

MICHEL FAUSTHER

**CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DES
NTPDASE1, NTPDASE2, NTPDASE8 ET DE L'ECTO-
5'-NUCLÉOTIDASE HÉPATIQUES**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE-INFECTIOLOGIE ET IMMUNOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

© Michel Fausther, 2009

Résumé

Le foie possède une forte activité d'hydrolyse de l'ATP extracellulaire associée aux canalicules biliaires qui a longtemps été utilisée comme marqueur de cette structure. Jusqu'à récemment, peu d'information était disponible quant à la nature exacte de cette activité. Le clonage d'une nouvelle ectonucléotidase fortement exprimée dans le foie, l'ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase-8 (NTPDase8), suggérait un nouveau candidat potentiel pouvant correspondre à l'ecto-ATPase canaliculaire hépatique. Le premier objectif de mon doctorat était donc de déterminer l'identité moléculaire de la protéine responsable de l'activité ATPasique canaliculaire hépatique. L'ADN complémentaire de la NTPDase8 de rat a été cloné et utilisé pour la caractérisation biochimique de l'enzyme recombinante et la production de sera polyclonaux spécifiques. Les activités ATPase et ADPase hépatiques ont été détectées par histochimie enzymatique et l'expression de la NTPDase8 par immunohistochimie. L'activité ATPase majeure de foie de rat a été purifiée, caractérisée biochimiquement et ses propriétés enzymatiques comparées à celles de la NTPDase8 de rat recombinante. Tous les résultats obtenus démontrent que la NTPDase8 correspond à l'ecto-ATPase canaliculaire. Mon deuxième objectif de doctorat était d'étudier l'influence potentielle des NTPDases et de l'ecto-5'-nucléotidase/CD73 sur les concentrations extracellulaires de nucléotides hépatiques, selon leur localisation cellulaire respective. Les différentes ectonucléotidases exprimées à la surface des cellules hépatiques modulent l'activation des récepteurs de nucléosides P1 et/ou de nucléotides P2, en contrôlant les niveaux extracellulaires de leurs agonistes. Dans le foie, les NTPDases sont responsables majoritairement de l'hydrolyse des nucléotides extracellulaires comme l'ATP et l'ADP alors que l'ecto-5'-nucléotidase génère la principale quantité d'adénosine extracellulaire, à pH physiologique. Les activités ATPase, ADPase et AMPase hépatiques ont été détectées par histochimie enzymatique, et l'expression des NTPDase1, 2 et 8, et de l'ecto-5'-nucléotidase par immunofluorescence. L'expression de l'ecto-5'-nucléotidase a été analysée par cytométrie de flux sur divers types cellulaires hépatiques primaires. Les profils d'hydrolyse de l'ATP en présence de différentes combinaisons NTPDase/ecto-5'-nucléotidase (reflétant la localisation hépatique de ces enzymes) ont été analysés par HPLC. Nos résultats montrent que les niveaux de

nucléo(s/t)ides extracellulaires varient en fonction de la combinaison d'ecto-nucléotidases considérées et de la concentration initiale de substrat ATP extracellulaire.

Abstract

Among all tissues, the liver has one of the highest ATPase activities, which is associated with the bile canaliculi and has accordingly been used as a hepatocellular marker for decades by biologists. However, little information was available regarding the molecular identity of the “so-called” canalicular ecto-ATPase. We have recently cloned and characterized a novel hepatic ectonucleotidase NTPDase8 that we hypothesize to correspond to the canalicular ecto-ATPase. The first objective of my PhD project was to determine the molecular identity of the canalicular ecto-ATPase. The NTPDase8 complementary DNA was cloned and used for the biochemical characterization of the recombinant enzyme as well as the generation of specific polyclonal sera. Liver ATPase and ADPase activities and NTPDase8 expression were detected by enzyme histochemistry and immunolocalization, respectively. The major hepatic ATPase from rat species was purified, biochemically characterized and its enzymatic properties compared to the ones of the recombinant rat NTPDase8. Our results showed that the canalicular ecto-ATPase corresponded to NTPDase8. The molecular identity of the liver canalicular being determined, the second objective of my PhD project was to study the impact of the cellular distribution of the hepatic ectonucleotidases on the levels of neighbouring P1 and P2 receptor agonists. To regulate the extracellular nucleotide signaling pathways, liver cells express various ectonucleotidases at their surface including NTPDase1, 2 and 8, and ecto-5'-nucleotidase/CD73. The latter four ectoenzymes are mainly responsible for the total liver ectonucleotidase activities in physiological conditions. Total liver ATPase, ADPase and AMPase activities were detected by enzyme histochemistry while NTPDase1, 2 and 8, and ecto-5'-nucleotidase expression patterns were determined by immunolocalization. The hepatic ecto-5'-nucleotidase expression was also determined on liver primary cells by flow cytometry. ATP hydrolysis profiles in presence of different combinations of NTPDase with ecto-5'-nucleotidase (mimicking the hepatic distribution of these ectoenzymes) were analyzed by HPLC. Our results show that co-expression of ecto-5'-nucleotidase with hepatic NTPDases in specific cellular or tissular compartments regulates distinctly the levels of extracellular nucleotides and nucleosides.

Avant-Propos

Cette thèse de doctorat comporte deux chapitres de résultats présentés sous forme d'articles scientifiques. Les résultats présentés dans le chapitre 2 ont fait l'objet d'une publication en 2007 dans le journal « *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology* » [1]. En tant que co-auteur principal, j'étais responsable de la rédaction et de la conception des procédures expérimentales avec l'aide des co-auteurs. Mes tâches techniques principales ont été de déterminer : 1) la spécificité des anticorps polyclonaux dirigés contre les NTPDase1 et 8; 2) la distribution des activités ATPase et ADPase hépatiques; et 3) l'expression et la localisation des NTPDase1, 2 et 8 hépatiques (Figures 1 & 2). J'ai aussi effectué la purification des fractions protéiques membranaires hépatiques, en collaboration avec M. Lévesque (Figure 1). J'ai également effectué la purification de la NTPDase8 de rat en collaboration avec les Drs Kukulski et Lecka (Figure 3). Dre Lecka a effectué le clonage et la caractérisation biochimique des NTPDase8 recombinante de rat et humaine (Figure 4). M. Lévesque a également participé à la caractérisation biochimique des formes recombinante et purifiée de la NTPDase8 (Figure 4). Mme Pelletier a produit les anticorps polyclonaux contre les NTPDase1 et 8 utilisés dans cette étude. Dr Kukulski a effectué les calculs de K_m et V_{max} pour la NTPDase8 humaine recombinante (Figure 5). Finalement, Dr Jonathan A. Dranoff (Université Yale) a confirmé les résultats d'immunolocalisation de la NTPDase8 par microscopie à fluorescence. Les résultats présentés dans le chapitre 3 vont faire l'objet d'un article à soumettre en temps utile. En tant qu'auteur principal, j'étais également responsable de la rédaction et de la conception des procédures expérimentales avec l'aide des co-auteurs. Mes tâches principales ont été de déterminer : 1) la spécificité des anticorps polyclonaux dirigés contre l'ecto-5'-nucléotidase/CD73; 2) la distribution des activités ATPase, ADPase et AMPase hépatiques; 3) la localisation comparative des NTPDase1, 2 et 8, et de CD73 par double marquage en immunofluorescence; et 4) les profils d'hydrolyse de l'ATP en présence de différentes combinaisons de CD73 avec chacune des NTPDases hépatiques par HPLC, en collaboration avec Dre Lecka. Mme Pelletier a produit les anticorps polyclonaux contre CD73 utilisés dans cette étude. Dr Soliman (du laboratoire du Dr Dranoff) a réalisé l'analyse de l'expression de CD73 sur différentes populations de cellules hépatiques primaires par cytométrie de flux. Dr Kauffenstein a participé à la mise au point du protocole d'analyse biochimique par HPLC.

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Jean Sévigny pour m'avoir donné l'opportunité de mener dans son laboratoire, mon projet de doctorat sur les ectonucléotidases hépatiques. Ce fut une expérience des plus enrichissantes. Je remercie également le Dre Joanna Lecka pour son aide et sa supervision durant mon projet de doctorat.

Je remercie aussi les chercheurs extérieurs au laboratoire avec qui j'ai eu la chance de collaborer, Dre Mireia Martín-Satué, Dre Maryse Picher, Dre Emmanuelle Rollet, Dre Monique Cadrin, Dr Jonathan A. Dranoff, Dr Bellakomda Kishore, Dr Beat Künzli et Dr Herbert Zimmermann.

Je tiens également à souligner l'importance d'un bon environnement de travail en remerciant tous les membres de mon équipe que j'ai côtoyés durant toutes ces années, François, Sébastien, Julie, Filip, Charlene, Mercedes, Gilles, Fethia, Alain, Fariborz, Cristina, Elizandra et *Élise*. Je voudrais également remercier (sans les nommer) les membres des autres équipes du CRRI que j'ai connus et avec qui j'ai eu l'occasion de travailler ou d'échanger quelques mots.

*À ma famille
Bénédicte, Nancy, Nathalie, Stéphanie, Jacqueline
ma mère Gisèle
et mon père Edmond à Libreville, Gabon*

Table des matières

Sommaire

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Avant-Propos	iv
Remerciements.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations.....	xii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Les nucléotides extracellulaires	1
1.1.1 Les sources de nucléotides et nucléosides extracellulaires.....	4
1.1.2 La réabsorption des nucléosides extracellulaires.....	6
1.2 La signalisation par les nucléotides et nucléosides extracellulaires	8
1.2.1 Les récepteurs P1, sensibles aux nucléosides	8
1.2.2 Les récepteurs P2, sensibles aux nucléotides.....	12
1.2.2.1 Les récepteurs P2X	12
1.2.2.2 Les récepteurs P2Y	15
1.3 Le métabolisme des nucléotides extracellulaires.....	19
1.3.1 Hydrolyse des nucléotides extracellulaires.....	20
1.3.1.1 Les ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) ..	20
1.3.1.2 Les ecto-nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (E-NPPs)....	28
1.3.1.3 Les phosphatases acides (ACPs) et alcalines (APs)	30
1.3.1.4 L'ecto-5'-nucléotidase/CD73	31
1.3.1.5 L'ecto-adénosine désaminase (ecto-ADA).....	35
1.3.2 Régénération des nucléotides extracellulaires	36
1.3.2.1 L'ecto-adénylate kinase (ecto-AK).....	36
1.3.2.2 L'ecto-nucléoside diphosphokinase (ecto-NDP kinase).....	37
1.4 Hypothèse et objectifs.....	39
Chapitre 2 : Identification de l'ecto-ATPase majeure dans le foie : la NTPDase8	42
Résumé.....	43
Abstract.....	44
Introduction.....	45
Materials and Methods.....	46
Results.....	50
Discussion.....	55
Acknowledgements.....	58
Tables and Figures	59
Chapitre 3 : Modulation de la signalisation purinergique par les NTPDases et l'ecto-5'-nucléotidase dans le foie	75
Résumé.....	76
Abstract.....	77
Introduction.....	78

Materials and Methods.....	80
Results.....	84
Discussion.....	89
Acknowledgements.....	92
Figures.....	93
Chapitre 4: Discussion générale.....	101
Bibliographie.....	106
Annexes.....	123
Annexe 1.....	123
Annexe 2.....	125

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques des récepteurs de nucléosides P1.

Tableau 2: Caractéristiques des récepteurs de nucléotides P2X.

Tableau 3: Caractéristiques des récepteurs de nucléotides P2Y.

Tableau 4: Caractéristiques des principales ectonucléotidases membranaires.

Table A1: Alignment of amino acid sequences of the purified porcine canalicular ecto-ATPase/ATPDase with NTPDase8s and chicken ATPDases.

Table A2: Summary table of rat liver NTPDase8 purification.

Table A3: Kinetic parameters of human recombinant NTPDase8.

Liste des figures

- Figure 1: Représentation schématique de la structure des nucléotides.
- Figure 2: Mécanismes potentiels de relâchement de l'ATP au niveau de la membrane d'un épithélium polarisé.
- Figure 3: Représentation schématique de la structure et de la topologie membranaire prédites des récepteurs de nucléosides, P1 et des récepteurs de nucléotides, P2X et P2Y.
- Figure 4: Représentation schématique de la structure et de la topologie membranaire prédites des principales ectonucléotidases.
- Figure A1: Specificity of antibodies to rat NTPDases.
- Figure A2: Cellular localization of ectonucléotidases in rat liver.
- Figure A3: Purification of NTPDase8 from rat liver.
- Figure A4: Catalytic properties of human and rat NTPDase8s, effect of inhibitors.
- Figure A5: Nucleotide hydrolysis and product formation by human recombinant NTPDase8.
- Figure B1: Histochemical detection of liver ectonucléotidase activities.
- Figure B2: Histochemical detection of liver ecto-5'-nucleotidase activity.
- Figure B3: Specificity of the polyclonal antibodies to rat ecto-5'-nucleotidase.
- Figure B4: Comparative distribution of liver NTPDases and ecto-5'-nucleotidase.
- Figure B5: Comparative distribution of liver ecto-5'-nucleotidase with cell markers.
- Figure B6: Flow cytometry analysis of ecto-5'-nucleotidase expression on liver primary cell populations.

Figure B7: ATP hydrolysis profiles of different combinations of ecto-5'-nucleotidase with hepatic NTPDases.

Figure C1: Expression de la NTPDase8 dans l'intestin de rat et la trachée humaine.

Figure C2: Expression de la NTPDase1 et l'ecto-5'-nucléotidase dans le foie chez l'humain et la souris.

