin-1 and the inflammasome in gout: implications for therapy*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(10): p. 3183-8.
576. Barnes, P.J., *The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(11): p. 3546-56.
577. Fahy, J.V., *Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies*. *Proc Am Thorac Soc*, 2009. **6**(3): p. 256-9.
578. Ramasundara, M., S.T. Leach, D.A. Lemberg, and A.S. Day, *Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **24**(2): p. 202-8.
579. Sawynok, J., *Adenosine and ATP receptors*. *Handb Exp Pharmacol*, 2007(177): p. 309-28.



580. Kannan, S., *Leukocyte(s) degranulation: therapeutic targets in [NTP]O and [NDP]O mediated leukocyte(s) degranulation*. Med Hypotheses, 2004. **63**(2): p. 322-4.
581. Gabel, C.A., *P2 purinergic receptor modulation of cytokine production*. Purinergic Signal, 2007. **3**(1-2): p. 27-38.
582. Carroll, W.A., D. Donnelly-Roberts, and M.F. Jarvis, *Selective P2X(7) receptor antagonists for chronic inflammation and pain*. Purinergic Signal, 2009. **5**(1): p. 63-73.
583. Kumar, V. and A. Sharma, *Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential*. Eur J Pharmacol, 2009. **616**(1-3): p. 7-15.
584. Lister, M.F., J. Sharkey, D.A. Sawatzky, J.P. Hodgkiss, D.J. Davidson, A.G. Rossi, and K. Finlayson, *The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation*. J Inflamm (Lond), 2007. **4**: p. 5.
585. Stokes, L. and A. Surprenant, *Purinergic P2Y2 receptors induce increased MCP-1/CCL2 synthesis and release from rat alveolar and peritoneal macrophages*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 6016-23.
586. Crack, B.E., C.E. Pollard, M.W. Beukers, S.M. Roberts, S.F. Hunt, A.H. Ingall, K.C. McKechnie, I.J. AP, and P. Leff, *Pharmacological and biochemical analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase*. Br J Pharmacol, 1995. **114**(2): p. 475-81.
587. Marcus, A.J., M.J. Broekman, J.H. Drosopoulos, N. Islam, T.N. Alyonycheva, L.B. Safier, K.A. Hajjar, D.N. Posnett, M.A. Schoenborn, K.A. Schooley, R.B. Gayle, and C.R. Maliszewski, *The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1351-60.
588. Klinger, M., M. Freissmuth, and C. Nanoff, *Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins*. Cell Signal, 2002. **14**(2): p. 99-108.
589. Dubyak, G.R. and C. el Moatassim, *Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides*. Am J Physiol, 1993. **265**(3 Pt 1): p. C577-C606.
590. Muller, C.E., *P2-pyrimidinergic receptors and their ligands*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(26): p. 2353-69.
591. Heyer, B.S., A. MacAuley, O. Behrendtsen, and Z. Werb, *Hypersensitivity to DNA damage leads to increased apoptosis during early mouse development*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 2072-84.
592. Chapdelaine, P., S. Delahaye, E. Gauthier, R.R. Tremblay, and J.Y. Dube, *A one-hour procedure for the preparation of genomic DNA from frozen tissues*. Biotechniques, 1993. **14**(2): p. 163-4.
593. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
594. Baykov, A.A., O.A. Evtushenko, and S.M. Avaeva, *A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay*. Anal Biochem, 1988. **171**(2): p. 266-70.
595. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.



596. Knowles, A.F., A.K. Nagy, R.S. Strobel, and M. Wu-Weis, *Purification, characterization, cloning, and expression of the chicken liver ecto-ATP-diphosphohydrolase*. Eur J Biochem, 2002. **269**(9): p. 2373-82.
597. Nagy, A.K., A.F. Knowles, and G.T. Nagami, *Molecular cloning of the chicken oviduct ecto-ATP-diphosphohydrolase*. J Biol Chem, 1998. **273**(26): p. 16043-9.
598. Beaudoin, A.R., J. Sévigny, and M. Picher. ATPases, ed. A.G. Lee. 1996, Greenwich, CT.: JAI Press Inc.
599. Picher, M., J. Sévigny, P. D'Orleans-Juste, and A.R. Beaudoin, *Hydrolysis of P2-purinoceptor agonists by a purified ectonucleotidase from the bovine aorta, the ATP-diphosphohydrolase*. Biochem Pharmacol, 1996. **51**(11): p. 1453-60.
600. White, P.J., T.E. Webb, and M.R. Boarder, *Characterization of a Ca<sup>2+</sup> response to both UTP and ATP at human P2Y<sub>11</sub> receptors: evidence for agonist-specific signaling*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1356-63.
601. Zimmermann, H., *5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects*. Biochem J, 1992. **285** ( Pt 2): p. 345-65.
602. Knowles, A.F. and W.C. Chiang, *Enzymatic and transcriptional regulation of human ecto-ATPase/E-NTPDase 2*. Arch Biochem Biophys, 2003. **418**(2): p. 217-27.
603. Yang, F., C.A. Hicks-Berger, T.M. Smith, and T.L. Kirley, *Site-directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: the importance of residues in the apyrase conserved regions*. Biochemistry, 2001. **40**(13): p. 3943-50.
604. Heine, P., N. Braun, A. Heilbronn, and H. Zimmermann, *Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells*. European Journal of Biochemistry, 1999. **262**(1): p. 102-107.
605. Wang, T.F., Y. Ou, and G. Guidotti, *The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(38): p. 24814-24821.
606. Christoforidis, S., T. Papamarcaki, D. Galaris, R. Kellner, and O. Tsolas, *Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase*. European Journal of Biochemistry, 1995. **234**: p. 66-74.
607. Kukulski, F. and M. Komoszynski, *Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes*. Eur J Biochem, 2003. **270**(16): p. 3447-54.
608. Picher, M., J. Sévigny, P. D'Orleans-Juste, and A.R. Beaudoin, *Hydrolysis of P2-purinoceptor agonists by a purified ectonucleotidase from the bovine aorta, the ATP-diphosphohydrolase*. Biochemical Pharmacology, 1996. **51**(11): p. 1453-60.
609. Beaudoin, A.R., J. Sévigny, G. Grondin, S. Daoud, and F.P. Levesque, *Purification, characterization, and localization of two ATP diphosphohydrolase isoforms in bovine heart*. American Journal of Physiology, 1997. **273**(2 Pt 2): p. H673-H681.
610. Failer, B.U., A. Aschrafi, G. Schmalzing, and H. Zimmermann, *Determination of native oligomeric state and substrate specificity of rat NTPDase1 and NTPDase2 after heterologous expression in Xenopus oocytes*. Eur J Biochem, 2003. **270**(8): p. 1802-9.



611. Mateo, J., T.K. Harden, and J.L. Boyer, *Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase*. British Journal of Pharmacology, 1999. **128**(2): p. 396-402.
612. Smith, T.M. and T.L. Kirley, *Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: Evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily*. Biochemistry, 1999. **38**(1): p. 321-328.
613. Sévigny, J., S.C. Robson, E. Waelkens, E. Csizmadia, R.N. Smith, and R. Lemmens, *Identification and characterization of a novel hepatic canalicular ATP diphosphohydrolase*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(8): p. 5640-5647.
614. Westfall, T.D., S. Sarkar, N. Ramphir, D.P. Westfall, P. Sneddon, and C. Kennedy, *Characterization of the ATPase released during sympathetic nerve stimulation of the guinea-pig isolated vas deferens*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(8): p. 1684-8.
615. Khakh, B.S., A.D. Michel, and P.P.A. Humphrey, *Inhibition of ecto-ATPase and Ca-ATPase in rat vas deferens by P2 purinoceptor antagonists*. Br J Pharmacol, 1995. **115**: p. 2P.
616. Ghildyal, P. and R. Manchanda, *Effects of cooling and ARL 67156 on synaptic ecto-ATPase activity in guinea pig and mouse vas deferens*. Auton Neurosci, 2004. **115**(1-2): p. 28-34.
617. Connolly, G.P., C. Demaine, and J.A. Duley, *Ecto-nucleotidases in isolated intact rat vagi, nodose ganglia, and superior cervical ganglia*. Adv Exp Med Biol, 1998. **431**: p. 769-76.
618. Drakulich, D.A., C. Spellmon, and T.D. Hexum, *Effect of the ecto-ATPase inhibitor, ARL 67156, on the bovine chromaffin cell response to ATP*. Eur J Pharmacol, 2004. **485**(1-3): p. 137-40.
619. Dowd, F.J., L.S. Li, and W. Zeng, *Inhibition of rat parotid ecto-ATPase activity*. Arch Oral Biol, 1999. **44**(12): p. 1055-62.
620. Erga, K.S., C.N. Seubert, H.X. Liang, L. Wu, J.C. Shryock, and L. Belardinelli, *Role of A(2A)-adenosine receptor activation for ATP-mediated coronary vasodilation in guinea-pig isolated heart*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(5): p. 1065-75.
621. Westfall, T.D., C. Kennedy, and P. Sneddon, *Enhancement of sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens by the novel ecto-ATPase inhibitor ARL 67156*. Br J Pharmacol, 1996. **117**(5): p. 867-72.
622. Westfall, T.D., C. Kennedy, and P. Sneddon, *The ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 enhances parasympathetic neurotransmission in the guinea-pig urinary bladder*. Eur J Pharmacol, 1997. **329**(2-3): p. 169-73.
623. Connolly, G.P. and J.A. Duley, *Ecto-nucleotidase of cultured rat superior cervical ganglia: dipyridamole is a novel inhibitor*. Eur J Pharmacol, 2000. **397**(2-3): p. 271-7.
624. McLaren, G.J., K.S. Burke, K.J. Buchanan, P. Sneddon, and C. Kennedy, *Evidence that ATP acts at two sites to evoke contraction in the rat isolated tail artery*. Br J Pharmacol, 1998. **124**(1): p. 5-12.
625. Stefan, C., S. Jansen, and M. Bollen, *NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(10): p. 542-50.
626. Sträter, N., *Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 343-50.
627. Farahbakhsh, N.A., *Ectonucleotidases of the rabbit ciliary body nonpigmented epithelium*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(9): p. 3952-60.



628. He, M.L., A.E. Gonzalez-Iglesias, M. Tomic, and S.S. Stojilkovic, *Release and extracellular metabolism of ATP by ecto-nucleotidase eNTPDase 1-3 in hypothalamic and pituitary cells*. *Purinergic Signal*, 2005. **1**(2): p. 135-44.
629. Westfall, T.D., J.R. Menzies, R. Liberman, S. Waterston, N. Ramphir, D.P. Westfall, P. Sneddon, and C. Kennedy, *Release of a soluble ATPase from the rabbit isolated vas deferens during nerve stimulation*. *Br J Pharmacol*, 2000. **131**(5): p. 909-14.
630. Machida, T., P.M. Heerdt, A.C. Reid, U. Schafer, R.B. Silver, M.J. Broekman, A.J. Marcus, and R. Levi, *Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1/CD39, localized in neurons of human and porcine heart, modulates ATP-induced norepinephrine exocytosis*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **313**(2): p. 570-7.
631. Silva, G., W.H. Beierwaltes, and J.L. Garvin, *Extracellular ATP stimulates NO production in rat thick ascending limb*. *Hypertension*, 2006. **47**(3): p. 563-7.
632. Laitinen, J.T., A. Uri, G. Raidaru, and R. Miettinen, *[(35)S]GTPgammaS autoradiography reveals a wide distribution of G(i/o)-linked ADP receptors in the nervous system: close similarities with the platelet P2Y(ADP) receptor*. *J Neurochem*, 2001. **77**(2): p. 505-18.
633. Sesti, C., M.J. Broekman, J.H. Drosopoulos, N. Islam, A.J. Marcus, and R. Levi, *EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **300**(2): p. 605-11.
634. Mukasa, T., Y. Lee, and A.F. Knowles, *Either the carboxyl- or the amino-terminal region of the human ecto-ATPase (E-NTPDase 2) confers detergent and temperature sensitivity to the chicken ecto-ATP-diphosphohydrolase (E-NTPDase 8)*. *Biochemistry*, 2005. **44**(33): p. 11160-70.
635. Westfall, T.D., C.A. McIntyre, S. Obeid, J. Bowes, C. Kennedy, and P. Sneddon, *The interaction of diadenosine polyphosphates with P2x-receptors in the guinea-pig isolated vas deferens*. *Br J Pharmacol*, 1997. **121**(1): p. 57-62.
636. Lecka, J., M.S. Rana, and J. Sévigny, *Inhibition of the vascular ectoADPase/CD39/NTPDase1 activity by the pro-drugs Ticlopidine and Clopidogrel favors platelet aggregation*. Submitted in Cardiovascular Research, 2009.
637. Luthje, J. and A. Ogilvie, *Catabolism of Ap3A and Ap4A in human plasma. Purification and characterization of a glycoprotein complex with 5'-nucleotide phosphodiesterase activity*. *Eur J Biochem*, 1985. **149**(1): p. 119-27.
638. Goding, J.W., *Ecto-enzymes: physiology meets pathology*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(3): p. 285-311.
639. Grobбен, B., P. Claes, D. Roymans, E.L. Esmans, H. Van Onckelen, and H. Slegers, *Ecto-nucleotide pyrophosphatase modulates the purinoceptor-mediated signal transduction and is inhibited by purinoceptor antagonists*. *Br J Pharmacol*, 2000. **130**(1): p. 139-45.
640. Iqbal, J., P. Vollmayer, N. Braun, H. Zimmermann, and C.E. Müller, *A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDases) and the analysis of inhibition by in capillary enzymatic microreaction*. *Purinergic Signal*, 2005. **1**(4): p. 349-358.