Liste des abréviations

μM	Micromolaire
2-Cl-ATP	2-Chloroadénosine-5'-triphosphate
2-MeSADP	2-Méthylthioadénosine-5'-diphosphate
2-MeSATP	2-Méthylthioadénosine-5'-triphosphate
4-MUP	4-méthylumbelliféryl phosphate
5'AMPS	Adénosine-5'-monophosphorothioate
AC	Adénylate cyclase
ACP	Phosphatase acide (<i>acid phosphatase</i>)
ACR	Régions conservées de l'apyrase (<i>apyrase conserved regions</i>)
ADA	Adénosine désaminase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
ADPase	Adénosine-5'-diphosphatase
AK	Adénylate kinase
ALP	Phosphatase alcaline (<i>alkaline phosphatase</i>)
AMP	Adénosine-5'-monophosphate
AMPc	Adénosine-5'-monophosphate cyclique
AOPCP	Adénosine-5'-(α,β -méthylènediphosphate), aussi connu sous le nom de AMP-CP ou α,β -MeADP
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
ATPase	Adénosine-5'-triphosphatase
ATPDase	Adénosine-5'-triphosphate diphosphohydrolase
ATP γ S	Adénosine-5'-(3-thiotriphosphate)
AZT	azidothymidine ou zidovudine
Bz-ATP	Adénosine 5'-triphosphate 3'-(4-benzyl)benzoate
Ca ²⁺	Cation calcium
CCPA	2-chloro-N ⁶ -cyclopentyladénosine
Cd ²⁺	Cation cadmium

CFTR	canal transmembranaire régulateur de la fibrose kystique (<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)
CHA	N ⁶ -cyclohexyladénosine
Cl ⁻	Anion chlorure
CI-IB-MECA	2-Chloro-N ⁶ -(3-iodobenzyl)adénosine-5'-N- méthylcarboxamide
CNT	transporteur à nucléosides concentrant
Co ²⁺	Cation cobalt
ConA	Concanavaline A
CPA	N ⁶ -cyclopentyladénosine
CPX	8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
CTP	Cytosine-5'-triphosphate
Cu ²⁺	Cation cuivre
DBXRM	N-méthyl-1,3-dibutylxanthine-7-b-dribofuronamide
DPA	Dipyridamole
DPCPX	1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>epidermal growth factor</i>)
EHNA	Érythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adénine
E-NPP	Ecto-nucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
ENT	Transporteur à nucléosides équilibrant
E-NTPDase	Ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase
ESTs	Motifs de séquences protéiques exprimées (<i>expressed sequence tags</i>)
Fe ²⁺	Cation fer
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes (<i>fibroblast growth factor</i>)
GPI	Glycosylphosphatidyl inositol
H ⁺	Proton
hATDPase	Adénosine triphosphate diphosphohydrolase hépatique (<i>hepatic adenosine triphosphate diphosphohydrolase</i>)
HDL	Lipoprotéines à haute densité (<i>high density lipoproteins</i>)

Hg ²⁺	Cation mercure
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes (<i>hepatocyte growth factor</i>)
HPLC	Chromatographie en phase liquid à haute performance (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSC	Cellules hépatiques étoilées (<i>hepatic stellate cells</i>)
IDP	Inosine-5'-diphosphate
IFN γ	Interféron gamma
IP ₅ I	Diinosine pentaphosphate
ITP	Inosine-5'-triphosphate
K ⁺	Cation potassium
Li ⁺	Cation lithium
Mg ²⁺	Cation magnésium
mM	Millimolaire
Mn ²⁺	Cation manganèse
Na ⁺	Cation sodium
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBTI	Nitrobenzylthioinosine ou (nitrobenzylmercaptopurine riboside)
NDK	Kinase à nucléoside diphosphate (<i>nucleoside diphosphate kinase</i>)
NDP	Nucléoside diphosphate
NECA	5'-N-éthyl-carboxamidoadénosine
nM	Nanomolaire
Nucléo(s/t)tides	Nucléosides et nucléotides
pH	Potentiel hydrogène
Pi	Phosphate inorganique
PLC β	Isoenzyme bêta de la phospholipase de type C
pNPP	Para-nitrophénolphosphate
pNP-TMP	Para-nitrophényl thymidine 5'-monophosphate

PPADS	Acide pyridoxal-phosphate-6-azophényl-20, 40-disulfonatique
RB2	Réactif bleu numéro 2
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
R-PIA	R-N ⁶ -(phénylisopropyl)-adénosine
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne en transcription inverse (<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>)
TNAP	Phosphatase alcaline non spécifique du tissu
TNF- α alpha	Facteur nécrosant de tumeurs alpha (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TNP-ATP	Trinitrophényl adénosine-5'-triphosphate
UDP	Uridine-5'-diphosphate
UDP β S	Uridine-5'-(2-thiodiphosphate)
UTP	Uridine-5'-triphosphate
UTP γ S	Uridine-5'-(3-thiotriphosphate)
VDAC	Porine (<i>voltage dependent anion channel</i>)
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VSOAC	Porine (<i>volume-sensitive osmolyte and anion channel</i>)
Zn ²⁺	Cation zinc
α,β -MeADP	Voir AOPCP
α,β -MeATP	Adénosine-5'-(α,β -méthylènetriphosphate)

Chapitre 1 : Introduction

Les nucléotides comme l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) [2, 3] sont des molécules multifonctionnelles, essentielles au maintien de l'homéostasie cellulaire. À l'intérieur de la cellule, les nucléotides remplissent plusieurs fonctions incluant la biosynthèse des acides nucléiques, la respiration cellulaire et les voies de signalisation modulées par les kinases et phosphatases cytoplasmiques. On sait maintenant que les nucléotides jouent également un rôle dans la signalisation à l'extérieur de la cellule. En effet, l'identification et le clonage de plusieurs récepteurs membranaires à nucléotides et/ou à nucléosides de même que de plusieurs ectonucléotidases membranaires, dans pratiquement tous les systèmes de l'organisme, ont confirmé l'existence d'une signalisation via les nucléotides extracellulaires. Dans ce contexte, les ectonucléotidases jouent un rôle crucial puisque leurs activités biochimiques modulent les concentrations de nucléotides extracellulaires et donc l'activation de leurs récepteurs spécifiques et les fonctions biologiques associées. Notre intérêt porte notamment sur la physiologie d'une nouvelle classe d'ectonucléotidases, les ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases). Notre objectif principal est d'élucider le(s) rôle(s) que joue(nt) les NTPDases dans le maintien de l'homéostasie cellulaire du foie, en conditions normales et/ou pathologiques.

1.1 Les nucléotides extracellulaires

Par définition, la structure d'un nucléotide est formée par l'association d'une nucléobase ou base azotée (purine ou pyrimidine), d'un sucre à cinq atomes de carbone (ribose ou désoxyribose) et d'un ou plusieurs groupements phosphates, liés au sucre (voir figure 1). Par exemple, l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) représente le nucléotide formé par la liaison d'une adénine, d'un ribose et de trois groupements phosphate en position 5' du ribose. Par contre, un nucléoside désigne un nucléotide dépourvu de groupements phosphates. Ainsi, l'adénosine est le nucléoside constitué uniquement par l'association d'une adénine et d'un ribose.

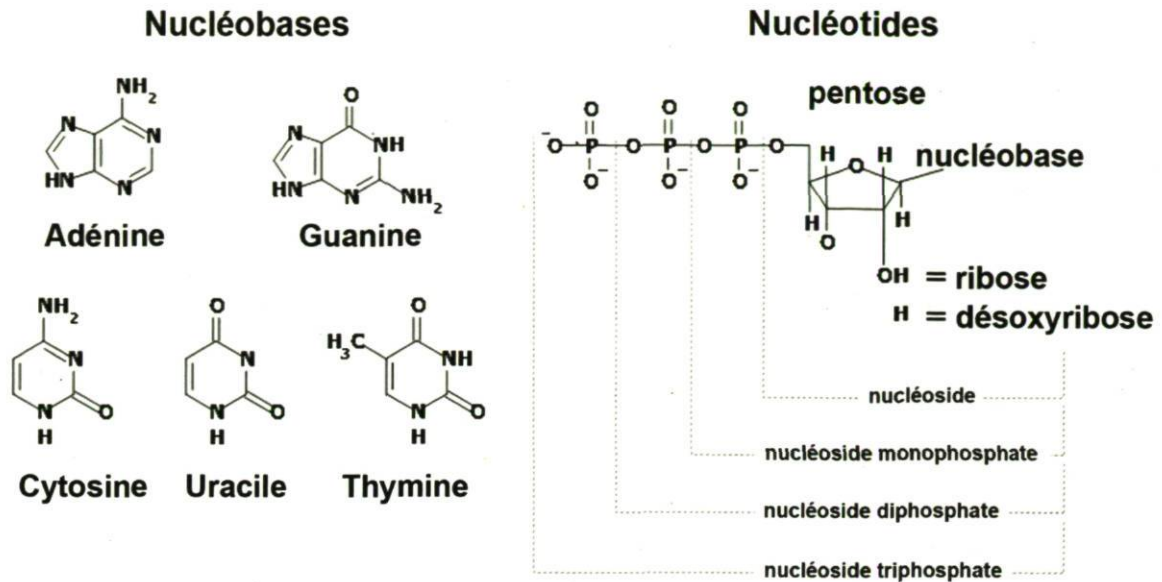


Figure 1 : Représentation schématique de la structure des nucléotides.

Les nucléotides occupent plusieurs fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie au niveau intracellulaire : 1) ils constituent l'unité structurale de base des acides désoxyribonucléique (ADN) et ribonucléique (ARN); 2) ils sont impliqués dans la transduction de signaux intracellulaires, étant les substrats de diverses kinases et phosphatases qui modulent l'activité biologique des protéines-cibles en phosphorylant ou déphosphorylant spécifiquement leurs résidus sérine, thréonine et tyrosine; 3) l'ATP représente la principale source de stockage et de transfert d'énergie cellulaire; 4) l'ATP est nécessaire à la production de plusieurs cofacteurs comme le coenzyme A, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺) et les dérivés de la riboflavine, indispensables pour les réactions d'oxydoréductions cellulaires [4]; et finalement 5) l'ATP, l'ADP, l'UTP et l'UDP sont retrouvés dans les granules de sécrétion de divers types cellulaires spécialisés incluant les plaquettes sanguines et les neurones [5, 6].

Toutefois, les nucléotides jouent aussi plusieurs rôles importants dans la modulation des fonctions homéostatiques, lorsqu'ils se retrouvent à l'extérieur de la cellule. Les premiers éléments étayant cette notion sont rapportés en 1929 par Drury et Szent-Györgyi¹ [7]. Ils

¹ L'ATP a été également découverte en 1929 par Lohman (mars) et l'équipe de Fiske et SubbaRow (octobre) dans des publications séparées.

observent chez divers mammifères que l'injection par voie intraveineuse d'extraits tissulaires de cerveau, cœur, rate et rein déprotéinisés entraîne des modifications des fonctions cardiovasculaire et musculaire, et identifient l'acide adénylique comme le composé actif à l'origine de ces effets. De plus, ils constatent que l'adénosine, préparée à partir d'extraits d'acides nucléiques de levure, produit des effets biologiques semblables. Déjà, ces résultats suggéraient d'une part, la présence d'une signalisation via les nucléotides extracellulaires puisque les nucléotides contenus dans les extraits et injectés dans la circulation peuvent contrôler le fonctionnement des cellules de différents organes; d'autre part, l'existence d'un métabolisme des nucléotides extracellulaires puisque l'adénosine, un dérivé de l'acide adénylique, est également bioactive. Par la suite en 1948, Buchtal et Folkow observent chez la grenouille que l'application préalable d'ATP au niveau de la jonction neuro-musculaire potentialise la contraction musculaire de type cholinergique [8]. À la fin des années 1950, Holton fait la démonstration chez le lapin que l'ATP est relâchée suite à une stimulation antidromique des nerfs sensitifs auriculaires [9]. Puis en 1963, Berne suggère que l'adénosine est un régulateur physiologique du flux coronarien en conditions d'hypoxie [10]. Néanmoins, malgré le nombre croissant de publications, l'existence d'une signalisation par les nucléotides extracellulaires demeure un sujet controversé pendant longtemps, l'ATP étant uniquement considérée par les biochimistes de l'époque comme une source d'énergie intracellulaire. C'est seulement au début des années 1970, lorsque Burnstock introduit le concept de *signalisation purinergique* que le champ de recherche sur les nucléotides extracellulaires va connaître un essor véritable [11, 12]. Dans une série de publications, il va démontrer chez les mammifères, les amphibiens et les oiseaux, que l'ATP joue un rôle de neurotransmetteur au niveau du tractus gastro-intestinal, capable de stimuler les fibres musculaires lisses, indépendamment des systèmes adrénergique et cholinergique. Plus tard en 1978, Burnstock va conforter la théorie de la signalisation par les nucléotides extracellulaires en établissant les premières règles d'identification moléculaire et de classification pharmacologique des récepteurs P1 (à nucléosides) et P2 (à nucléotides) [13]. Depuis lors, le champ de recherche des nucléotides extracellulaires est en expansion continue et plus d'une vingtaine de récepteurs ont été identifiés. Nous allons d'abord voir en détails d'où proviennent ces molécules.

1.1.1 Les sources de nucléotides et nucléosides extracellulaires

De part leur rôle central dans le métabolisme intracellulaire, les nucléo(s/t)ides comme l'adénosine et l'ATP sont des molécules ubiquitaires. Les concentrations de nucléotides mesurées dans le cytoplasme de la plupart des cellules sont de l'ordre du millimolaire (mM) [6, 14-18]. Par exemple dans les hépatocytes, la concentration d'ATP intracellulaire varie entre trois et cinq mM [19]. Donc, chaque cellule de l'organisme constitue implicitement une source potentielle de nucléo(s/t)ides. De plus, les niveaux de nucléotides mesurés à l'équilibre dans les fluides extracellulaires de plusieurs types de cellules primaires ou immortalisées sont de l'ordre du nanomolaire (nM), suggérant l'existence d'un flux de nucléotides du cytoplasme des cellules vers le milieu extérieur [16, 20, 21].

Jusqu'à présent, quatre types de mécanismes ou processus par lesquels les nucléo(s/t)ides sont libérés dans le milieu externe ont été décrits (voir figure 2) [17, 22-24].

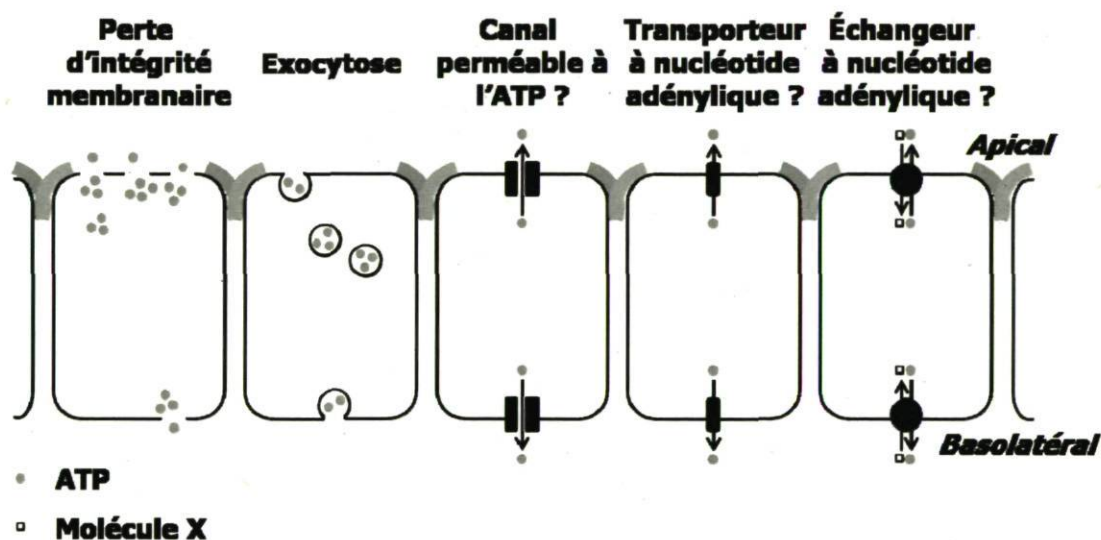
Premièrement, il est accepté que les cellules nécrotiques ou apoptotiques ainsi que les cellules dont la membrane plasmique est endommagée (suite à une lésion) relâchent de manière non contrôlée d'importantes quantités de nucléo(s/t)ides dans le milieu extérieur.

Deuxièmement, l'exocytose des vésicules de sécrétion par les cellules excitables (cellules β pancréatiques, cellules chromaffines, astrocytes, neurones, etc.) [23], ou des granules denses par la majorité des cellules immunes (lymphocytes T/T_C, mastocytes, neutrophiles, macrophages, etc.) et par les plaquettes activées [15] représentent un mode de relâchement des nucléo(s/t)ides extracellulaires bien établi [25]. C'est un processus actif qui utilise le système de transport intracellulaire dépendant de la famille de protéines «*SNARE*».

Troisièmement, la plupart des cellules libèrent des nucléotides dans le milieu extérieur de manière constitutive c'est-à-dire en absence de stimulation [5, 24]. De plus, le relâchement spontanée de nucléotides est également observée lorsque des cellules comme les érythrocytes et/ou les cellules épithéliales sont soumises à divers stress physiologiques comme la pression mécanique (ex: forces de cisaillement créées par le flux vasculaire), le gradient osmotique, ou des conditions non physiologiques voire pathologiques telles l'hypoxie [5, 17]. Par exemple, la stimulation mécanique des cholangiocytes (cellules

épithéliales biliaires) exercée par le flot biliaire entraîne une libération physiologique d'ATP [26].