641. Kegel, B., N. Braun, P. Heine, C.R. Maliszewski, and H. Zimmermann, *An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain*. *Neuropharmacology*, 1997. **36**(9): p. 1189-200.
642. Benham, C.D. and R.W. Tsien, *A novel receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by ATP in smooth muscle*. *Nature*, 1987. **328**(6127): p. 275-8.
643. Solle, M., J. Labasi, D.G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B.H. Koller, R.J. Griffiths, and C.A. Gabel, *Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(1): p. 125-32.
644. Labasi, J.M., N. Petrushova, C. Donovan, S. McCurdy, P. Lira, M.M. Payette, W. Brissette, J.R. Wicks, L. Audoly, and C.A. Gabel, *Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response*. *J Immunol*, 2002. **168**(12): p. 6436-45.
645. Chessell, I.P., J.P. Hatcher, C. Bountra, A.D. Michel, J.P. Hughes, P. Green, J. Egerton, M. Murfin, J. Richardson, W.L. Peck, C.B. Grahames, M.A. Casula, Y. Yiangou, R. Birch, P. Anand, and G.N. Buell, *Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain*. *Pain*, 2005. **114**(3): p. 386-96.
646. Ferrari, D., M. Los, M.K. Bauer, P. Vandenabeele, S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff, *P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death*. *FEBS Lett*, 1999. **447**(1): p. 71-5.
647. Kusner, D.J. and J. Adams, *ATP-induced killing of virulent Mycobacterium tuberculosis within human macrophages requires phospholipase D*. *J Immunol*, 2000. **164**(1): p. 379-88.
648. Haag, F., S. Adriouch, A. Brass, C. Jung, S. Moller, F. Scheuplein, P. Bannas, M. Seman, and F. Koch-Nolte, *Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation*. *Purinergic Signal*, 2007. **3**(1-2): p. 71-81.
649. Mizumoto, N., T. Kumamoto, S.C. Robson, J. Sévigny, H. Matsue, K. Enyoji, and A. Takashima, *CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness*. *Nat Med*, 2002. **8**(4): p. 358-365.
650. Kauffenstein, G., A. Drouin, N. Thorin-Trescases, H. Bachelard, B. Robaye, P. D'Orleans-Juste, F. Marceau, E. Thorin, and J. Sévigny, *NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse*. *Cardiovasc Res*, 2010. **85**(1): p. 204-13.
651. Zhang, X., R. Goncalves, and D.M. Mosser, *The isolation and characterization of murine macrophages*. *Curr Protoc Immunol*, 2008. **Chapter 14**: p. Unit 14 1.
652. Davies, J.Q. and S. Gordon, *Isolation and culture of murine macrophages*. *Methods Mol Biol*, 2005. **290**: p. 91-103.
653. Bartel, D.L., S.L. Sullivan, E.G. Lavoie, J. Sévigny, and T.E. Finger, *Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds*. *J Comp Neurol*, 2006. **497**(1): p. 1-12.
654. Brough, D. and N.J. Rothwell, *Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 5): p. 772-81.
655. Kahlenberg, J.M., K.C. Lundberg, S.B. Kertesy, Y. Qu, and G.R. Dubyak, *Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR*



- signals and requires NF-kappaB-driven protein synthesis. *J Immunol*, 2005. **175**(11): p. 7611-22.
656. Sanz, J.M. and F. Di Virgilio, *Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells*. *J Immunol*, 2000. **164**(9): p. 4893-8.
657. Imai, M., C. Goepfert, E. Kaczmarek, and S.C. Robson, *CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **270**(1): p. 272-8.
658. Sperlagh, B., G. Hasko, Z. Nemeth, and E.S. Vizi, *ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors*. *Neurochem Int*, 1998. **33**(3): p. 209-15.
659. Filippini, A., R.E. Taffs, T. Agui, and M.V. Sitkovsky, *Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(1): p. 334-40.
660. Goepfert, C., M. Imai, S. Brouard, E. Csizmadia, E. Kaczmarek, and S.C. Robson, *CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis*. *Mol Med*, 2000. **6**(7): p. 591-603.
661. Wilson, H.L., S.E. Francis, S.K. Dower, and D.C. Crossman, *Secretion of intracellular IL-1 receptor antagonist (type 1) is dependent on P2X7 receptor activation*. *J Immunol*, 2004. **173**(2): p. 1202-8.
662. Zheng, L.M., A. Zychlinsky, C.C. Liu, D.M. Ojcius, and J.D. Young, *Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death*. *J Cell Biol*, 1991. **112**(2): p. 279-88.
663. Wen, L.T. and A.F. Knowles, *Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor*. *Br J Pharmacol*, 2003. **140**(6): p. 1009-18.
664. Wu, L.F., G.P. Li, J.L. Feng, and Z.J. Pu, *Molecular mechanisms of adenosine-induced apoptosis in human HepG2 cells*. *Acta Pharmacol Sin*, 2006. **27**(4): p. 477-84.
665. Jacobson, K.A., C. Hoffmann, F. Cattabeni, and M.P. Abbracchio, *Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling*. *Apoptosis*, 1999. **4**(3): p. 197-211.
666. Mariathasan, S., K. Newton, D.M. Monack, D. Vucic, D.M. French, W.P. Lee, M. Roose-Girma, S. Erickson, and V.M. Dixit, *Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf*. *Nature*, 2004. **430**(6996): p. 213-8.
667. Piccini, A., S. Carta, S. Tassi, D. Lasiglie, G. Fossati, and A. Rubartelli, *ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(23): p. 8067-72.
668. Miao, E.A., C.M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A.E. Clark, M.W. Bader, S.I. Miller, and A. Aderem, *Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(6): p. 569-75.
669. Meda, L., S. Gasperini, M. Ceska, and M.A. Cassatella, *Modulation of proinflammatory cytokine release from human polymorphonuclear leukocytes by gamma interferon*. *Cell Immunol*, 1994. **157**(2): p. 448-61.