Finalement, plusieurs types cellulaires suite à une stimulation par un ligand spécifique vont relâcher des nucléotides dans le milieu extérieur. Par exemple, l'apparition d'ATP dans le milieu extracellulaire est observée suite à la stimulation des cellules endothéliales vasculaires par des stimuli physiologiques comme la bradykinine, l'acétylcholine ou la sérotonine [27]. De plus, les hépatocytes exposés aux acides biliaires ursodéoxycholate et tauro-ursodéoycholate relâchent physiologiquement de l'ATP dans la bile [28].



Inspiré de Schwiebert et Zsembery (2003) [22], et de Praetorius et Leipziger (2009) [17].

Figure 2 : Mécanismes potentiels de relâchement de l'ATP au niveau de la membrane d'un épithélium polarisé.

Toutefois, les modes de relâchement spontané, apparemment exclusif aux cellules épithéliales et/ou induite par un stimulus demeurent mal définis. Dans le cas du relâchement spontané, aucune étude n'est parvenue jusqu'à présent à déterminer l'identité du canal ou pore éventuellement responsable de la sortie d'ATP. En revanche en utilisant différentes approches pharmacologiques et moléculaires, plusieurs protéines comme le

canal anionique sensible au volume (ou *volume-sensitive osmolyte and anion channel, VSOAC*), le canal transmembranaire régulateur de la fibrose kystique (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR*), une isoforme membranaire plasmique du canal anionique dépendant du voltage (*voltage-dependent anion channel, VDAC*) mitochondrial, et plus récemment la pannexine-1 ont été identifiées comme des régulateurs potentiels de l'efflux de nucléo(s/t)ides [17, 24].

Dans le cas du relâchement induit par un stimulus, la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire semble constituer une étape importante dans la(les) voie(s) de signalisation activée(s), tel qu'observé dans les lignées de cellules épithéliales rénales MDCK et biliaires Mz-Cha-1 [27]. Néanmoins, la nature véritable des mécanismes impliqués dans le relâchement de nucléotides indépendante de la lyse cellulaire ou de l'exocytose des granules de sécrétion reste à déterminer.

Une fois relâchés par la cellule, les nucléo(s/t)ides peuvent activer des récepteurs membranaires spécifiques ou être hydrolysés par plusieurs familles d'ectonucléotidases présentes à la surface des cellules. Par la suite, les nucléosides générés dérivant principalement de l'hydrolyse des nucléotides peuvent être réabsorbés à l'aide de transporteurs membranaires spécifiques. Nous allons maintenant décrire l'étape de réabsorption qui contribue de manière importante à déterminer la disponibilité des nucléo(s/t)ides dans le milieu extracellulaire.

1.1.2 La réabsorption des nucléosides extracellulaires

Une fois dans le milieu extérieur, les nucléo(s/t)ides vont activer des récepteurs spécifiques présents à la membrane des cellules et exercer leurs fonctions biologiques. Par contre, seuls les nucléosides peuvent traverser la membrane plasmique pour se retrouver dans le cytoplasme. La réabsorption représente ainsi une étape cruciale du métabolisme des purines et des pyrimidines, en assurant le recyclage continu des nucléobases présentes dans le milieu extracellulaire. Les nucléotides extracellulaires vont donc être convertis en nucléosides par les différentes familles d'enzymes de surface appelées ectonucléotidases (*la*

signalisation via les récepteurs et l'hydrolyse seront décrites à la section 1.2). La réabsorption par la cellule des nucléosides ainsi générés se fait via l'action spécifique de deux classes de protéines membranaires ubiquitaires : les transporteurs à nucléosides équilibrants (*equilibrative nucleoside transporter, ENT*) et les transporteurs à nucléosides concentrants (*concentrative nucleoside transporter, CNT*) [29-31].

La première classe de transporteurs est composée de quatre membres (ENT1-4) qui forment un système de diffusion facilitée spécifique aux nucléosides c'est-à-dire qu'ils permettent le mouvement passif de ces molécules de part et d'autre de la membrane plasmique, en fonction de leur gradient de concentration [32]. Les transporteurs ENT1-3 se distinguent biochimiquement par leur perméabilité non sélective pour les nucléobases et les divers nucléosides puriniques et pyrimidiniques. Le transporteur ENT4 est spécifique à l'adénosine. Au niveau pharmacologique, ils sont notamment caractérisés par leur sensibilité variable à la nitrobenzylthioinosine (NBTI) et au dipyridamole (DPA) [32, 33].

La deuxième classe de transporteurs comporte trois membres (CNT1-3) qui constituent un système de symport unidirectionnel dépendant des cations [34]. En d'autres termes, ces transporteurs transfèrent activement les nucléosides du milieu extérieur vers le cytoplasme en utilisant un gradient de force cationique (Na^+ , Li^+ et/ou H^+). Les transporteurs CNT sont caractérisés par leur perméabilité sélective différente pour les divers nucléosides. Alors que le transporteur CNT1 est spécifique à l'adénosine et aux nucléosides pyrimidiniques, l'homologue CNT2 transporte préférentiellement l'uridine et les nucléosides puriniques. Le transporteur CNT3 est non spécifique, étant perméable aux nucléosides puriniques et pyrimidiniques. Au niveau pharmacologique, ces transporteurs sont caractérisés par leur capacité à transporter les analogues de nucléotides synthétiques utilisés dans les traitements anti-viraux et anti-tumoraux tels que la zidovudine (3'-azido-3'-deoxythymidine, AZT) et la formycine B [33, 34].

L'expression de tous les transporteurs à nucléosides a été détectée au niveau transcriptionnel dans le foie, les hépatocytes exprimant spécifiquement les transporteurs ENT1, 2 et CNT1 au niveau de la portion sinusoidale de la membrane plasmique et CNT2 au niveau des canalicules biliaires [31]. L'expression hépatique de plusieurs transporteurs à

nucléosides renforce encore plus l'importance du métabolisme extra- et intracellulaire des nucléo(s/t)ides dans le maintien de l'homéostasie cellulaire générale. En effet, les hépatocytes sont responsables de la biosynthèse *de novo* des purines et des pyrimidines et représentent la source principale de nucléo(s/t)ides exogènes pour les tissus qui sont dépourvus de l'arsenal enzymatique nécessaire pour générer ces molécules [33]. Ainsi dans les cellules de la moelle osseuse, les cellules muqueuses intestinales et les érythrocytes, toutes les fonctions cellulaires associées aux nucléo(s/t)ides dépendent majoritairement de la capacité des hépatocytes à recycler les nucléosides [33, 35-37].

Il a été mentionné, plus haut, que les nucléo(s/t)ides extracellulaires sont capables d'activer différentes voies de signalisation en se liant à des récepteurs spécifiques présents à la membrane des cellules voisines ou de celle dont ils sont issus. Nous allons maintenant présenter ces récepteurs appelés purinorécepteurs² [13], regroupant les récepteurs P1 répondant à l'adénosine uniquement et les récepteurs P2, spécifiques aux nucléotides comme l'ATP.

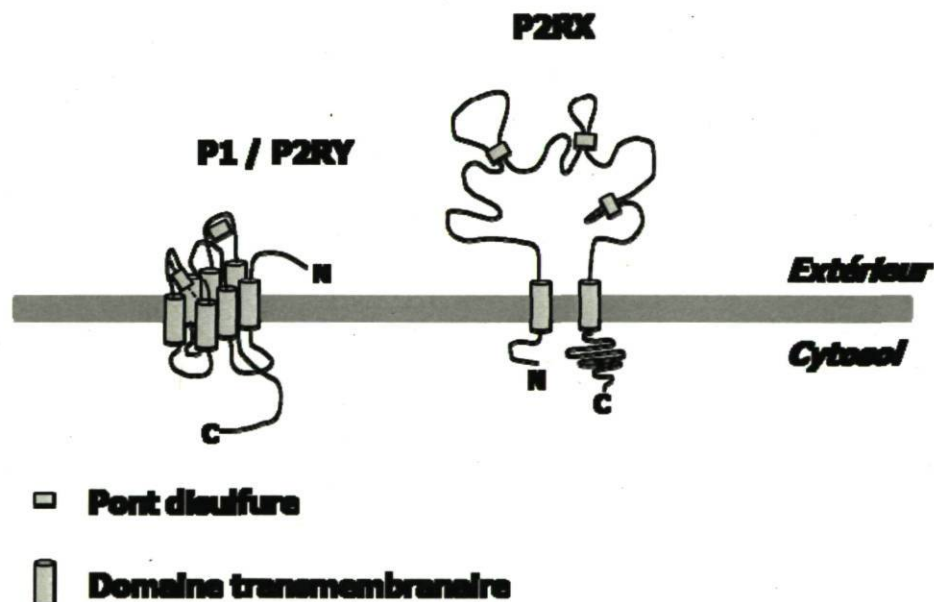
1.2 La signalisation par les nucléotides et nucléosides extracellulaires

1.2.1 Les récepteurs P1, sensibles aux nucléosides

Par définition, les purinorécepteurs P1 sont des récepteurs membranaires ayant pour ligand naturel l'adénosine et dont le mécanisme d'action est dit métabotropique [13, 38, 39]. Le premier sous-type de récepteur P1, A₁ a été cloné à la fin des années 1980. Initialement, il a été identifié chez le chien parmi plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), clonés au moyen d'amorces dégénérées à partir d'une librairie d'ADN complémentaire de cellules de thyroïde [40]. Par la suite, les homologues du récepteur A₁ ainsi que d'autres récepteurs sensibles à l'adénosine ont été identifiés et caractérisés chez l'humain, le rat, la

² L'ATP et l'adénosine étant initialement les molécules les plus souvent étudiées, Burnstock (en 1978) a étendu le terme purinorécepteur à tous les récepteurs de nucléo(s/t)ides extracellulaires, qu'ils soient d'origine purinique ou pyrimidinique.

souris, le lapin et la vache [38, 41]. Il existe quatre sous-types de récepteur de l'adénosine nommément A_1 , A_{2A} , A_{2B} et A_3 ³. Tous les récepteurs P1 sont des récepteurs RCPG de classe A c'est-à-dire des récepteurs possédant une portion N-terminale extracellulaire et une portion C-terminale intracellulaire, séparées par sept passages transmembranaires hydrophobes (reliés par des boucles intra- et extracellulaires) dont la structure tridimensionnelle rappelle celle de la rhodopsine bovine (voir figure 3) [41]. La séquence protéique de chaque récepteur possède des sites de modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, la phosphorylation et la palmitoylation qui peuvent modifier son état d'activation. L'activation des récepteurs P1 par l'adénosine contrôle les niveaux de plusieurs seconds messagers intracellulaires comme l'AMP cyclique (AMPC), l'inositol triphosphate (InsP3), le diacylglycérol (DAG) et la concentration de Ca^{2+} cytosolique [41].



Inspiré de Burnstock (2007) [41].

Figure 3 : Représentation schématique de la structure et de la topologie membranaire prédites des récepteurs de nucléosides P1, et des récepteurs de nucléotides P2X et P2Y.

³ La nomenclature IUPHAR (*International Union of Pharmacology*) actuelle stipule que les récepteurs P1 se subdivisent en récepteurs A_1 , A_{2A} , etc. Il en résulte que l'appellation P1A1, quoiqu'intuitive, est erronée.

De manière générale, l'activation des récepteurs A_{2A} et A_{2B} aboutit à une augmentation de la production d'AMPC intracellulaire alors que l'activation des récepteurs A₁ et A₃ entraîne une diminution (voir tableau 1) [42]. Les récepteurs A₁, A_{2A} et A₃ sont dits de forte affinité parce que leur activation nécessite de faibles concentrations d'adénosine de l'ordre de 0,01 à 1 µM [42]. Par opposition, le récepteur A_{2B} est dit de faible affinité parce qu'il est activé par des niveaux d'adénosine de plus de 10 µM. Les récepteur A_{2A} et A₃ seraient également sensibles à un autre nucléoside, l'inosine [38, 43]. Les récepteurs P1 ont pu être largement caractérisés à l'aide d'analogues synthétiques de l'adénosine (ex: ATL146e, CGS 21680, etc.) et de composés naturels comme les méthylxanthines (ex: caféine) [38, 44]. Les récepteurs P1 entrent dans une phase dite de désensibilisation (caractéristique des récepteurs de type RCPG) suite à une exposition prolongée à leurs agonistes [45].

Tableau 1. Caractéristiques des récepteurs de l'adénosine P1.

Récepteur	Agonistes pharmacologiques	Antagonistes pharmacologiques	Transduction de signal [#]	Expression hépatique	Lignée de souris déficientes	Numéro d'accès NCBI (Humain)
A ₁	CCPA, CVT-510, CHA, CPA, R-PIA	DPCPX, MRS1754, WRC-0571	G _{i/o} ; inhibition de AC	OUI	OUI	NM_000674*
A _{2A} [§]	CGS21680, ATL146e, NECA	SCH58261, KF17837, ZM241385	G _s ; activation de AC	OUI	OUI	NM_000675
A _{2B}	NECA	MRS1754, MRS1706, emprofylline	G _s ; activation de AC	OUI	OUI	NM_000676
A ₃ [§]	CI-IB-MECA, DBXRM, NECA, VT160	MRS1220, MRS1523, MRS1191	G _{i/o} ; inhibition de AC	OUI	OUI	NM_020683*

*Plusieurs polymorphismes génétiques identifiés. § Sensible également à l'inosine. # Mécanisme principal. Inspiré de Fredholm *et al.* (2001) [38] et Burnstock (2007) [41].

L'expression des récepteurs P1 est ubiquitaire. Au niveau hépatique, les hépatocytes et les cellules étoilées hépatiques (*Hepatic Stellate Cells, HSCs*) expriment les quatre sous-types de récepteur P1 [46, 47]. Les macrophages résidents ou cellules de Kupffer expriment également le récepteur A_{2A} [48]. D'un point de vue fonctionnel, l'adénosine via l'activation des récepteurs A₁, A_{2B} et A₃ est impliquée dans la régulation du métabolisme hépatique du glucose, soit au niveau des étapes de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse [49-51]. Les récepteurs A₁, A_{2A} et A₃ jouent également des rôles immuno-modulateurs essentiels dans la protection du foie au cours du développement de conditions pathologiques telles que l'ischémie, le choc septique et la fibrose [42]. Par exemple dans un modèle de septicémie, les souris *Adora1^{-/-}* (déficientes pour le gène du récepteur A₁) et les souris de type sauvage exposées à la 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX, antagoniste sélectif du récepteur A₁) présentent des réponses inflammatoires pathologiques et un taux de mortalité supérieur à ceux observés pour les souris de type sauvage [52]. En utilisant le même modèle animal, des observations similaires ont été faites lorsque les souris *Adora3^{-/-}* (déficientes pour le gène du récepteur A₃) et les souris de type sauvage exposées au MRS 1191 (antagoniste sélectif du récepteur A₃) ont été comparées à leurs congénères de type sauvage [53]. Dans trois modèles de fibrose hépatiques, il a été également démontré que les souris *Adora2a^{-/-}* (déficientes pour le gène du récepteur A_{2A}) sécrètent des niveaux de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IFN- γ plus élevés et sont plus susceptibles aux dommages tissulaires que les souris de type sauvage [54, 55]. L'implication de l'adénosine dans le contrôle de la réponse immunitaire a aussi été observée dans d'autres organes comme les reins, les poumons et l'intestin [42, 48, 56, 57]. En dehors de son rôle de médiateur anti-inflammatoire, l'adénosine peut aussi moduler plusieurs fonctions essentielles comme le tonus vasculaire hépatique, la motricité intestinale et la transmission nerveuse [41, 58]. Toutes ces caractéristiques font de l'adénosine un acteur important de la signalisation purinergique.

Les nucléosides circulants proviennent majoritairement du catabolisme des nucléotides extracellulaires. À l'instar de l'adénosine, les nucléotides extracellulaires sont également des molécules signalétiques capables d'exercer leurs effets biologiques via l'activation des purinorécepteurs de type P2. Nous allons maintenant présenter ces récepteurs membranaires spécifiques aux nucléosides tri- et diphosphate.