670. Nie, K., G.G. Zheng, X.J. Zhang, Y.M. Lin, L. Wang, G. Li, Y.H. Song, and K.F. Wu, *CD39-associated high ATPase activity contribute to the loss of P2X7-mediated calcium response in LCL cells*. *Leuk Res*, 2005. **29**(11): p. 1325-33.
671. Gonnord, P., C. Delarasse, R. Auger, K. Benihoud, M. Prigent, M.H. Cuif, C. Lamaze, and J.M. Kanellopoulos, *Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts*. *FASEB J*, 2008. **23**(3): p. 795-805.
672. Barth, K., K. Weinhold, A. Guenther, M.T. Young, H. Schnittler, and M. Kasper, *Caveolin-1 influences P2X7 receptor expression and localization in mouse lung alveolar epithelial cells*. *FEBS J*, 2007. **274**(12): p. 3021-33.
673. Koziak, K., J. Sévigny, S.C. Robson, J.B. Siegel, and E. Kaczmarek, *Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes*. *Thromb Haemost*, 1999. **82**(5): p. 1538-44.
674. Robson, S.C., S. Daoud, M. Begin, Y.P. Côté, J.B. Siegel, F.H. Bach, and A.R. Beaudoin, *Modulation of vascular ATP diphosphohydrolase by fatty acids*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1997. **8**(1): p. 21-27.
675. Hyman, M.C., D. Petrovic-Djergovic, S.H. Visovatti, H. Liao, S. Yanamadala, D. Bouis, E.J. Su, D.A. Lawrence, M.J. Broekman, A.J. Marcus, and D.J. Pinsky, *Self-regulation of inflammatory cell trafficking in mice by the leukocyte surface apyrase CD39*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(5): p. 1136-49.
676. Friedman, D.J., B.M. Kunzli, A.R. Yi, J. Sévigny, P.O. Berberat, K. Enjyoji, E. Csizmadia, H. Friess, and S.C. Robson, *From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(39): p. 16788-93.
677. Choi, H.B., J.K. Ryu, S.U. Kim, and J.G. McLarnon, *Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain*. *J Neurosci*, 2007. **27**(18): p. 4957-68.
678. Goncalves, R.G., L. Gabrich, A. Rosario, Jr., C.M. Takiya, M.L. Ferreira, L.B. Chiarini, P.M. Persechini, R. Coutinho-Silva, and M. Leite, Jr., *The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice*. *Kidney Int*, 2006. **70**(9): p. 1599-606.
679. D'Alimonte, I., R. Ciccarelli, P. Di Iorio, E. Nargi, S. Buccella, P. Giuliani, M.P. Rathbone, S. Jiang, F. Caciagli, and P. Ballerini, *Activation of P2X(7) receptors stimulates the expression of P2Y(2) receptor mRNA in astrocytes cultured from rat brain*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2007. **20**(2): p. 301-16.
680. Basso, A.M., N.A. Bratcher, R.R. Harris, M.F. Jarvis, M.W. Decker, and L.E. Rueter, *Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders*. *Behav Brain Res*, 2009. **198**(1): p. 83-90.
681. Brabers, N.A. and H.S. Nottet, *Role of the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta in HIV-associated dementia*. *Eur J Clin Invest*, 2006. **36**(7): p. 447-58.
682. Knowles, A.F. and C. Li, *Molecular cloning and characterization of expressed human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 (E-NTPDase 8) and its soluble extracellular domain*. *Biochemistry*, 2006. **45**(23): p. 7323-33.



683. Masse, K., R. Eason, S. Bhamra, N. Dale, and E.A. Jones, *Comparative genomic and expression analysis of the conserved NTPDase gene family in Xenopus*. Genomics, 2006. **87**(3): p. 366-81.
684. Zhong, X., M. Buddha, G. Guidotti, R. Kriz, W. Somers, and L. Mosyak, *Expression, purification and crystallization of the ecto-enzymatic domain of rat E-NTPDase1 CD39*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2008. **64**(Pt 11): p. 1063-5.
685. Haystead, T.A., *The purinome, a complex mix of drug and toxicity targets*. Curr Top Med Chem, 2006. **6**(11): p. 1117-27.
686. Volonte, C. and N. D'Ambrosi, *Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters*. FEBS J, 2009. **276**(2): p. 318-29.
687. Gendron, F.P., O. Benrezzak, B.W. Krugh, Q. Kong, G.A. Weisman, and A.R. Beaudoin, *Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition*. Curr Drug Targets, 2002. **3**(3): p. 229-45.
688. Gendron, F.P., E. Halbfinger, B. Fischer, M. Duval, P. D'Orleans-Juste, and A.R. Beaudoin, *Novel inhibitors of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases: chemical synthesis and biochemical and pharmacological characterizations*. J Med Chem, 2000. **43**(11): p. 2239-47.
689. Escalada, A., P. Navarro, E. Ros, J. Aleu, C. Solsona, and M. Martin-Satue, *Gadolinium inhibition of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in Torpedo electric organ*. Neurochem Res, 2004. **29**(9): p. 1711-4.
690. Reutershan, J., I. Vollmer, S. Stark, R. Wagner, K.C. Ngamsri, and H.K. Eltzschig, *Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs*. FASEB J, 2009. **23**(2): p. 473-82.
691. Eckle, T., L. Fullbier, M. Wehrmann, J. Khoury, M. Mittelbronn, J. Ibla, P. Rosenberger, and H.K. Eltzschig, *Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8127-37.
692. Granstein, R.D., *The skinny on CD39 in immunity and inflammation*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 336-8.
693. Suh, B.C., J.S. Kim, U. Namgung, H. Ha, and K.T. Kim, *P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6754-63.
694. Pfeiffer, Z.A., A.N. Guerra, L.M. Hill, M.L. Gavala, U. Prabhu, M. Aga, D.J. Hall, and P.J. Bertics, *Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(10): p. 1506-16.
695. Kim, S.Y., J.H. Moon, H.G. Lee, S.U. Kim, and Y.B. Lee, *ATP released from beta-amyloid-stimulated microglia induces reactive oxygen species production in an autocrine fashion*. Exp Mol Med, 2007. **39**(6): p. 820-7.
696. Hyman, M.C., D. Petrovic-Djergovic, S.H. Visovatti, H. Liao, S. Yanamadala, D. Bouis, E.J. Su, D.A. Lawrence, M.J. Broekman, A.J. Marcus, and D.J. Pinsky, *Self-regulation of inflammatory cell trafficking in mice by the leukocyte surface apyrase CD39*. J Clin Invest, 2009.

697. Adriouch, S., S. Hubert, S. Pechberty, F. Koch-Nolte, F. Haag, and M. Seman, *NAD<sup>+</sup> released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo*. *J Immunol*, 2007. **179**(1): p. 186-94.
698. Adriouch, S., P. Bannas, N. Schwarz, R. Fliegert, A.H. Guse, M. Seman, F. Haag, and F. Koch-Nolte, *ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site*. *FASEB J*, 2008. **22**(3): p. 861-9.
699. Hong, S., A. Brass, M. Seman, F. Haag, F. Koch-Nolte, and G.R. Dubyak, *Lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IFN-beta induce expression of the thiol-sensitive ART2.1 Ecto-ADP-ribosyltransferase in murine macrophages*. *J Immunol*, 2007. **179**(9): p. 6215-27.
700. Hong, S., A. Brass, M. Seman, F. Haag, F. Koch-Nolte, and G.R. Dubyak, *Basal and inducible expression of the thiol-sensitive ART2.1 ecto-ADP-ribosyltransferase in myeloid and lymphoid leukocytes*. *Purinergic Signal*, 2009. **5**(3): p. 369-83.
701. Li, X., L. Zhou, Y.H. Feng, F.W. Abdul-Karim, and G.I. Gorodeski, *The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(10): p. 1906-13.
702. White, N., P.E. Butler, and G. Burnstock, *Human melanomas express functional P2X(7) receptors*. *Cell Tissue Res*, 2005. **321**(3): p. 411-8.
703. Parvatheni, L.K., S. Tertysnikova, C.R. Greco, S.B. Roberts, B. Robertson, and R. Posmantur, *P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(15): p. 13309-17.
704. Lucae, S., D. Salyakina, N. Barden, M. Harvey, B. Gagne, M. Labbe, E.B. Binder, M. Uhr, M. Paez-Pereda, I. Sillaber, M. Ising, T. Bruckl, R. Lieb, F. Holsboer, and B. Muller-Myhsok, *P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(16): p. 2438-45.



## Annexe 1 Liste des publications

### Première partie:

1. *Bigonnesse, F., Lévesque, S. A., Kukulski, F., Fernandes, M. J., Lecka, J., Robson, S. C., Sévigny, J.* (2004) "Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8." *Biochemistry* **43**(18): 5511-5519. (Chapitre 2)
2. *Lavoie, E. G., Kukulski, F., Lévesque, S. A., Lecka, J., Sévigny, J.*, (2005) "Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3." *Biochem Pharmacol* **67**(10): 1917-1926.
3. *Kukulski, F., S. A. Lévesque, et al.* (2005). "Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8." *Purinergic Signal* **1**(2): 193-204. (Chapitre 3)
4. *Nahum, V., Tulapurkar, M., Lévesque, S. A., Sévigny, J., Reiser, G., Fischer, B.* (2006) "Diadenosine and diuridine poly(borano)phosphate analogues: synthesis, chemical and enzymatic stability, and activity at P2Y1 and P2Y2 receptors." *J Med Chem* **49**(6): 1980-1990.
5. *Sharon, E., Lévesque, S. A., Munkonda, M. N., Sévigny, J., Ecke, D., Reiser, G., Fischer, B.* (2006) "Fluorescent N2,N3-epsilon-adenine nucleoside and nucleotide probes: synthesis, spectroscopic properties, and biochemical evaluation." *Chembiochem* **7**(9): 1361-1374.
6. *Fausther, M., Lecka, J., Kukulski, F., Lévesque, S. A., Pelletier, J., Zimmermann, H., Dranoff, J. A., Sévigny, J.* (2007) "Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**(3): G785-795.
7. *Iqbal, J., Lévesque, S. A., Sévigny, J., Muller, C. E.* (2008) "A highly sensitive CE-UV method with dynamic coating of silica-fused capillaries for monitoring of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase reactions." *Electrophoresis* **29**(17): 3685-3693.
8. *Lévesque, S. A., Munkonda, M. N., Saucier, D., Lavoie, E. G., Sévigny, J.* (2009) "What new can be learned about NTPDases from alkaline phosphatase inhibitors tetramisole and levamisole?" (rédaction en cours)

### Deuxième partie:

9. *Lévesque, S. A., E. G. Lavoie, et al.* (2007). "Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases." *Br J Pharmacol* **152**(1): 141-150. (Chapitre 4)
10. *Munkonda, M. N., Kauffenstein, G., Kukulski, F., Lévesque, S. A., Legendre, C., Pelletier, J., Lavoie, E. G., Lecka, J., Sévigny, J.* (2007) "Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists." *Biochem Pharmacol* **74**(10): 1524-1534.

Troisième partie:

11. *Kukulski, F.*, Ben Yebdri, F., Lecka, J., Kauffenstein, G., **Lévesque, S. A.**, Martin-Satué, M., Sévigny, J. (2009) "Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration." *Cytokine* **46**(2): 166-170.
12. **Lévesque, S. A.**, F. Kukulski, S. C. Robson, J. Sévigny. (2009) "NTPDase1 regulates P2X7 dependant functions on murine macrophages." *Eur J Immunol sous presse* (Chapitre 5).
13. *Kukulski F.*, F. Ben Yebdri, **S.A. Lévesque**, M. Martin-Satué, J. Sévigny (2010) "PPADS, a P2 receptor antagonist, inhibits LPS-induced neutrophil migration in the murine air pouch model." *Mol. Immunol.* **47**(4): 833-839.

Le premier, ou co-premier, auteur est en italique.



## Annexe 2 Liste des présentations

### Orales:

(Le présentateur est souligné)

1. Braganhol E., F. Kukulski, **S.A. Lévesque**, F. Bahrami, A.M.O. Battastini, J. Sévigny. (2008) "Extracellular nucleotides stimulate IL-8 and MCP-1 secretion in U251MG glioma cell line". 7e Journée Scientifique du CRRRI (local symposium), Manoir Montmorency, Québec, Canada. Abstract book p. 9.
2. **Lévesque, S.A.**, F. Kukulski, P. Préfontaine-Racine, J. Sévigny (2007) "La NTPDase1 module la relâche d'Il-1 $\beta$  par les macrophages murins en contrôlant l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub>". 6e Journée Scientifique du CRRRI (local symposium), Manoir Montmorency, Québec, Canada. Abstract book p. 14.
- ↳ 3<sup>ème</sup> place pour une présentation orale
3. **Lévesque, S.A.**, F. Kukulski, J. Sévigny. (2007) "La NTPDase1 module la mort et la relâche d'Il-1 $\beta$  induites par le récepteur aux nucléotides P2X<sub>7</sub> chez le macrophage murin". 9<sup>e</sup> journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Québec, QC, Canada.
4. Fischer, B., E. Sharon, **S. Lévesque**, M.N. Munkonda, J. Sévigny, D. Ecke, G. Reiser (2006) "Fluorescent N<sup>2</sup>,N<sup>3</sup>- $\epsilon$ -Adenine Nucleotide Probes for the Exploration of P2Y-receptors and NTPDases". 8<sup>th</sup> International Symposium of adenosine and adenine nucleotides." Università degli Studi di Ferrara, Italy *Purinergic Signalling* 2 (2): 137.
5. Sévigny, J., F. Ben Yebdri, M. Fausther, G. Kauffenstein, F. Kukulski, E.G. Lavoie, J. Łęcka, **S.A. Lévesque**, M.N. Munkonda, J. Pelletier (2006) "Co-ordinated regulation of P2-receptor signaling by membrane bound NTPDases". 8<sup>th</sup> International Symposium of adenosine and adenine nucleotides." Università degli Studi di Ferrara, Italy *Purinergic Signalling* 2 (2): 53.
6. Kukulski, F., **S.A. Lévesque**, J. Sévigny. (2004) "Les nucléotides extracellulaires sont responsables de la migration des neutrophiles induite par LPS." 3e Journée Scientifique du CRRRI (symposium local), Manoir Montmorency, Québec, Canada, p. 14.
7. Kukulski, F., **S.A. Lévesque**, J. Sévigny. (2004) "Les nucléotides extracellulaires sont responsables de la migration des neutrophiles induite par LPS." 46<sup>ème</sup> Réunion annuelle CRCQ, Hôtel Val-des-Neiges, Mont Ste-Anne, Québec, Canada. Exposé #111. *Med. Sci.* 20: Suppl. No 2: 23.
8. **Lévesque, S.A.**, F. Kukulski, F. Bigonnesse, J. Łęcka, J. Sévigny. (2003) "Clonage et caractérisation d'une nouvelle ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase8)". 2e Journée Scientifique du CRRRI (symposium local), Manoir Montmorency, Québec, Canada.
9. Lavoie, É., F. Kukulski, **S. Lévesque**, J. Łęcka, J. Sévigny (2003) "Clonage et Caractérisation de nucléoside triphosphate diphosphohydrolases murines". 45<sup>ème</sup>

Réunion annuelle, Manoir des Sables, Orford, QC, Canada. Exposé #128. *Med. Sci.* 19: Suppl. No 2: 8.