1.2.2 Les récepteurs P2, sensibles aux nucléotides

Par définition, les purinorécepteurs P2 sont des récepteurs membranaires ayant pour ligands naturels les nucléotides comme l'ATP [13]. Les récepteurs P2 sont classés selon leur topologie membranaire et leur mécanisme d'action en deux groupes distincts : les récepteurs ionotropiques P2X et les récepteurs métabotropiques P2Y.

1.2.2.1 Les récepteurs P2X

Les récepteurs P2X répondent spécifiquement à l'ATP en formant des canaux perméables aux ions tels le Ca^{2+} , le Na^+ , le K^+ et le Cl^- [59]. Les récepteurs P2X constituent avec les récepteurs spécifiques au glutamate et les récepteurs de la famille « *cys loop* » (récepteurs spécifiques à la nicotine, l'acétylcholine, la sérotonine, l'acide γ -aminobutyrique et la glycine), la superfamille des récepteurs de type canal ionotropique [60]. Les récepteurs P2X₁ et P2X₂ furent les premiers à être identifiés chez le rat au début des années 1990. Ces récepteurs ont été clonés par RT-PCR à partir d'ADN complémentaire provenant respectivement de cellules primaires de *vas deferens* [61] et de cellules PC12 (tumeur des glandes surrénales) [62]. La famille des récepteurs P2X compte maintenant sept membres (P2X₁₋₇) qui ont été clonés et identifiés chez l'humain et plusieurs rongeurs. La structure de chaque récepteur est caractérisée par deux passages transmembranaires séparés par une boucle extracellulaire qui possède 10 résidus cystéine conservés constituant le domaine de liaison à l'ATP, les portions N- et C-terminales étant intracellulaires (voir figure 3) [60]. Plusieurs sites conservés de phosphorylation, glycosylation et palmitoylation pouvant moduler l'activité du récepteur, sont retrouvés au niveau des séquences protéiques des différents récepteurs. Les récepteurs sont constitués de sous-unités assemblées en canaux trimériques homo- ou hétérogènes [63]. Suite à la liaison de trois molécules d'ATP, la structure du canal passe d'une conformation fermée à ouverte permettant l'entrée sélective de cations comme le Na^+ , le K^+ et le Ca^{2+} , dans la cellule (voir tableau 2).

Tableau 2. Caractéristiques des récepteurs de nucléotides P2X.

Récepteur	Agonistes pharmacologiques	Antagonistes pharmacologiques	Transduction de signal	Expression hépatique	Lignée de souris déficientes	Numéro d'accès NCBI (Humain)
P2X₁	ATP, α,β -MeATP, 2-MeSATP	TNP-ATP, IP ₅ I, NF023, NF449	Canal ionique (Ca ²⁺ et Na ⁺)	OUI	OUI	NM_002558
P2X₂	ATP, ATP γ S, 2-MeSATP	Suramine, isoPPADS, RB2, NF770, NF279	Canal ionique (surtout Ca ²⁺)	OUI	OUI	NM_170682*
P2X₃	2-MeSATP, ATP, α,β -MeATP	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110, IP ₅ I	Canal ionique intrinsèque	OUI	OUI	NM_002559
P2X₄	ATP, α,β -MeATP, CTP	TNP-ATP, bleu de Coomassie	Canal ionique (surtout Ca ²⁺)	OUI	OUI	NM_002560
P2X₅	ATP, α,β -MeATP, ATP γ S	Suramine, bleu de Coomassie, PPADS	Canal ionique intrinsèque	OUI	NON	NM_002561*
P2X₆	<i>Hétéromère obligatoire</i>	-	Canal ionique intrinsèque	OUI	NON	NM_005446*
P2X₇	BzATP, ATP, 2-MeSATP, α,β -MeATP	KN62, KN04, MRS2427, O-ATP	Canal ionique intrinsèque et pore [§]	OUI	OUI	NM_002562

*Plusieurs polymorphismes génétiques identifiés. § Suivant une activation prolongée.
Inspiré de Jarvis et Khakh (2009) [59] et Burnstock (2007) [41].

Le flux ionique entrant provoque simultanément des changements au niveau du potentiel membranaire et des concentrations d'ions dans le cytosol, conduisant à l'activation de voies de signalisation intracellulaires sensibles aux variations de potentiel membranaire et/ou dépendantes du Ca²⁺ [59, 60]. Néanmoins, la nature exacte des mécanismes impliqués dans la transduction de signal suivant l'activation des récepteurs P2X reste à élucider.

Contrairement aux autres récepteurs P2X, le récepteur P2X₅ est exceptionnellement perméable à l'anion Cl⁻ et le récepteur P2X₆ est la seule sous-unité à exister uniquement sous forme hétérotrimérique [64]. Au niveau pharmacologique, les récepteurs P2X diffèrent par leur affinité pour leur agoniste naturel l'ATP et ses dérivés comme l' α,β -MeATP et le BzATP, et leur sensibilité aux antagonistes synthétiques comme le TNP-ATP, la suramine, le PPADS ou le NF 449 [41, 59]. L'activation des récepteurs P2X est notamment modulée par la présence d'ions divalents (Zn²⁺, Cu²⁺, Hg⁺, Ni⁺ ou Cd²⁺), le pH extracellulaire et les interactions physiques avec d'autres types de récepteurs comme ceux appartenant à la famille « cys loop » [59, 65]. Suivant une exposition prolongée à l'ATP, les récepteurs P2X passent par une phase de désensibilisation dont la durée est variable (de quelques millisecondes jusqu'à 20 secondes) et dépendante de la nature des sous-unités composant le canal [60, 66].

L'expression des récepteurs P2X est observée principalement dans les cellules musculaires lisses, les cellules nerveuses, les cellules gliales, les macrophages et les plaquettes [67]. Au niveau du foie, les récepteurs P2X sont présents pratiquement dans tous les types cellulaires [49]. Les récepteurs P2X₄ et P2X₇ ont la plus large distribution étant exprimés par les hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules de Kupffer et plusieurs lymphocytes (NK/NKT/T/B) [46]. Les hépatocytes expriment également les récepteurs P2X₁₋₃. Les cholangiocytes expriment les récepteurs P2X₂₋₄ et P2X₆. D'un point de vue fonctionnel, un rôle pour le récepteur P2X₄ a été démontré dans la sécrétion des ions Na⁺ et Ca²⁺ par les hépatocytes [68] et dans le transport du Cl⁻ au niveau de l'épithélium des canaux biliaires [69]. De plus, l'expression de l'ARN messager du récepteur P2X₄ est augmentée dans les hépatocytes riches en glycogène chez les souris déficientes pour le gène du facteur de transcription activé par les carbohydrates (ChREBP), suggérant un rôle pour ce récepteur dans la régulation du métabolisme du glucose [68]. Le récepteur P2X₇ est impliqué dans la protection tissulaire lors du développement de conditions inflammatoires hépatiques. En effet, dans un modèle d'hépatite induite par injection de concanavaleine A, les souris déficientes pour le gène du récepteur P2X₇ présentent une réduction des dommages tissulaires et des niveaux de cytokines pro-inflammatoires par rapport aux souris de type sauvage [70]. Les récepteurs P2X jouent également d'autres rôles importants dans d'autres systèmes incluant ceux cardio-vasculaire

(rythme cardiaque et contractilité musculaire), nerveux (perception de la douleur et du goût) et reproducteur (fonction éjaculatoire) [59, 71].

Mis à part les récepteurs P2X, il existe une autre classe de récepteurs capables de lier non seulement l'ATP mais aussi d'autres nucléotides comme l'ADP, et de déclencher différentes cascades de signalisation intracellulaires. Ces récepteurs que nous allons maintenant présenter sont appelés récepteurs P2Y.

1.2.2.2 Les récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y sont des récepteurs de type RCPG liant spécifiquement les nucléotides adényliques (ex : ATP et ADP) et/ou uridyliques (ex : UTP et UDP) et à mécanisme d'action métabotropique (voir figure 3) [13, 27, 58, 72, 73]. En 1993, les récepteur P2Y₁ (précédemment P2Y) et P2Y₂ (précédemment P2U) furent les premiers récepteurs P2Y clonés respectivement à partir de bibliothèques d'ADN complémentaire de cerveau d'embryon de poulet [74] et de cellules neurales de souris [75]. Par la suite, d'autres récepteurs et leurs orthologues ont été clonés et identifiés chez l'humain et plusieurs autres espèces (mammifères et oiseaux) [27, 72]. Parmi les 15 récepteurs P2Y identifiés par homologie de séquence jusqu'à présent, seuls les récepteurs P2Y_{1, 2, 4, 6, 11-14} sont considérés véritablement des récepteurs spécifiques aux nucléosides tri- et diphosphate [58, 73]. Ainsi, chaque récepteur P2Y est caractérisé pharmacologiquement par la spécificité et l'affinité pour son agoniste naturel (voir tableau 3) [24, 27, 41, 73]. Par exemple, les récepteurs P2Y_{1, 12, 13} sont particulièrement sensibles à l'ADP, les récepteurs P2Y_{2, 4, 11} lient spécifiquement les nucléosides triphosphate (ATP et/ou UTP), alors que le récepteur P2Y₆ à l'UDP. Le récepteur P2Y₁₄ est particulièrement sensible aux monosaccharides nucléotidiques comme l'UDP-glucose et l'UDP-galactose. Les autres récepteurs représentent soit des orthologues présents dans d'autres espèces que les mammifères (le récepteur P2Y₃ et P2Y₈ correspondent respectivement aux récepteurs P2Y₆ de poulet et P2Y₄ de grenouille), soit des récepteurs répondant à d'autres types de ligands (le récepteur P2Y₇ est sensible au leucotriène B₄, les récepteurs P2Y_{5, 9, 10} à l'acide lysophosphatidique et le récepteur P2Y₁₅

à l' α -cétoglutarate) [41, 73, 76, 77]. L'analyse comparative des séquences protéiques montre une homologie importante entre les récepteurs P2Y_{1, 2, 4, 6, 11} (jusqu'à 46%) d'une part, et entre les récepteurs P2Y₁₂₋₁₄ d'autre part (jusqu'à 50%). En dehors des récepteurs P2Y, les récepteurs CysLT1, CysLT2 et GPR17 dont les ligands principaux sont les cystéinyl leucotriènes, peuvent répondre également à des concentrations d'UDP de l'ordre du nM [73].

Les récepteurs P2Y sont divisés en deux classes selon leur mécanisme d'action métabotrope principal [27, 73]. La première classe regroupe les récepteurs P2Y_{1, 2, 4, 6, 11} dont l'activation est couplée à la stimulation de l'activité de la phospholipase C β (via la sous-unité G_{q/11}) et la mobilisation de calcium intracellulaire. Exceptionnellement, l'activation du récepteur P2Y₁₁ est également couplée à l'activation de l'adénylate cyclase (via la sous-unité G_{as}) [24]. La deuxième classe comprend les récepteurs dont l'activation est couplée à l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase (via les sous-unités G_{ao} ou G_{ai/o}) comme les récepteurs P2Y₁₂₋₁₄. Il est intéressant de mentionner que de récentes études ont mis en évidence les propriétés de plasticité de certains récepteurs P2Y quant à leur mécanisme d'action. Dans certaines conditions particulières comme la présence de fortes concentrations d'agoniste ou l'usage de systèmes d'expression hétérologue, certains récepteurs peuvent utiliser un mécanisme d'action alternatif [27, 41]. Par exemple, l'activation du récepteur P2Y₁₃ normalement associée à une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase, peut être couplée à la stimulation de celle-ci (via la sous-unité G_{as}) en présence de quantités importantes d'ADP extracellulaire. L'activation du récepteur P2Y₁₃ normalement associée à une diminution de la concentration cytosolique d'AMPc, peut être également couplée à l'accumulation d'inositol triphosphate dans des cellules humaines 1321N1 (astrocytome) surexprimant la sous-unité G_{ai6}. De plus, l'activation du récepteur P2Y₁₄ dans certains types cellulaires comme les astrocytes peut aboutir à une mobilisation de calcium. L'activation des récepteurs P2Y peut également contrôler l'ouverture (ou la fermeture) de divers canaux perméables aux ions K⁺ ou Ca²⁺ [27]. Ce mode d'action (moins courant) est notamment rencontré au niveau des cellules excitables comme les neurones et les cardiomyocytes. Les récepteurs P2Y peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et la glycosylation, qui modulent leur activité biologique [58, 78].

Tableau 3. Caractéristiques des récepteurs de nucléotides P2Y.

Récepteur	Agonistes pharmacologiques	Antagonistes pharmacologiques	Transduction de signal	Expression hépatique	Lignée de souris déficientes	Numéro d'accès NCBI (Humain)
P2Y₁	2-MeSADP, ADP, ATP γ S, 2-MeSATP	MRS2179, MRS2279, PPDS, RB2	G _q /G ₁₁ ; activation de PLC- β	OUI	OUI	NM_002563
P2Y₂	UTP, UTP γ S, ATP, 5-BrUTP, 2-CIATP	Suramine, RB2, ARC126313	G _q /G ₁₁ ; activation de PLC- β	OUI	OUI	NM_176072*
P2Y₄	UTP, UTP γ S, ATP, 5-BrUTP, UDP, ITP	PPADS, RB2, suramine	G _q /G ₁₁ ; activation de PLC- β	OUI	OUI	NM_002565
P2Y₆	UDP, UTP, ATP, UDP β S, IDP	MRS2567, MRS2575, MRS2578	G _q /G ₁₁ ; activation de PLC- β	OUI	OUI ^a	NM_176797*
P2Y₁₁ [§]	ATP, ATP γ S, BzATP, AR-C67085MX, ADP, ADP β S, UTP	Suramine, RB2, NF157, 5'AMPS	G _q /G ₁₁ ; activation de PLC- β ou G _s ; activation de AC	OUI	NON	NM_002566
P2Y₁₂	2-MeSATP, ADP, ADP β S, ATP γ S, 2-CIATP	CS-747, RB2, suramine, AR-C67085MX, thiénopyridines	G _{i/o} ; inhibition de AC	OUI	OUI	NM_022788*
P2Y₁₃	2-MeSADP, ADP β S, 2-MeSATP, ADP, ATP, IDP	MRS2211, PPADS, suramine, AR-C67085MX, 2-MeSAMP	G _{i/o} ; inhibition de AC ou G ₁₆ ; activation de PLC- β	OUI	OUI	NM_176894
P2Y₁₄	UDP-glucose, UDP-galactose, UDP-fructose	-	G _q /G ₁₁ ; activation de PLC- β	NON	OUI ^b	NM_001081455*

*Plusieurs polymorphismes génétiques identifiés. §Identifié chez l'humain uniquement. ^aBar *et al.* (2008) [79], ^bBassil *et al.* (2009) [80].

Inspiré de Abbracchio *et al.* (2006) [27] et Burnstock 2007 [58].

Par exemple, la phosphorylation spécifique de résidus sérine et thréonine au niveau de la troisième boucle intracellulaire et de la portion C-terminale entraîne la désensibilisation du récepteur P2Y₂ suite à une exposition continue à l'ATP ou l'UTP [81]. Le récepteur P2Y₁₂

possède deux sites de N-glycosylation qui sont essentiels pour la transduction de signal après la liaison de l'ADP au site actif [82]. Récemment, l'existence d'homodimères fonctionnels pour les récepteurs P2Y_{1, 2, 4, 12} a été mise en évidence [27]. De plus, il a été rapporté que les récepteurs P2Y_{1, 2} peuvent former chacun des oligomères hétérogènes avec le récepteur de l'adénosine A₁ [83, 84]. Ces observations suggèrent que les récepteurs P2Y existent sous forme oligomérique pour opérer et induire la transduction de signaux intracellulaires. Toutefois, une étude plus détaillée des propriétés biophysiques des différents récepteurs est nécessaire pour déterminer si ces interactions constituent une règle générale ou plutôt des particularités à chacun, étant donné le nombre important de combinaisons potentielles.

Les différentes propriétés pharmacologiques des récepteurs P2Y ont permis le développement de plusieurs analogues synthétiques de nucléotides agissant à titre d'agonistes comme l'ATP γ S et l'UTP γ S ou d'antagonistes comme le MRS 2179, le NF157 et le 2-MeSAMP [27, 41, 73]. La distribution des récepteurs P2Y étant ubiquitaire, ils sont exprimés dans tous les tissus [27, 46, 67]. Au niveau hépatique, les récepteurs P2Y_{1, 2, 4, 6} sont principalement exprimés par les hépatocytes, les cholangiocytes, les cellules de Kupffer, et la plupart des lymphocytes hépatiques. Les hépatocytes expriment également le récepteur P2Y₁₃, les cholangiocytes les récepteurs P2Y₁₁, et P2Y₁₂ et les lymphocytes les récepteurs P2Y₁₂ et P2Y₁₄. D'un point de vue fonctionnel, le récepteur P2Y₂ est impliqué dans le contrôle de la sécrétion biliaire, en modulant l'activité du transporteur Na⁺/H⁺ dans les cholangiocytes chez l'humain et le rat [85]. L'activité de la glycogène phosphorylase est augmentée dans les hépatocytes (rat) suite à l'exposition au 2-méthyl-thio-ADP (agoniste du récepteur P2Y₁) [86]. Le récepteur P2Y₁₃ contrôle l'endocytose des lipoprotéines de haute densité (*high density lipoproteins, HDL*), une étape essentielle dans le métabolisme du cholestérol au niveau des hépatocytes tel que démontré chez le rat [87]. En dehors du foie, les récepteurs P2Y occupent plusieurs autres fonctions dans les systèmes nerveux, cardio-vasculaire, respiratoire, gastro-intestinal, rénal, osseux etc. [27, 58]. Les fonctions des récepteurs P2Y ont été les mieux caractérisées dans l'hémostase [88, 89]. L'activation des récepteurs P2Y₁ initie l'activation (changement de forme) et l'agrégation des plaquettes alors que l'activation du récepteur P2Y₁₂ complète et amplifie ces deux processus [90]. Actuellement, les thiénoypyridines comme le clopidogrel et la ticlopidine (antagonistes du

récepteur P2Y₁₂) sont utilisés thérapeutiquement pour leurs propriétés anti-thrombotiques chez les patients atteints de troubles cardio-vasculaires [88].

Dans cette première partie, nous avons décrit les nucléo(s/t)ides extracellulaires comme les ligands des récepteurs P1 et P2. Ces molécules constituent également les substrats d'enzymes appelées ectonucléotidases exprimées à la surface de la plupart des cellules. Par leur activité biochimique, ces enzymes contrôlent les concentrations de nucléo(s/t)ides dans le milieu extracellulaire et par conséquent constituent un niveau de régulation important de la signalisation purinergique.

1.3 Le métabolisme des nucléotides extracellulaires

Les nucléo(s/t)ides extracellulaires exercent leurs effets biologiques en stimulant de manière autocrine ou paracrine les cellules environnantes, via l'activation des récepteurs transmembranaires P1 et P2 [5, 22]. Les voies de signalisation ainsi activées par les nucléo(s/t)ides extracellulaires modulent plusieurs fonctions importantes comme l'agrégation plaquettaire, la neurotransmission, la migration et la prolifération cellulaires, la sécrétion d'hormones ou de cytokines, etc. [27, 59].

Vu les rôles importants que les nucléo(s/t)ides extracellulaires jouent dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, leurs concentrations doivent être finement régulées dans le milieu externe. Les niveaux de nucléo(s/t)ides extracellulaires sont contrôlés par l'activité biochimique de plusieurs familles d'enzymes de surface appelées ectonucléotidases [91, 92]. Ces enzymes constituent un système biologique complexe dont la fonction principale est la modulation des voies de signalisation dépendant des nucléotides extracellulaires [93]. Les ectoenzymes impliquées dans la signalisation via les nucléo(s/t)ides extracellulaires peuvent être séparées en deux classes principales [94]. La première catégorie regroupe les ecto-phosphohydrolases/estérases ou les enzymes catalysant les réactions de dégradation des nucléo(s/t)ides extracellulaires et dont font partie les ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) [95], les ecto-nucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs) [96], les phosphatases acides (ACP) [97] et alcalines (ALP) [95]

extracellulaires, l'ecto-5'-nucléotidase/CD73 ainsi que l'ecto-adénosine désaminase (ecto-ADA) [98]. La deuxième catégorie comprend les ecto-kinases/phosphotransférases ou les enzymes catalysant les réactions de transphosphorylation des nucléotides, et inclut l'ectoadénylate kinase (AK1) [99] et l'ectonucléoside diphosphokinase (NDK) [100].

Nous allons maintenant décrire plus en détails ces deux groupes d'enzymes participant au métabolisme des nucléotides extracellulaires, en commençant par celles impliquées dans les réactions de dégradation.

1.3.1 Hydrolyse des nucléotides extracellulaires

1.3.1.1 Les ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases)

Les E-NTPDases sont responsables majoritairement de l'activité d'hydrolyse des nucléotides extracellulaires détectée à la surface des cellules, en conditions physiologiques c'est-à-dire à pH neutre. C'est en 1944 que Kalckar décrit pour la première fois l'existence d'une activité enzymatique, extraite de *Solanum Tuberosum* (pomme de terre), capable d'hydrolyser les nucléotides ATP, ADP et ITP en leurs dérivés monophosphate respectifs tout en libérant des molécules de phosphate inorganique (Pi) [101]. L'enzyme responsable de cette activité, l'apyrase ou ATPDase est aussi retrouvée dans d'autres espèces végétales comme *Luteus Lupinus*, *Mimosa Pudica* et *Cicer Arietinum* [102]. La caractérisation biochimique subséquente de cette activité enzymatique démontre qu'elle est présente dans les cellules végétales sous deux formes, soluble et membranaire. Par la suite, l'apyrase a été identifiée et caractérisée chez les bactéries, les insectes, les arthropodes et les vertébrés [102]. Chez les mammifères, l'activité de type ectonucléotidase a été longtemps considérée celle d'une ectoenzyme unique appelée ecto-ATPase, ecto-ATP diphosphohydrolase ou ecto-apyrase de mammifère⁴ [103]. À l'origine, l'ecto-ATPase est définie par trois caractéristiques biochimiques principales : 1) l'activité d'hydrolyse des nucléotides est dépendante de la présence d'ions divalents; 2) l'activité enzymatique est insensible aux inhibiteurs sélectifs des ATPases intracellulaires de types F, P et V comme le vanadate de

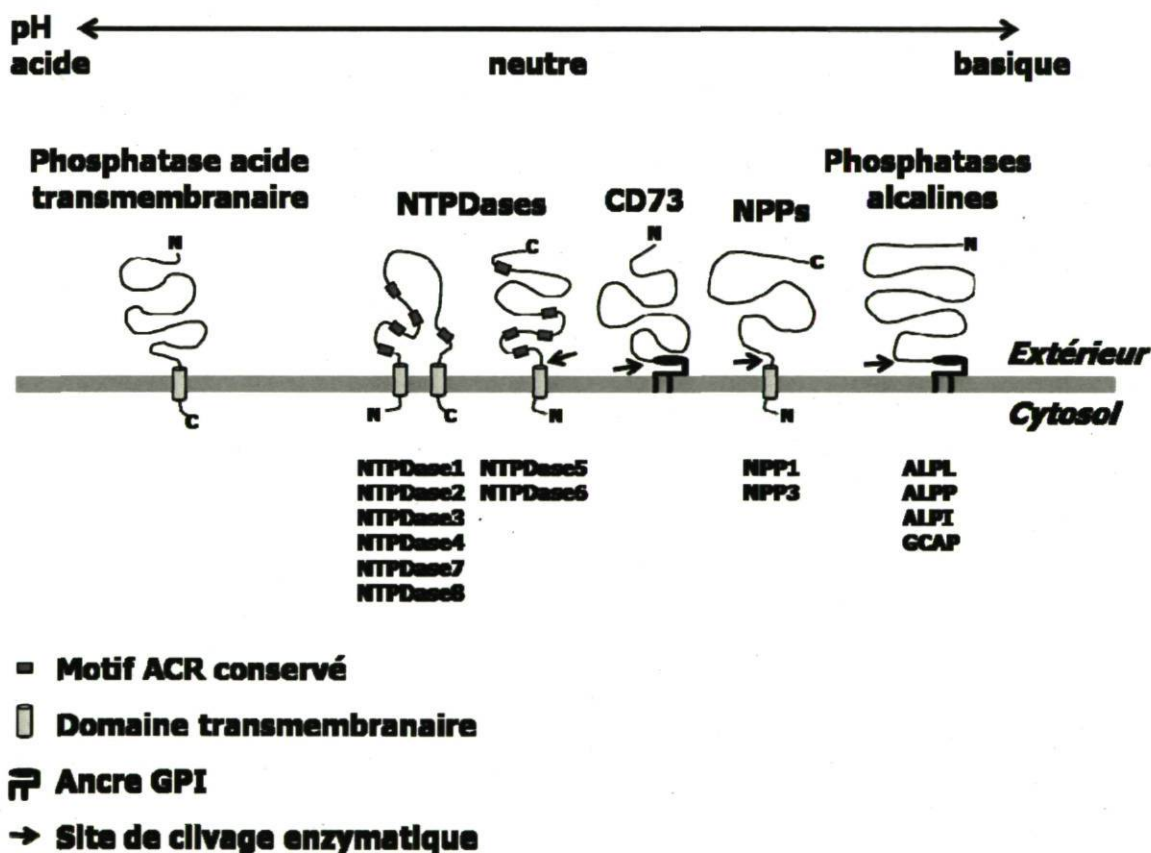
⁴ Toutefois, plusieurs études à l'époque rapportent déjà des niveaux variables d'activités ATPasiques et ADPasiques selon le tissu ou type cellulaire testé, suggérant plutôt l'existence de plusieurs ectoenzymes.

sodium (NaVO_3), la ouabaïne ou l'oligomycine; et finalement 3) la réaction catalysée est l'hydrolyse spécifique des phosphates γ et β des nucléosides tri- et diphosphate respectivement [91, 104].

Plus récemment, avec l'identification et le clonage de plusieurs nouvelles ectonucléotidases possédant des propriétés biochimiques semblables à l'ecto-apyrase, une nouvelle nomenclature plus précise a été adoptée [105]. Depuis 1999, les nouvelles règles de classification stipulent qu'une ectoenzyme d'origine mammifère hydrolysant spécifiquement les nucléosides tri- et diphosphate est appelée ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase ou E-NTPDase [EC 3.6.1.5]. Le terme apyrase est conservé pour les ectoenzymes de la même classe présentes dans les autres taxons. En plus des caractéristiques mentionnées plus-haut, la séquence protéique de chaque NTPDase présente cinq motifs ACR hautement conservés nommés « *Apyrase Conserved Regions* » et arbore le domaine spécifique de liaison à l'ATP commun aux protéines appartenant à la superfamille Actine/Hsp70/Hexokinase [(I/L/V)X(I/L/V/C)XG(T/S/G)(T/S/G)XX(R/K/C)]. On sait maintenant que la famille des ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) regroupe huit ectoenzymes (NTPDase1-8) qui sont responsables de la majeure partie de l'activité d'hydrolyse des nucléotides détectée à la surface des cellules à pH physiologique [94, 95]. Les NTPDases sont des protéines membranaires intégrales de type Ia, existant sous forme monomérique ou homo-oligomérique. La structure de base d'une NTPDase possède deux portions N- et C-terminale intracellulaires, deux passages transmembranaires hydrophobes séparés par une boucle extracellulaire contenant le site catalytique (voir figure 4). Cependant, les NTPDase5 et 6 sont des protéines membranaires intégrales de type II possédant un seul domaine transmembranaire avec la portion C-terminale extracellulaire et pouvant être sécrétées après clivage protéolytique [106].

Les NTPDases sont classées en deux groupes en référence à leur localisation cellulaire. Le premier groupe inclut les NTPDase1-3 et 8 ancrées à la membrane plasmique, avec leur site actif faisant face au milieu extracellulaire. Le deuxième groupe comprend les NTPDase4-7 ancrées à la membrane des organelles (lysosomes, appareil de Golgi et réticulum endoplasmique), avec leur site actif faisant face à la lumière de l'organelle.

Les NTPDase4-7 sont parfois appelées endo-NTPDases, en référence à leur localisation intracellulaire prédominante [106]. Les NTPDases se distinguent des autres ectonucléotidases, principalement par leur spécificité et leur capacité d'hydrolyser leurs substrats, les nucléosides tri- et diphosphate de type puriniques ou pyrimidiniques (voir tableau 4) [92, 95]. L'activité biochimique des NTPDases requiert la présence d'ions divalents comme le Ca^{2+} , le Mg^{2+} , le Mn^{2+} et le Zn^{2+} et est optimale sur une large gamme de pH (~5-10) [107]. De plus, ces ectoenzymes sont sujettes à des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, la phosphorylation, la palmitoylation et l'acylation qui peuvent affecter leur physiologie à différents niveaux comme par exemple, l'activité biochimique, le ciblage à la membrane et le trafic intracellulaire [95].



Inspiré de Zimmermann (2001) [92] et Zimmermann (2009) [97].

Figure 4 : Représentation schématique de la structure et de la topologie membranaires prédites des principales ectonucléotidases.

1.3.1.1.1 Clonage et identification des NTPDases 1-8

NTPDase1 En 1996, Handa et Guidotti purifient et clonent la forme soluble de l'apyrase (extraite de la pomme de terre) [108]. L'analyse comparative de séquence protéique montre que l'ectoenzyme clonée possède une forte homologie avec les ATPases isolées à partir d'autres sources comme *Pisum Sativum*, *Toxoplasma Gondii* et *Saccharomyces cerevisiae* mais également avec l'antigène de surface CD39 (humain), un marqueur de l'activation des leucocytes (lymphocytes B/T/NKT et cellules dendritiques) et des cellules endothéliales, cloné et identifié par Maliszewski *et al.* en 1994 [109]. L'expression fonctionnelle de CD39 *in vitro* démontre qu'en plus d'être une molécule d'adhésion, cette protéine possède les caractéristiques biochimiques d'une ecto-apyrase [110]. Parallèlement, le séquençage protéique partiel des ecto-ATP diphosphohydrolases purifiées à partir de pancréas de porc [111], d'aortes de bœuf [112], et de placentas humains [113, 114] confirme que ces enzymes sont identiques à CD39. La caractérisation fonctionnelle de l'ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 humaine clonée par RT-PCR démontre qu'elle représente l'ectonucléotidase majeure de l'endothélium vasculaire et donc est exprimée de manière ubiquitaire [115]. Au niveau biochimique, CD39 ou renommée NTPDase1 depuis 1999 hydrolyse de manière équivalente les nucléosides tri- et diphosphate en produisant le nucléoside monophosphate correspondant et du Pi [107]. La NTPDase1 est également exprimée à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires [116, 117], des cellules de Langerhans au niveau de la peau [118], des cellules rénales formant la branche ascendante de l'anse de Henle et le tube collecteur [119], des cellules de Sertoli dans les testicules [120], des cellules épithéliales épididymales apicales [120] et des plaquettes [121].