10. Nahum, V., G. Zundorf, **S.A. Lévesque**, G. Reiser, A.R. Beaudoin, B. Fischer. (2002) "5'-O-(1-Boranotriphosphate)-adenosine derivatives as novel P2Y<sub>1</sub>-receptor agonists". 3<sup>rd</sup> international workshop on ecto-ATPases and other related ecto-nucleotidases. Woods Hole, MA, USA. Abstract #96.

## Affiches:

(Le présentateur est souligné)

1. Ben Yebdri F., F. Kukulski, **S.A. Lévesque**, M. Martin-Satué, J. Sévigny (2009) "The P2 receptor antagonist PPADS inhibits LPS-induced migration in the murine air pouch model". 11<sup>e</sup> Journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval (local symposium). Québec, QC, Canada. Abstract #103.
2. Ben Yebdri F., F. Kukulski, **S.A. Lévesque**, M. Martin-Satué, J. Sévigny (2008) "The P2 receptor antagonist PPADS inhibits LPS-induced migration in the murine air pouch model". 7<sup>e</sup> Journée Scientifique du CRRI (local symposium), Manoir Montmorency, Québec, Canada. Abstract book p. 29.
- 3<sup>ème</sup> place pour une présentation par affiche par un étudiant au Ph.D. à l'FBY.
3. Braganhol E., F. Kukulski, **S.A. Lévesque**, F. Bahrami, A.M.O. Battastini & **J. Sévigny**. (2008) Extracellular nucleotides stimulate IL-8 and MCP-1 secretion in U251MG glioma cell line. 7<sup>e</sup> journée scientifique du CRRI. Manoir Montmorency, Québec, Canada Abstract book p. 9.
4. Łęcka J., S.E. Eliahu, **S.A. Lévesque**, B. Fischer, J. Sévigny (2008) "In search of specific inhibitors of e-npp members". 7<sup>e</sup> Journée Scientifique du CRRI (local symposium), Manoir Montmorency, Québec, Canada. Abstract book p. 25.
5. Saucier D., **S.A. Lévesque**, J. Sévigny (2008) "Découverte d'une inhibition des NTPDases par un inhibiteur d'autres enzymes". Séance d'affiche et remise d'attestation du Collègue François-Xavier-Garneau, Québec, Canada.
6. Lévesque S. A., F. Kukulski, J. Sévigny (2008) "NTPDase1 modulates P2X<sub>7</sub> responses in murine peritoneal macrophages". 5<sup>th</sup> Symposium on Nucleosides and Nucleotides (Purines 2008), Copenhague, Danemark. *Purinergic Signalling* 4(Suppl 1): S109.
7. Łęcka J., M.N. Munkonda, M. Fausther, É.G. Lavoie, G. Kauffenstein, **S.A. Lévesque**, I. Kogan, J. Pelletier, A. Tremblay, M. Singh Rana<sup>1</sup>, V.V. Ivanenkov, T.L. Kirley, B. Fischer, J. Sévigny. (2008) "Specific NTPDases' inhibitors". 5<sup>th</sup> Symposium on Nucleosides and Nucleotides (Purines 2008), Copenhague, Danemark. *Purinergic Signalling* 4(Suppl 1): S108.
8. Lévesque S. A., F. Kukulski, P. Préfontaine-Racine et J. Sévigny. (2008) "La NTPDase1 module la relâche d'Il-1 $\beta$  par les macrophages murins en contrôlant l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub>". 10<sup>e</sup> Journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Québec, QC, Canada.



9. Préfontaine-Racine P., S.A. Lévesque, J. Sévigny (2007) "Initiation aux techniques expérimentales utiles à l'étude d'enzymes impliquées dans l'inflammation, les ectonucléotidases". Séance d'affiche et remise d'attestation du Collègue François-Xavier-Garneau, Québec, Canada.
10. Iqbal, J., S.A Lévesque, J. Sévigny, C. Mueller. (2007) "A novel, highly sensitive capillary electrophoresis method for monitoring ecto-nucleotide pyrophosphatases". German-Italian Purine Receptor Meeting, 2<sup>nd</sup> Joint Italian-German Purine Club Meeting, Leipzig, Germany.
11. Lévesque, S.A., E.G. Lavoie, J. Łęcka, F. Bigonnesse, J. Sévigny. (2007) "Spécificité d'inhibition des ecto-nucléotidases par l'ARL 67156, un inhibiteur des ecto-ATPases". 9<sup>e</sup> journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Québec, QC, Canada. Abstract #141.
12. Lévesque, S.A., F. Kukulski, J. Sévigny. (2006) "La NTPDase1 module la mort induite par le récepteur au nucléotide P2X<sub>7</sub> chez le macrophage murin". 5<sup>e</sup> journée scientifique du Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie. Québec, QC, Canada. Abstract#17.  
 ➤ 2<sup>ième</sup> place pour une présentation par affiche par un étudiant au Ph.D.
13. Kukulski, F., F. Ben Yebdri, S.A. Lévesque, P.A. Tessier, J. Sévigny. (2006) "Nucleotides mediate LPS-induced neutrophil migration in the murine air pouch model". 5<sup>e</sup> journée scientifique du Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie. Québec, QC, Canada. Abstract #3.
14. Munkonda, M.N., S.A. Lévesque, F. Kukulski, C. Legendre, J. Łęcka, J. Sévigny. (2006). "Effet des antagonistes des récepteurs P2 sur les ectonucléotidases humaines". 8<sup>e</sup> Journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Québec, QC, Canada. Abstract #14, p.95.
15. Fausther, M., J. Łęcka, F. Kukulski, J. Pelletier, S.A. Lévesque, H. Zimmermann, J. Dranoff, J. Sévigny. (2006). "Clonage et identification de l'ecto-ATPase majeure du foie comme la NTPDase8". 8<sup>e</sup> Journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Québec, QC, Canada. Abstract #122, p. 139.
16. B. Fischer, V. Nahum, M. Tulapurkar, G. Reiser, S.A. Lévesque, J. Sévigny (2006) "Boranophosphate isosteres of dinucleoside polyphosphates are highly potent and selective P2Y<sub>1</sub>-receptor agonists". 8<sup>th</sup> International Symposium of adenosine and adenine nucleotides." Università degli Studi di Ferrara, Italy. *Purinergic Signalling* 2(2): 214.
17. M. Fausther, J. Łęcka, F. Kukulski, J. Pelletier, S.A. Lévesque, H. Zimmermann, J. Dranoff, J. Sévigny (2006) "Cloning and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8". 8<sup>th</sup> International Symposium of adenosine and adenine nucleotides." Università degli Studi di Ferrara, Italy. *Purinergic Signalling* 2(2): 152.
18. S.A. Lévesque, F. Bigonnesse, J. Sévigny. (2006) "Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on major ecto-nucleotidases". 8<sup>th</sup> International Symposium of adenosine and adenine nucleotides. Università degli Studi di Ferrara, Italy. *Purinergic Signalling* 2(2): not published, abstract 74.



19. Munkonda, M.N., **S.A. Lévesque**, F. Kukulski, C. Legendre, J. Łęcka, J. Sévigny. (2006) "Effect of P2 receptor antagonists on human ecto-nucleotidases". 8<sup>th</sup> International Symposium of adenosine and adenine nucleotides. Università degli Studi di Ferrara, Italy. *Purinergic Signalling* 2(2): 187.
20. Kukulski, F., F. Ben Yebdri, J. Lefebvre, **S.A. Lévesque**, J. Sévigny. (2006) "Extracellular nucleotides mediate LPS-induced IL-8 release from monocytes and neutrophil migration". Experimental Biology 2006. Moscone Convention Centre. San Francisco, CA, USA. *FASEB J.* 20(4): A203 Part 1.
21. Kukulski, F., F. Ben Yebdri, J. Lefebvre, **S.A. Lévesque**, P. Borgeat, J. Sévigny (2005). "Extracellular nucleotides mediate both LPS-induced IL-8 release from monocytes and neutrophil migration". 4<sup>e</sup> Journée scientifique du Centre de recherche en rhumatologie et immunologie. Beauport, QC, Canada. Abstract #8, p.31.
22. Munkonda, M.N., **S.A. Lévesque**, C. Legendre, J. Łęcka, J. Sévigny (2005). "Les antagonistes des récepteurs P2 agissent aussi sur les NTPDases." 4<sup>e</sup> Journée scientifique du Centre de recherche en rhumatologie et immunologie. Beauport, QC, Canada. Abstract #12.
23. Munkonda, M.N., **S.A. Lévesque**, C. Legendre, J. Łęcka, J. Sévigny (2005). "Identification et caractérisation des inhibiteurs des nucléosides triphosphates diphosphohyrolases (NTPDases)." 7<sup>e</sup> Journée de la recherche de la faculté de médecine de l'Université Laval, Québec, QC, Canada. Abstract #63, p. 102.
24. Fausther, M., J. Łęcka, J. Pelletier, **S.A. Lévesque**, J.A. Dranoff, J. Sévigny (2005). "L'ecto-ATPase des canalicules hépatiques correspond à la nouvelle ecto-nucléotidase NTPDase8." 7<sup>e</sup> Journée de la recherche de la faculté de médecine de l'Université Laval, Québec, QC, Canada. Abstract #142, p. 128.
25. Łęcka, J., F. Kukulski, **S.A. Lévesque**, J. Pelletier, É.G. Lavoie, G. Kauffenstein, J. Sévigny (2005). "La NTPDase 1 influence la thérapie au méthotrexate." 7<sup>e</sup> Journée de la recherche de la faculté de médecine de l'Université Laval. Sainte-Foy, Québec, QC, Canada. Abstract #206, p. 148.
26. **S.A. Lévesque**, C. Legendre, J. Łęcka, J. Sévigny. (2005) "Effect of P2 receptor antagonists and potential inhibitors on plasma membrane NTPDases." Digestive Diseases week (DDW), Chicago, IL, USA. *Gastroenterology* 128(4): A359-A359 Suppl. 2.
27. Fausther, M., J. Łęcka, **S.A. Lévesque**, J. Pelletier, J. Dranoff, J. Sévigny (2005). "Identification of the long-know canalicular ecto-ATPase as the novel ecto-nucleotidase NTPDase8." Digestive Disease Week (DDW). Chicago, IL, USA. *Gastroenterology* 128(4): A754-A754 Suppl. 2.
28. Sévigny, J., F. Kukulski, **S.A. Lévesque**, É.G. Lavoie, J. Łęcka, J. Pelletier (2005) "Role of nucleotides and ecto-nucleotidases/NTPDases in inflammation." 1<sup>st</sup> CIHR Institute of Infection and Immunity's New Investigators' Forum. Kingbridge Centre, King City, ON, Canada. p. 99.
29. **Lévesque, S.A.**, C. Legendre, J. Łęcka, J. Sévigny (2004) "Inhibition de l'activité des NTPDases membranaires par des antagonistes de récepteurs P2 et autres inhibiteurs." 3<sup>e</sup>



- Journée scientifique du CRRRI. Manoir Montmorency, Québec, QC, Canada. Abstract #18, p. 44.
30. Kukulski, F., É.G. Lavoie, **S.A. Lévesque**, J. Łęcka, J. Sévigny. (2004) "Comparaison de l'hydrolyse des nucléotides par les ecto-nucléotidases NTPDase1, 2, 3 et 8." 3<sup>e</sup> Journée scientifique du CRRRI. Manoir Montmorency, Québec, QC, Canada. Abstract #14.
  31. Kukulski, F., **S.A. Lévesque**, J. Sévigny. (2004) "Extracellular nucleotides mediate LPS-induced neutrophil migration." Wyeth Pharmaceuticals Research Day, 1025 Boulevard Marcel Laurin, St. Laurent, Montréal, QC, Canada.
  32. **Lévesque, S.A.**, C. Legendre, J. Łęcka, J. Sévigny (2004) "Caractérisation d'inhibiteurs des NTPDases." 46<sup>e</sup> Réunion annuelle du Club de recherches cliniques du Québec (CRCQ), Hôtel Val-des-Neiges, Mont Ste-Anne, Québec, QC, Canada. *Med. Sci.* 20: Suppl. No 2: 12.
  33. Kukulski, F., É.G. Lavoie, **S.A. Lévesque**, J. Łęcka, J. Sévigny (2004) "Comparaison de l'hydrolyse des nucléotides par les ecto-nucléotidases NTPDase1, 2, 3 et 8." 46<sup>e</sup> Réunion annuelle du Club de recherches cliniques du Québec (CRCQ), Hôtel Val-des-Neiges, Mont Ste-Anne, Québec, QC, Canada. Abstract #46. *Med. Sci.* 20: Suppl. No 2: 12.
  34. Kukulski, F., **S.A. Lévesque**, J. Sévigny. (2004) "Extracellular nucleotides mediate LPS-induced neutrophils migration." 4<sup>th</sup> Symposium on Nucleosides and Nucleotides (Purines 2004), Chapel Hill, NC, USA. Abstract #7M.
  35. Kukulski, F., É.G. Lavoie, **S.A. Lévesque**, J. Łęcka, J. Sévigny (2004) "Comparative hydrolysis of nucleotides by the ectonucleotidases NTPDase1, 2, 3 and 8." 4<sup>th</sup> Symposium on Nucleosides and Nucleotides (Purines 2004), Chapel Hill, NC, USA. Abstract #32M.
  36. **Lévesque, S.A.**, J. Łęcka, F. Kukulski, F. Bigonnesse, J. Sévigny. (2004) "Cloning and characterization of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8." 4<sup>th</sup> Symposium on Nucleosides and Nucleotides (Purines 2004), Chapel Hill, NC, USA. Abstract #33M.
  37. Lavoie É.G., F. Kukulski, **S.A. Lévesque**, J. Łęcka, F. Bigonnesse, J. Sévigny. (2004) "Characterization and distribution of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolyse-3." 4<sup>th</sup> Symposium on Nucleosides and Nucleotides (Purines 2004), Chapel Hill, NC, USA. Abstract #34M
  38. Kukulski, F., É. Lavoie, **S.A. Lévesque**, J. Łęcka, J. Sévigny. (2004) Comparaison de l'hydrolyse des nucléotides par les ecto-nucléotidases NTPDase 1, 2, 3 et 8. 6<sup>e</sup> journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Université Laval, Québec, QC, Canada. Abstract #97.
  39. Kukulski, F., **S.A. Lévesque**, J. Sévigny. (2004) Les nucléotides extracellulaires sont responsables de la migration des neutrophiles induite par les LPS. 6<sup>e</sup> journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Université Laval, Québec, QC, Canada. Abstract #98.
  40. **Lévesque, S.A.**, F. Kukulski, J. Łęcka, F. Bigonnesse, J. Sévigny. (2004) Clonage et caractérisation d'une nouvelle ecto-nucléotidase. 6<sup>e</sup> Journée de la recherche de la