NTPDase2 En 1997, la NTPDase2 (précédemment CD39L1/ecto-ATPase) a été clonée par RT-PCR à partir de cellules musculaires lisses de poulet [122] et de cellules endothéliales transformées ECV-304 humaines [123]. En plus de l'homologie de séquence avec la NTPDase1, la NTPDase2 a été identifiée sur la base des propriétés biochimiques de son activité enzymatique qui est plutôt de type ecto-ATPase [103]. Par exemple, le ratio ATP/ADP de la NTPDase2 recombinante humaine est approximativement de 30:1 [107]. Par conséquent, la durée de vie des nucléosides diphosphate est allongée en présence de la NTPDase2, comparativement à la NTPDase1. L'expression de la NTPDase2 est

principalement associée à la vasculature, précisément au niveau des cellules de la *tunica adventitia* ainsi qu'à d'autres types cellulaires incluant les péricytes dans le cœur [116], les fibroblastes portaux hépatiques [124], les cellules de Müller au niveau de la glie rétinienne [125], les astrocytes dans le cerveau [126] et les cellules de type I au niveau des papilles gustatives [127].

NTPDase3 En 1999, la NTPDase3 (précédemment CD39L3/HB6) a été clonée par RT-PCR à partir d'extraits de cerveau (humain) [128]. Cette ectonucléotidase hydrolyse moins bien les nucléosides diphosphate comparativement à la NTPDase1 mais beaucoup mieux comparativement à la NTPDase2 [129]. La caractérisation biochimique des protéines recombinantes de souris montre que la NTPDase3 avec un ratio ATP/ADP de 3:1 possède un profil biochimique intermédiaire entre ceux de la NTPDase1 et de la NTPDase2 [107, 129]. La NTPDase3 est présente au niveau des neurones noradrénergiques dans le cerveau, des neurones afférents auriculaires [130], des îlots de Langerhans pancréatiques [131], des cellules épithéliales sécrétoires de l'appareil reproducteur mâle, des cellules épithéliales des oviductes [120], des glandes sous-muqueuses des voies respiratoires (*données non publiées, laboratoire du Dr Sévigny*) et des tubes collecteurs (rein) [119].

NTPDase4-7 Entre 1999 et 2001, l'identité moléculaire de quatre nouvelles enzymes, les NTPDase4-7 a été mise en évidence. Les NTPDase4 (UDPase/LALP70) [132] et 7 (LALP1) [133] ont été clonées par RT-PCR à partir d'extraits de cerveau humain, la NTPDase5 (CD39L4/ER-UDPase/PCPH) de testicules de souris [134] et la NTPDase6 (CD39L2) [135] de cœur humain. Au niveau biochimique, les NTPDase4 et 5 hydrolysent préférentiellement l'UDP, la NTPDase6 le GDP et l'IDP, et la NTPDase7 l'UTP [92]. L'expression de l'ARNm correspondant à chacune des NTPDase4, 6 et 7 est ubiquitaire, contrairement à celui de la NTPDase5 détecté uniquement dans le foie, les reins, les testicules, les ovaires, la prostate, l'intestin ainsi que les macrophages circulants [136].

NTPDase8 Plus récemment, une analyse bioinformatique menée dans notre laboratoire a conduit à l'identification de nouvelles séquences ESTs (*Expressed Sequence Tags*) partielles (foie de souris) possédant les différents motifs conservés caractéristiques des isoenzymes de la famille des NTPDases. L'analyse comparative de ces séquences partielles

ne correspondant à aucune NTPDase connue suggérait l'existence d'une nouvelle NTPDase. Finalement, notre laboratoire a publié une étude sur l'identification, le clonage et la caractérisation biochimique de la NTPDase8 (souris), une nouvelle ecto-apyrase de mammifère [137]. La NTPDase8, comme son paralogue la NTPDase3, a un profil biochimique intermédiaire entre ceux de la NTPDase1 et 2, avec un ratio ATP/ADP de 2:1 [107, 137]. L'expression de la NTPDase8 au niveau transcriptionnel est détectée principalement dans le foie, les reins, l'intestin, les poumons et l'estomac [137]. Les récents développements sur cette enzyme sont présentés au chapitre 2 de cette thèse.

1.3.1.1.2 Régulation des niveaux de nucléotides extracellulaires et de l'activation des récepteurs P1 et P2

Par leurs propriétés biochimiques, les NTPDases n'influencent pas seulement la nature mais également la disponibilité dans le temps et l'espace des nucléotides de part et d'autre de la membrane plasmique. Les NTPDase1-3 et 8 en particulier jouent un rôle modulateur essentiel au sein du «*purinome*», un terme récemment introduit pour désigner l'ensemble des interactions existant entre les nucléo(s/t)ides extracellulaires, les récepteurs P1 et P2 et les ectonucléotidases de surface qui participent aux différentes voies de signalisation purinergiques [93]. Cependant du fait de leur récente identification, peu d'études fonctionnelles sur les NTPDases ont été rapportées. De plus, seules des lignées déficientes pour le gène de la NTPDase1, C57BL/6 x 129SvJ-*Entpd1*^{-/-} [138] et C57BL/6 x 129SJ-*cd39*^{-/-} [139], et de la NTPDase5 (C57BL/6J-Tyr^{c-Brd}-*Entpd5*^{-/-}) [140] sont actuellement disponibles. Nous allons maintenant présenter quelques exemples de fonctions physiologiques régulées par les NTPDases.

1.3.1.1.3 Exemples d'études fonctionnelles impliquant les NTPDases

Hémostase L'importance physiologique des NTPDase1 et 2 est bien caractérisée dans le processus d'agrégation plaquettaire [95, 121]. Lors d'un bris vasculaire, la stimulation paracrine par l'ADP extracellulaire des récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ présents sur les plaquettes

entraîne leur activation et la formation d'un thrombus au niveau du site de lésion [88]. Par l'hydrolyse de l'ATP et l'ADP extracellulaires, la NTPDase1 présente sur les cellules endothéliales vasculaires inhibe le processus d'agrégation plaquettaire [116]. Inversement, l'activité biochimique de la NTPDase2 exprimée au niveau des cellules adventitielles vasculaires favorise l'apparition d'ADP et donc l'activation plaquettaire. Cependant, l'hémostase chez les souris *Entpd1*^{-/-} est caractérisée par un allongement du temps de saignement, comparativement aux souris de type sauvage [138]. L'absence d'activité ectonucléotidasique à la surface des cellules endothéliales entraîne la présence accrue d'ADP plasmatique et la désensibilisation du récepteur P2Y₁, essentiel à l'activation des plaquettes. La régulation de l'hémostase par l'activité biochimique des NTPDase1 et 2 vasculaires est un bel exemple illustrant l'importance des ectonucléotidasases de surface dans le contrôle des voies de signalisation purinergiques.

Développement La NTPDase2 semble également impliquée dans le développement des cellules visuelles rétiniennes chez *Xenopus Laevis* [141]. La surexpression de la NTPDase2 dans des blastomères (aux stades D1 et V1) cause des perturbations importantes du développement de l'épithélium pigmentaire rétinien incluant la formation de structures ectopiques et d'œil supplémentaire. De plus, la suppression de l'expression de la NTPDase2 et du récepteur P2Y₁ au moyen d'oligonucléotides antisenses spécifiques empêche la formation d'œil, suggérant que le développement de l'épithélium pigmentaire rétinien est modulé par le récepteur P2Y₁ activé par l'ADP généré suite à l'hydrolyse par la NTPDase2, de l'ATP relâché dans le milieu extracellulaire. Dans le cerveau de souris, l'expression de la NTPDase2 et des récepteurs P2Y₁ et P2Y₂ est détectée sur les cellules-souche de type B et les cellules gliales [142]. L'activation des récepteurs P2Y₁ et P2Y₂ dans ces deux types cellulaires potentialise l'effet des facteurs de croissance EGF (*epidermal growth factor*) et FGF (*fibroblast growth factor*) sur leur capacité à proliférer, démontrant ainsi un rôle physiologique pour la signalisation purinergique dans le contrôle de la neurogenèse dans le cerveau [143]. En contrôlant les niveaux de nucléotides extracellulaires dans l'environnement immédiat des cellules et l'activation des récepteurs P2Y adjacents, la NTPDase2 module indirectement le processus de neurogenèse.

Prolifération Récemment, l'équipe du docteur Dranoff dans une étude menée en collaboration avec notre laboratoire a identifié un nouveau rôle pour la NTPDase2 dans le contrôle de la prolifération cellulaire dans le foie [144]. En effet, la NTPDase2 via son activité biochimique, agit comme un répresseur constitutif de la prolifération des cholangiocytes. Le développement des cholangiopathies chez l'humain et dans différents modèles animaux est accompagné d'une prolifération cellulaire incontrôlée et d'une diminution de l'expression protéique de la NTPDase2 [145]. De plus, des effets mitogéniques au niveau hépatique ont été démontrés pour l'ATP extracellulaire [146]. Les auteurs ont donc postulé que l'absence de la NTPDase2, en prolongeant la présence des nucléotides comme l'ATP dans le milieu extracellulaire, cause la prolifération incontrôlée des cholangiocytes. La co-culture de cellules épithéliales biliaires Mz-ChA-1 avec des fibroblastes portaux primaires de rat surexprimant la NTPDase2 diminue leur prolifération cellulaire significativement (environ 26%) par rapport aux cellules contrôles. L'effet de l'expression de la NTPDase2 sur la prolifération des cholangiocytes est également reproduit en ajoutant dans le milieu de culture de l'apyrase soluble ou de la suramine (inhibiteur à large spectre des récepteurs P2). Ces données démontrent que la prolifération cellulaire des cholangiocytes est dépendante des nucléotides extracellulaires et sous le contrôle de l'activité biochimique de la NTPDase2 exprimée par les fibroblastes portaux voisins. Plus récemment, une étude a démontré que la hausse de l'expression de la NTPDase1 par les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques est primordiale dans le processus de régénération cellulaire post-hépatectomie [147]. Chez les souris *Entpd1*^{-/-}, l'absence de la NTPDase1 dans ces cellules est associée à une désensibilisation du récepteur P2Y₂ entraînant des perturbations de la voie d'activation du récepteur du facteur de croissance VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) de type 2 nécessaire pour la croissance de l'endothélium sinusoidal, et bloquant la relâche subséquente du facteur de croissance HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) essentiel à la prolifération des hépatocytes.

Cancer Une étude récente décrivant la génération d'une lignée de souris déficientes pour le gène de la NTPDase5 (C57BL/6J-Tyrc-Brd- *Entpd5*^{-/-}) a rapporté que le développement d'une hépatite progressive et de lésions néoplasiques sont des caractères phénotypiques observés chez les animaux mutants [140]. La NTPDase5 étant l'homologue du proto-

oncogène PCPH humain, ces observations suggèrent que la NTPDase5 est impliquée dans le développement de cancer.

Comme les NTPDases décrites plus haut, les NPPs et les phosphatases acides et alcalines constituent des familles d'ectonucléotidases hydrolysant les nucléotides extracellulaires. Néanmoins, les activités correspondant à ces ectoenzymes sont observables seulement dans des conditions physiologiques particulières et caractérisées par des niveaux d'activités d'hydrolyse des nucléotides généralement inférieures à celles mesurées pour les NTPDases. Nous allons maintenant présenter la famille des NPPs et la superfamille des phosphatases.

1.3.1.2 Les ecto-nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (E-NPPs)

La famille des ecto-nucléotide pyrophosphatases [EC 3.6.1.9]/phosphodiesterases [EC 3.1.4.1] (E-NPPs) regroupe sept protéines (NPP1-7) dont certains membres ont la capacité d'hydrolyser un groupement pyrophosphate (PPi) ou phosphate (Pi) d'une variété de substrats naturels incluant les nucléotides et leurs dérivés (ATP, ADP, UDP-glucose), les lysophospholipides (phosphatidylcholine), les diadénosine polyphosphates et le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺), et le composé para-nitrophényl thymidine 5'-monophosphate (pNP-TMP) [94, 148]. La protéine NPP1 fut le premier membre de la famille identifié chez la souris, comme antigène de surface sur des lymphocytes B sécréteurs [149]. Les NPP1/NPPase/PC-1, NPP2/Autotaxine/PD-1 α et NPP3/gp130^{RB13-6}/B10/PD-1 β sont les seules ectoenzymes de cette famille capables d'hydrolyser les nucléotides ATP et ADP [96]. Les NPP1 et 3 sont des glycoprotéines de type II dont la structure comprend une portion N-terminale intracellulaire contenant un motif di-leucine de compartimentalisation cellulaire (épithélium polarisé), un domaine transmembranaire (absent de la séquence protéique de la NPP2), un domaine extracellulaire avec deux motifs de type somatomédine B riches en résidus cystéine et un site catalytique de type endonucléase hautement conservé. La forme active de la NPP2 est sécrétée après maturation (par clivage protéolytique), l'enzyme étant synthétisée sous forme de pré-enzyme. Les NPP1 et 3 fonctionnelles sont homodimériques contrairement à la NPP2 qui, elle, est monomérique [148]. Au niveau biochimique, l'activité enzymatique des NPPs est

inhibée par les glycosaminoglycans, le 2-mercapto-éthanol, le dithiothréitol et les agents chélatants [150]. De plus, l'activité hydrolytique des NPPs est optimale à pH alcalin et dépendante de la présence d'ions divalents [92, 150].

L'expression des NPP1-3 a été mise en évidence dans plusieurs tissus comme le cœur, le cerveau, le rein, le foie, l'intestin et les os [148]. Au niveau hépatique, les hépatocytes expriment les NPP1 (membrane apicale), NPP2 (sécrétion) et NPP3 (membrane basolatérale). Les cholangiocytes expriment aussi la NPP3 (membrane apicale). D'un point de vue fonctionnel, la NPP1 est l'enzyme la mieux caractérisée et son expression est associée à la résistance hépatique à l'insuline via l'inhibition de l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline essentielle à son activité [148, 151]. La surexpression de la NPP1 dans les cellules humaines MCF-7 (adénocarcinome mammaire) est associée à une réduction de l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur de l'insuline exprimé dans ces cellules [152]. De plus, les souris surexprimant spécifiquement la NPP1 humaine au niveau du foie présentent une glycémie et une insulémie élevées [151]. La NPP1 semble également impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire puisque suite à une procédure d'hépatectomie partielle (70%), l'expression de la NPP1 est régulée à la baisse durant la phase proliférative [153]. Ces données suggèrent que l'activité biochimique de la NPP1 agit constitutivement comme un répresseur de la prolifération cellulaire, un mécanisme apparemment dépendant de la signalisation purinergique au niveau hépatique.

D'ailleurs, l'ATP extracellulaire est un médiateur physiologique aux effets mitogéniques connus sur les hépatocytes. Les seules données disponibles concernant les NPP2 et 3 indiquent qu'une augmentation des niveaux d'ARN messager pour ces deux ectoenzymes est généralement observée durant le développement de maladies hépatiques comme l'hépatite C et le cholangiocarcinome [154-156]. Toutefois, la contribution physiologique des NPPs dans la modulation de la signalisation purinergique reste à déterminer puisque leur capacité d'hydrolyser les nucléotides est faible relativement aux autres familles d'ectoenzymes de surface. Les NPPs modulent d'autres mécanismes cellulaires importants dans d'autres systèmes incluant le processus de minéralisation (os et cartilage), la motilité (cellules tumorales) et l'apoptose [148, 150].

1.3.1.3 Les phosphatases acides (ACPs) et alcalines (APs)

Les familles des phosphatases acides (ACPs) [EC 3.1.3.2] et alcalines (ALPs) [EC 3.1.3.1] regroupent plusieurs ectoenzymes (et isoformes) capables de déphosphoryler de manière non spécifique plusieurs types de substrats naturels comme les nucléotides, les phosphoprotéines, les polysaccharides et les alcaloïdes [92, 97, 157, 158].

La famille des phosphatases acides compte cinq isoenzymes nommées en référence à leur origine : EAP (érythrocytes), LAP (lysosomes), PAP (prostate), MAP (macrophages) et OcAP/TrAP (ostéoclastes, forme résistante à l'inhibition par le tartrate) [157]. Les phosphatases acides sont des glycoprotéines de type I dont la structure peut comporter un domaine transmembranaire (ex : forme membranaire de TrAP) ou non (ex : forme sécrétée de PAP ou TrAP). Leur activité est optimale à pH acide (~ 3-5) et dépendante de la présence d'ions Fe^{2+} . La famille des phosphatases alcalines comporte 4 isoenzymes : PLALP (placenta), GCALP (cellule germinale), IALP (intestin) et TNAP/ALPL (non spécifique du tissu ; foie, os, rein) [92]. Les phosphatases alcalines sont des glycoprotéines ancrées à la membrane plasmique via une molécule de glycosylphosphatidylinositol (GPI). De ce fait, chaque enzyme peut être relâchée dans les fluides extracellulaires, après clivage par les phospholipases endogènes [92]. Leur activité est optimale à pH alcalin (~8), sensible à la chaleur et dépendante de la présence d'ions divalents comme le Zn^{2+} et le Mg^{2+} [92]. Pour mesurer *in vitro* ou détecter *in situ* l'activité des phosphatases acides et alcalines, le para-nitrophénolphosphate (pNPP) [159], le 4-méthylumbelliféryl phosphate (4-MUP) et ses dérivés [160, 161], sont des substrats synthétiques couramment utilisés.

La distribution des membres des deux classes d'enzymes est vaste [92, 157, 158, 162]. En plus des tissus ou cellules où elles ont été originalement découvertes, les phosphatases sont retrouvées dans d'autres tissus comme le cerveau, les poumons, les reins, etc. Au niveau fonctionnel, le taux sérique des phosphatases acides (ou alcalines) circulante a été longtemps utilisé comme marqueur biologique de certaines pathologies, incluant le cancer de la prostate, le rachitisme et la maladie de Gaucher [157]. Une étude récente a montré que l'injection de phosphatase acide prostatique autologue recombinante dans la moelle épinière de souris cause une diminution de la perception de la douleur. Ce processus est apparemment dépendant de l'activation du récepteur de l'adénosine A_1 puisque les effets de

l'injection de PAP sont inhibés de manière transitoire en présence d'un antagoniste du récepteur A₁, la 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX) [163]. Ainsi, l'activité de la PAP en générant de l'adénosine dans le milieu externe agit comme modulateur de la signalisation purinergique dans les neurones sensitifs de la moelle épinière. Il est aussi intéressant de noter que les phosphatases acides et/ou alcalines de par leurs propriétés biochimiques jouent implicitement le rôle de senseurs du pH extracellulaire. En effet, l'activité enzymatique de ces protéines est minimale ou réduite à pH neutre, donc physiologique pour la plupart des tissus. Par conséquent, un changement de leur activité enzymatique peut permettre de prédire des changements physiologiques importants dans le milieu extracellulaire.

Nous venons de présenter les NTPDases, les NPPs et la famille des phosphatases acides et alcalines, des ectonucléotidases dont l'importance physiologique est associée à des contextes biologiques particuliers (pH environnant, type cellulaire). Les activités biochimiques de ces ectoenzymes produisent éventuellement de manière transitoire les nucléosides monophosphate, le substrat d'une autre ectoenzyme appelée ecto-5'-nucléotidase/CD73. Nous allons maintenant présenter l'ecto-5'-nucléotidase dont l'activité biochimique représente la source principale d'adénosine extracellulaire à pH physiologique.

1.3.1.4 L'ecto-5'-nucléotidase/CD73

La famille des 5'-nucléotidases [EC 3.1.3.5] regroupe sept protéines, incluant 6 isoenzymes cytosoliques (cNI-III, cdN et mdN) et une membranaire l'ecto-5'-nucléotidase/CD73, capables d'hydrolyser spécifiquement les nucléosides monophosphate comme l'AMP en nucléosides et phosphates inorganiques [164]. L'existence d'une enzyme qui hydrolyse uniquement les nucléosides 5'-monophosphate a été décrite pour la première fois au début des années 1930 par Reis dans le muscle cardiaque chez le rat, le lapin et la grenouille [165, 166]. Par la suite, l'enzyme appelée 5'-nucléotidase à l'origine de cette activité, a été identifiée sous forme soluble et/ou membranaire dans plusieurs autres tissus comme le cerveau, les poumons, les reins, l'intestin etc. Misumi *et al.* ont cloné l'ADNc de l'ecto-5'-nucléotidase en 1990, à partir d'extraits de foie de rat [167] et de placenta humain [168].

L'ecto-5'-nucléotidase est aussi connue sous le nom de LVAP-2 (*lymphocyte vascular adhesion protein 2*), un marqueur de maturation des lymphocytes B/T [169]. C'est une glycoprotéine de surface homodimérique qui est ancrée à la membrane au moyen d'une molécule de glycosylphosphatidylinositol (GPI) et donc peut être sécrétée après clivage par les phospholipases endogènes [170, 171]. L'activité biochimique de cette ectoenzyme est optimale à pH neutre et dépendante des ions divalents comme le Mg^{2+} , le Ca^{2+} , le Zn^{2+} , le Mn^{2+} et le Co^{2+} [92, 171]. Contrairement aux 5'-nucléotidases cytosoliques, l'ecto-5'-nucléotidase possède une large spécificité de substrat envers les nucléosides 5'-monophosphate [164]. Les inhibiteurs naturels ATP et ADP ou les inhibiteurs synthétiques comme l' α,β -MeADP (AOPCP) et la concanavaleine A (ConA) peuvent être utilisés pour bloquer l'activité 5'-monophosphatase de l'ecto-5'-nucléotidase [164, 171]. L'expression de l'ecto-5'-nucléotidase est détectée de manière ubiquitaire [172].

1.3.1.4.1 Régulation des niveaux de nucléotides extracellulaires et de l'activation des récepteurs P1

Au sein du purinome, l'activité enzymatique de l'ecto-5'-nucléotidase se révèle essentielle, particulièrement à pH physiologique. En effet, la contribution des autres types d'enzymes capables de générer de l'adénosine comme les phosphatases et les E-NPPs étant plutôt minimale dans ces conditions, l'ecto-5'-nucléotidase peut être considérée comme la source majeure d'adénosine extracellulaire [172]. Cela s'explique par le fait qu'en plus de sa disponibilité naturellement plus importante dans le milieu extracellulaire, l'AMP est un substrat préférentiel de l'ecto-5'-nucléotidase, comparativement aux autres nucléosides 5'-monophosphate. Par ses propriétés biochimiques, l'ecto-5'-nucléotidase influence directement l'activation des récepteurs de l'adénosine P1. Comme l'adénosine est un puissant médiateur anti-inflammatoire [57], les conditions entraînant l'augmentation ou la diminution de l'expression de l'ecto-5'-nucléotidase peuvent moduler la réponse inflammatoire. Actuellement, trois lignées déficientes en ecto-5'-nucléotidase, C57BL/6J/129SvEv *CD73*^{-/-} [173], C57BL/6/129 SVJ *cd73*^{-/-} [174] et 129Sv *cd73*^{-/-} [175] sont disponibles, pour caractériser l'importance physiologique de cette ectoenzyme dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

1.3.1.4.2 Exemples d'études fonctionnelles impliquant l'ecto-5'-nucléotidase/CD73

Ischémie-Reperfusion⁵ La fonction la mieux caractérisée de l'ecto-5'-nucléotidase est son rôle de protection suite à l'ischémie-reperfusion [172]. L'ischémie-reperfusion peut être observée suite à un épisode embolique, une baisse de pression sanguine ou une transplantation. Le préconditionnement ischémique est un mécanisme physiologique qui réduit considérablement les dommages tissulaires hépatiques associés à l'ischémie-reperfusion. En effet, cette procédure consistant à alterner plusieurs périodes d'ischémie et de reperfusion sur un court laps de temps, est caractérisée par la présence d'importantes quantités d'adénosine anti-inflammatoire circulante. Récemment, il a été démontré que les effets bénéfiques du préconditionnement ischémique sont reliés à l'induction de l'expression hépatique de l'ecto-5'-nucléotidase [176]. Lorsque soumises à un protocole de préconditionnement ischémique précédant une période d'ischémie-réperfusion, les souris *cd73*^{-/-} (déficientes pour le gène de l'ecto-5'-nucléotidase) présentent des niveaux d'adénosine extracellulaire bas et une exacerbation des dommages hépatiques (taux sérique augmenté des enzymes alanine-transférase, aspartate-transférase et myéloperoxidase), comparativement aux souris de type sauvage. De plus, l'injection intrahépatique d'ecto-5'-nucléotidase soluble dans les souris *cd73*^{-/-} permet de rétablir le phénotype normal de type sauvage et la protection procurée par la procédure de préconditionnement ischémique. L'effet anti-inflammatoire associé à l'expression de l'ecto-5'-nucléotidase a été également observé dans d'autres tissus comme le cœur, les reins, les poumons et l'intestin [94, 164, 172].

Nous allons maintenant décrire l'ecto-adénosine désaminase, une ectoenzyme dont l'activité dépend directement de celle de l'ecto-5'-nucléotidase qui génère son substrat, l'adénosine. L'ecto-adénosine désaminase catalyse l'étape finale de dégradation des nucléo(s/t)ides extracellulaires, précédant la ré-incorporation dans la cellule.

⁵ Le blocage de l'apport sanguin artériel dans un organe ou ischémie cause des dommages tissulaires dus au manque d'oxygène et de nutriments, et l'accumulation de déchets métaboliques. La restauration de l'apport sanguin ou reperfusion suite à l'ischémie est associée à une production importante de radicaux libres toxiques.

Tableau 4. Caractéristiques des principales ectonucléotidases membranaires.

Ectonucléotidases	Substrats	Expression hépatique	Lignée de souris déficientes	Numéro d'accès NCBI (Humain)
Famille des E-NPPs[§] :				
NPP1 , NPPase, PC-1, CD203c	dinucléotides, nucléosides	OUI	OUI ^a	NM_006208
NPP3 , PD-1 β , gp130 ^{RB13-6} , B10	triphosphate et diphosphate, phospholipides	OUI	NON	NM_005021
Famille des E-NTPDases :				
NTPDase1 , CD39, ecto-apyrase		OUI	OUI ^{d,e}	NM_001776*
NTPDase2 , CD39L1, ecto-ATPase		OUI	NON	NM_203468*
NTPDase3 , CD39L3, HB6	nucléosides	OUI	NON	NM_001248
NTPDase4 , UDPase, LALP70	triphosphate et diphosphate, uniquement	NON	NON	NM_004901*
NTPDase5 , CD39L4, PCPH		OUI	OUI ^f	NM_001249
NTPDase6 , CD39L2		NON	NON	AY327581
NTPDase7 , LALP1		NON	NON	NM_020354
NTPDase8 , hATPDase		OUI	NON [#]	NM_001033113*
Famille des ALPs :				
PLALP (placenta)	nucléotides,	NON	NON	NM_001632
GCALP (cellules germinales)	phospholipides, phosphoprotéines,	NON	OUI ^g	NM_031313
IALP (intestin)	polysaccharides	NON	NON	NM_001631
TNAP (non spécifique du tissu)		OUI	OUI ^h	NM_000478*
Famille des ACPs[§] :				
TrAP , forme membranaire	nucléotides, phospholipides, phosphoprotéines, polysaccharides	OUI	OUI ⁱ	NM_01111035*
Famille des 5'-nucléotidases[§] :				
Ecto-5'-nucléotidase , CD73	nucléosides monophosphate uniquement	OUI	OUI ^{j,k,l}	NM_002526

[§] Isoenzymes membranaires décrites uniquement. * Plusieurs polymorphismes génétiques identifiés. # Cellules-souches embryonnaires modifiées génétiquement disponibles. ^a Okawa et al. (1998) [177], ^b van Meeteren et al. (2006) [178], ^c Ferry et al. (2007) [179], ^d Enjyoji et al. (1999) [138], ^e Pinsky et al. (2002) [139], ^f Read et al. (2009) [140], ^g & ^h Narisawa et al. (1997) [180], ⁱ Hayman et al. (1996) [181], ^j Castrop et al. (2004) [173], ^k Eltzschig et al. (2004) [174], ^l Koszalka et al. (2004) [175]. Inspiré de Robson et al. (2006) [95], Zimmermann (2001) [92] et Zimmermann (2009) [97].

1.3.1.5 L'ecto-adénosine désaminase (ecto-ADA)

L'ecto-adénosine désaminase (ecto-ADA) [EC 3.5.4.4] est une ectoenzyme qui catalyse la réaction de désamination de l'adénosine en inosine et la 2-déoxyadénosine en 2-déoxyinosine dans le milieu extracellulaire [94, 98, 182]. Il existe trois isoenzymes de l'adénosine désaminase : 2 formes cytosoliques ADA1 et ADA2, et une forme présente à la membrane ecto-ADA (ou ADA + CP). Curieusement, l'analyse de séquence protéique des isoformes de l'ADA ne révèle aucun domaine transmembranaire ni de signal de localisation membranaire. Apparemment, l'ecto-ADA membranaire correspond à l'isoenzyme ADA1 (sous forme dimérique) complexée à des protéines membranaires intégrales telles que CD26/DPPIV (glycoprotéine membranaire de type II) ou les récepteurs de l'adénosine A₁ et A_{2B} [98, 183]. De plus, certaines études ont montré la présence d'ecto-ADA en absence d'interaction avec CD26 ou dans des types cellulaires exprimant des niveaux très bas de récepteur A₁, suggérant l'existence de partenaires additionnels pour l'ecto-ADA [98]. Néanmoins, la topologie membranaire exacte de l'ecto-ADA demeure inconnue. Au niveau biochimique, l'activité de l'ecto-ADA est inhibée par les analogues de purines comme la 2'déoxycoformicine et l'érythro-9-(2-hydroxyl-3-nonyl)-adénine (EHNA) [98, 182, 184]. L'activité d'hydrolyse de l'adénosine par l'ecto-ADA est optimale sur une large gamme de pH (~6-9) et peut être modifiée en présence d'ions divalents, dépendamment de l'espèce considérée [182].

La distribution de l'ecto-ADA a été décrite dans tous les types cellulaires où elle a été étudiée, incluant les plaquettes, les fibroblastes, les cellules immunes (lymphocytes B/T et cellules dendritiques) [98], les cellules acineuses séreuses pancréatiques, les cellules séreuses des glandes salivaires sous-maxillaires et les glandes séreuses de Brünner (intestin) [185]. Dans le foie, l'expression de l'ecto-ADA a été décrite au niveau des canalicules biliaires [185, 186]. Au niveau fonctionnel, l'importance de l'activité enzymatique ecto-ADA a été mise en évidence chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience combinée sévère, associé à un déficit congénital en ADA [98]. Ce trouble métabolique est caractérisé par une accumulation importante d'adénosine extracellulaire, cytotoxique pour les lymphocytes T. Indépendamment de son activité enzymatique, l'interaction physique de l'ecto-ADA avec les récepteurs de l'adénosine A₁ et

A_{2B} semble également importante dans la modulation des voies de signalisation activées par l'adénosine [98]. Dans les lymphocytes T Jurkat, l'ajout d'ecto-ADA exogène augmente la production d'AMP cyclique observée suite à l'activation du récepteur A_{2B} par l'agoniste NECA [187]. Dans les cellules musculaires lisses de *vas deferens* (hamster) suite à la stimulation à la R-N⁶-(2-phénylisopropyl)-adénosine (R-PIA), la mobilisation de Ca²⁺ et la production de l'inositol triphosphate cytosoliques sont potentialisées par l'ajout d'ecto-ADA préalablement inactivée avec l'ion Hg²⁺ [188]. L'association de l'ecto-ADA qui hydrolyse l'adénosine extracellulaire avec les récepteurs A₁ et A_{2B} qui lient l'adénosine extracellulaire est assez singulière, les deux types de protéines ayant des actions antagonistes. Jusqu'à présent, aucune fonction hépatique n'a été démontrée pour l'ecto-ADA. Une étude plus approfondie des mécanismes aboutissant au ciblage de l'ecto-ADA à la membrane est nécessaire pour mieux évaluer son importance physiologique dans les voies de signalisation purinergiques.