Faculté de médecine de l'Université Laval. Université Laval, Québec, QC, Canada. Abstract #136.

41. Lavoie, É., F. Kukulski, **S.A. Lévesque**, J. Lecka, F. Bigonnesse, J. Sévigny. (2004) Caractérisation et distribution de la nucléoside triphosphate diphosphohydrolase-3 de souris. 6<sup>e</sup> Journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Université Laval, Québec, QC, Canada. Abstract #29.
  42. Lavoie, É., F. Kukulski, **S.A. Lévesque**, J. Łęcka, F. Bigonnesse, J. Sévigny. (2003) Clonage et caractérisation de nucléosides triphosphates diphosphohydrolases murines. 2<sup>e</sup> Journée Scientifique du CRRI (symposium local), Manoir Montmorency, Québec, QC, Canada. Abstract #2.
  43. **Lévesque, S.**, F. Kukulski, F. Bigonnesse, J. Sévigny. (2003) "Clonage et caractérisation d'une nouvelle ecto-nucléotidase." 2<sup>e</sup> Journée Scientifique du CRRI (local symposium), Manoir Montmorency, Québec, QC, Canada. Abstract #14.
  44. **Lévesque, S.**, F. Kukulski, F. Bigonnesse, J. Sévigny. (2003) "Clonage et caractérisation d'une nouvelle ecto-nucléotidase." 45<sup>e</sup> Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), Manoir des Sables, Orford, Québec, QC, Canada. Abstract #20 *Med. Sci.* 19: Suppl. No 2: 8.
- En nomination for le prix « Hans Selye » remis à la meilleure présentation par affiche.
45. **Lévesque, S.**, F. Kukulski, F. Bigonnesse, J. Sévigny. (2003) "Caractérisation d'une nouvelle ecto-nucléotidase." 4<sup>e</sup> Journée de la recherche, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada. Abstract #107.
  46. Lavoie, E., F. Kukulski, **S. Lévesque**, J. Łęcka, J. Sévigny. (2003) "Clonage et caractérisation de nucléosides triphosphates diphosphohydrolases murines." 4<sup>e</sup> Journée de la recherche, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada. Abstract #23.
  47. Sévigny, J., F. Bigonnesse, **S. Lévesque**, F. Kukulski, J. Łęcka, É. Lavoie, J. Pelletier. (2002) "Molecular and functional characterization of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases." CIHR institute of genetics new principal investigators meeting. Briars Resort and Conference Centre, Jackson's Point, ON, Canada. Abstract #69
  48. Sévigny, J., F. Bigonnesse, J. Łęcka, **S. Lévesque**, J. Pelletier, S.C. Robson. (2002) "Cloning of the hepatic canalicular ecto-ATPase : Identification as a novel nucleoside triphosphate diphosphohydrolase." 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Boston, MA, USA. *Hepatology* 36 (4) Part 2 Suppl.: 292.
  49. Bigonnesse, F., **S. Lévesque**, F. Kukulski, J. Pelletier, J. Sévigny. (2002). "Clonage de l'ecto-ATPase des canalicules hépatiques : identification et caractérisation d'une nouvelle nucléoside triphosphate diphosphohydrolase." 1<sup>ère</sup> Journée scientifique du Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie (CRRI; symposium local), Château Bonne Entente, Québec, QC, Canada. Abstract #4.
  50. **Lévesque, S.A.**, V. Nahum, G. Zundorf, G. Reiser, A.R. Beaudoin, B. Fischer. (2002) "Les dérivés 5'-O-(1-Boranotriphosphate)-adénosine comme nouveaux agonistes pour les récepteurs P2Y<sub>1</sub>." 1<sup>ère</sup> Journée scientifique du Centre de Recherche en Rhumatologie



et Immunologie (CRRRI; symposium local), Château Bonne Entente, Québec, QC, Canada. Abstract #2.

51. Benrezzak, O., **S. Lévesque**, A.R. Beaudoin. (2002) "New tools to control the immune response: NTPDase inhibitors." 3<sup>rd</sup> International workshop on ecto-ATPases and other related ecto-nucleotidases Woods Hole, MA, USA. Abstract #65.
52. Sévigny, J., F. Bigonnesse, N. Braun, **S. Lévesque**, J. Łęcka, M.J. Fernandes, C. Sundberg, J.A. Dranoff, J. Pelletier, E. Csizmadia, H. Zimmermann, S. C. Robson. (2002) "Distinct localization of nucleoside triphosphate diphospho-hydrolase-1, 2 and 8 in mammalian tissues." 3<sup>rd</sup> International workshop on ecto-ATPases and other related ecto-nucleotidases. Woods Hole, MA, USA. Abstract #35.
53. Nahum, V., G. Zundorf, **S.A. Lévesque**, G. Reiser, A.R. Beaudoin, B. Fischer. (2002) "5'-O-(1-Boranotriphosphate)-adenosine derivatives as novel P2Y<sub>1</sub>-receptor agonists." 3<sup>rd</sup> International workshop on ecto-ATPases and other related ecto-nucleotidases. Woods Hole, MA, USA. Abstract #96.

*Le savoir a un prix, mais si le prix a été  
honoré, alors le savoir sera accompagné  
d'une meilleure connaissance de soi.*