1.3.2 Régénération des nucléotides extracellulaires

1.3.2.1 L'ecto-adénylate kinase (ecto-AK)

L'ecto-adénylate kinase (ecto-AK) [EC 2.7.4.3] est une enzyme qui catalyse le transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP sur une molécule d'AMP pour former deux molécules d'ADP [94]. Il existe quatre isoenzymes de l'adénylate kinase : une forme cytosolique AK1 α , deux formes mitochondriales AK2 et AK3, et une forme membranaire AK1 β ou ecto-AK. L'ecto-AK est une isoforme de l'enzyme AK1 cytosolique qui possède une séquence conservée de myristoylation N-terminale, servant de signal de localisation membranaire. Par son activité biochimique, l'ecto-AK participe à la signalisation purinergique en modulant le ratio ATP/ADP à la surface des cellules. En effet, la réaction de transphosphorylation catalysée par l'ecto-AK est réversible et permet la modulation de la signalisation activée de l'ATP via les récepteurs P2X et P2Y; mais également le recyclage de l'AMP biologiquement inactif en ADP qui est le ligand naturel de certains récepteurs P2Y [94]. L'activité phosphotransférase de l'ecto-AK est spécifique aux nucléotides puriniques et requiert la présence d'ions Mg²⁺. L'activité de cette ectoenzyme

peut être inhibée de manière sélective par la molécule diadénosine pentaphosphate (Ap₅A) [99].

L'expression de l'ecto-AK a été détectée dans plusieurs types cellulaires incluant les hépatocytes, les kératinocytes, les cellules endothéliales vasculaires, les cellules épithéliales des voies respiratoires, les lymphocytes, etc. [94]. D'un point de vue fonctionnel, une étude récente a démontré que l'activité de l'ecto-AK contribue à maintenir les niveaux d'ATP et d'ADP extracellulaires malgré la présence d'activités hydrolytiques de type NPP et NTPDase à la surface de l'épithélium des voies respiratoires, suggérant un rôle pour l'ecto-AK dans la fonction muco-ciliaire [99, 189]. Toutefois dans d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales HUVECs, les niveaux d'activité de l'ecto-AK mesurés sont relativement bas par rapport aux activités d'hydrolyse correspondant aux différentes familles de phosphohydrolases [94]. Compte tenu de la variabilité des niveaux d'activité de l'ecto-AK à la surface des différents types cellulaires, la preuve de l'importance physiologique de l'ecto-AK dans les voies de signalisation purinergiques reste à faire.

1.3.2.2 L'ecto-nucléoside diphosphokinase (ecto-NDP kinase)

L'ecto-nucléoside diphosphokinase (ecto-NDP kinase) [EC 2.7.4.6] est une ectoenzyme qui catalyse le transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP sur un nucléoside diphosphate pour former de l'ADP et un nucléoside triphosphate [190]. L'identité moléculaire de l'ecto-NDP kinase n'est pas clairement définie. Cependant, l'analyse comparative de séquence protéique montre que l'ecto-NDP kinase possède une forte homologie avec les protéines de la famille des gènes suppresseurs de tumeurs *Nm23* [94]. Les protéines *Nm23* ont été longtemps considérées comme des enzymes exclusivement cytosoliques impliquées dans le métabolisme énergétique et la réplication cellulaires. Par la suite, l'expression des protéines NDPK-A et NDPK-B, les produits respectifs des gènes *Nm23-H1* et *Nm23-H2* a été détectée à la surface de plusieurs cellules hématopoïétiques [191, 192]. Ces observations suggèrent que les protéines NDPK-A/*Nm23-H1* et NDPK-B/*Nm23-H2* sont potentiellement responsables de l'activité NDP kinase mesurée dans le milieu extracellulaire [94]. L'ecto-NDP kinase membranaire est présente sous forme

hexamérique et utilise comme accepteur les nucléosides diphosphate autant puriniques que pyrimidiniques [94]. L'activité de l'ecto-NDP kinase requiert la présence d'ions divalents comme le Mg^{2+} et est optimale à pH neutre.

L'expression de l'ecto-NDP kinase est retrouvée à la surface de plusieurs types cellulaires incluant les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, l'épithélium des voies respiratoires, les cellules gliales, les kératinocytes, les hépatocytes etc. [94]. De plus, l'expression de l'ecto-NDP kinase est également détectée dans un nombre important de tumeurs ayant pour origine les types cellulaires où elle a été identifiée, possiblement en raison de son rôle suppresseur de tumeur [190]. Une autre fonction importante associée à l'activité de l'ecto-NDP kinase est le contrôle des niveaux de nucléotides extracellulaires. Dans plusieurs études *in vitro*, des niveaux élevés d'activité de type ecto-NDP kinase ont été mesurés dans les milieux de culture de plusieurs lignées cellulaires comme les cellules C6 (gliome), les cellules 1321N1 (astrocytome), les cellules ECV-304 (cellules endothéliales HUVECs transformées) et les cellules 16HBE14o⁻ (épithélium nasal) [193]. Par exemple à la surface des cellules 1321N1 (astrocytome), l'activité ecto-NDP kinase mesurée peut générer des niveaux de nucléotides jusqu'à 20 fois plus importants que l'activité d'hydrolyse totale. Par son activité, l'ecto-NDP kinase contribue donc à maintenir dans le milieu extracellulaire les niveaux relatifs de nucléotides adényliques et uracyliques qui sont capables d'activer différentes voies de signalisation purinergiques. Néanmoins, l'importance physiologique de l'ecto-NDP kinase reste à démontrer.

1.4 Hypothèse et objectifs

Notre laboratoire s'intéresse à l'étude des ectonucléotidases NTPDase1-3 et 8, et de l'ecto-5'-nucléotidase présentes à la membrane plasmique. Nos modèles d'étude sont la souris et le rat. Mon projet est axé sur la caractérisation fonctionnelle de ces enzymes dans le foie où leur expression a été démontrée, et comporte deux volets :

A. L'identification de l'ecto-ATPase hépatique majeure des canalicules biliaires.

En 1952, une étude menée par Novikoff *et al.* décrit pour la première fois l'existence d'une activité ecto-ATPase au niveau des canalicules biliaires dans le foie [194, 195]. Par la suite, plusieurs études tentent de déterminer l'identité moléculaire de l'ecto-ATPase canaliculaire hépatique. Plusieurs protéines canaliculaires ayant une activité nucléotidase démontrée comme la pompe Na^+K^+ ATPase ou présumée comme les glycoprotéines abondantes telles que la molécule d'adhésion cellulaire cCAM-105 sont proposées et étudiées, de manière infructueuse [196, 197]. Une décennie plus tard, la démonstration de l'expression hépatique des NTPDase1 et 2 représente alors une avenue intéressante. Toutefois, leur expression est principalement associée aux structures vasculaires et aux cellules non parenchymateuses hépatiques [49, 124, 197, 198], une distribution distincte de celle observée pour l'ATPase canaliculaire. De plus, l'activité ATPase correspondant aux NTPDase1 et 2 hépatiques ne peut expliquer la forte activité ATPase totale mesurée dans le foie [197, 199]. La même observation est faite lorsque l'hydrolyse de l'ATP est mesurée dans des homogénats de foie de souris *Entpd1^{-/-}* (données non publiées, laboratoire du Dr Sévigny). Parallèlement, deux nouvelles enzymes canaliculaires hATPDase (*hepatic ATPDase*) de porc et ecto-ATPDase de poulet ayant des propriétés biochimiques similaires aux NTPDases sont identifiées et proposées comme des candidats potentiels, responsables de l'activité ATPasique observée dans les canalicules biliaires [197, 200]. Récemment, notre laboratoire a cloné une nouvelle ectonucléotidase appelée NTPDase8 chez la souris, fortement exprimée dans le foie. En se basant sur ces différents résultats et observations, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la NTPDase8 représente l'identité moléculaire de l'ATPase canaliculaire hépatique.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons défini quatre objectifs :

1. Déterminer et comparer dans le foie la localisation *in situ* des activités ATPase et ADPase détectées par histochimie enzymatique, avec le patron d'expression des NTPDase1, 2, 3 et 8 hépatiques localisées à l'aide d'anticorps générés dans notre laboratoire.
2. Isoler, purifier et identifier l'enzyme responsable de l'activité ATPDase majeure à partir de fractions membranaires de foie de rat.
3. Comparer les propriétés biochimiques de l'enzyme responsable de l'activité ATPDase majeure hépatique avec celles de la NTPDase1 et 8 recombinantes de rat.
4. Analyser et comparer entre elles les séquences protéiques de la NTPDase8 (souris, rat et humain) et la hATPDase porcine.

B. Déterminer dans le foie l'impact sur la signalisation purinergique de la distribution hépatique des ectonucléotidases majeures à pH physiologique, soit les NTPDase1, 2 et 8 et l'ecto-5'-nucléotidase.

Par définition, les NTPDases hydrolysent séquentiellement les nucléosides triphosphate en nucléosides diphosphate, puis en leurs dérivés monophosphate avec à chaque étape la libération de Pi [95]. Ainsi, l'activité des NTPDases module l'activation des différents récepteurs P2 membranaires en contrôlant les niveaux de leurs ligands dans le milieu extracellulaire. En fonction de la NTPDase impliquée, le type et la durée d'activation des récepteurs seront différents, induisant des voies de signalisation distinctes [107]. L'activité des NTPDases influence également celle de l'ecto-5'-nucléotidase en générant son substrat naturel, les nucléosides monophosphate, mais aussi en éliminant du milieu extracellulaire les inhibiteurs naturels de l'enzyme, l'ATP et l'ADP. Toutes les données sur les propriétés biochimiques des NTPDases et de l'ecto-5'-nucléotidase ont été jusqu'à maintenant obtenues à partir d'échantillons de protéines natives ou recombinantes, analysés individuellement. Dans le foie, il est possible que plusieurs types cellulaires puissent exprimer plus d'une ectonucléotidase. Nous avons voulu déterminer l'impact de la co-

expression des NTPDases et de l'ecto-5'-nucléotidase par les différents types cellulaires hépatiques sur les concentrations de nucléo(s/t)ides extracellulaires ou ligands des récepteurs P1 et P2. Pour ce faire, nous avons défini deux objectifs :

1. Déterminer la localisation comparative *in situ* des activités ATPase, ADPase et AMPase hépatiques détectées par histochimie enzymatique, avec le patron d'expression des NTPDase1, 2 et 8 et de l'ecto-5'-nucléotidase localisées à l'aide d'anticorps générés dans notre laboratoire.
2. Déterminer, par HPLC, le profil d'hydrolyse de l'ATP en présence de chaque NTPDase hépatique (activité ATPase et/ou ADPase) en combinaison avec l'ecto-5'-nucléotidase (activité AMPase) correspondant aux paires d'ectonucléotidases observées au point 1.

Chapitre 2 : Identification de l'ecto-ATPase majeure dans le foie : la NTPDase8

Cloning, purification and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8

Michel Fausther^{1*}, Joanna Lecka^{1*}, Filip Kukulski¹, Sébastien A. Lévesque¹, Julie Pelletier¹, Herbert Zimmermann², Jonathan A. Dranoff³ and Jean Sévigny^{1§}

¹Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada.

²Biocenter, J.W. Goethe-University, AK Neurochemistry, Frankfurt am Main, Germany.

³Section of Digestive Diseases, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA.

*These authors contributed equally to this work

Running head: NTPDase8 is the liver canalicular ecto-ATPase

Contact information: §Address correspondence to Jean Sévigny, Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, 2705 Boulevard Laurier, local T1-49, G1V 4G2 Québec, QC, Canada. Email: jean.sevigny@crchul.ulaval.ca; phone number: 1-418-656-4141 ext. 46319; fax number: 1-418-654-2765

List of abbreviations: ACR, apyrase conserved regions; ATPDase, adenosine triphosphate diphosphohydrolase; ConA, ConcavalinA; Ecto-ATPase, ecto-adenosine triphosphatase; EST, expressed sequence tag; kDa, kiloDaltons; LDS, lithium dodecyl sulfate; Mrp-2, multidrug resistance related protein-2; NPP, nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase; E-NTPDase, ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; ORF, open reading frame.

Résumé

Les nucléo(s/t)ides extracellulaires contrôlent plusieurs fonctions essentielles dans le foie via l'activation de récepteurs transmembranaires spécifiques. Les niveaux hépatiques des nucléo(s/t)ides extracellulaires et les voies de signalisation activées par ces derniers sont modulées par des enzymes de surface appelées ectonucléotidases, incluant les ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (NTPDase1), NTPDase2 et ecto-5'-nucléotidase/CD73. Le but de cette étude était de déterminer l'identité moléculaire de l'ecto-ATPase canaliculaire hépatique qui pourrait correspondre à la NTPDase8, récemment clonée. L'ADN complémentaire de la NTPDase8 a été cloné chez l'humain et le rat, et les gènes correspondants localisés respectivement sur les loci chromosomiques 9q34 et 3p13. Les protéines recombinantes, produites dans les lignées cellulaires COS-7 et HEK293T, ont été caractérisées biochimiquement. La NTPDase8 a été purifiée à partir de foie de rat, après solubilisation avec le détergent Triton X-100 et séparation par chromatographies DEAE, Affigel Bleu et Con A. Nos résultats démontrent que la NTPDase8 est l'ectonucléotidase majeure dans le foie. L'analyse de différents paramètres tels que la dépendance aux ions divalents, les valeurs de K_m apparent, la spécificité de substrat, le profil d'hydrolyse des nucléotides, la résistance à l'azidure de sodium ainsi que les séquences protéiques NH₂-terminales partielles montrent que les NTPDase8s recombinantes humaine et de rat, la NTPDase8 de rat purifiée et l'ecto-ATPase porcine possèdent des caractéristiques biochimiques similaires et sont des orthologues. L'analyse histochimique de l'activité ectonucléotidasique du foie montre que l'hydrolyse des nucléotides est principalement localisée au niveau des canalicules biliaires et du réseau vasculaire hépatique. Notamment, cette distribution de l'activité ectonucléotidasique dans le foie correspond au patron d'expression des NTPDase1, 2 et 8 hépatiques, déterminé par immunolocalisation. Aucune expression de la NTPDase3 n'a été détectée dans le foie. En conclusion, la NTPDase8 est l'ecto-ATPase/ATPDase canaliculaire hépatique et principalement responsable de l'activité ectonucléotidasique du foie. La localisation de la NTPDase8 au niveau des canalicules biliaires hépatiques suggère une implication de cette enzyme dans la régulation de la sécrétion biliaire et du recyclage des nucléosides.

Abstract

Extracellular nucleotides regulate critical liver functions via the activation of specific transmembrane receptors. The hepatic levels of extracellular nucleotides, and therefore the related downstream signaling cascades, are modulated by cell-surface enzymes called ectonucleotidases including nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (NTPDase1/CD39), NTPDase2/CD39L1 and ecto-5'-nucleotidase/CD73. The goal of this study was to determine the molecular identity of the canalicular ecto-ATPase/ATPDase that we hypothesized to correspond to the recently cloned NTPDase8. Human and rat NTPDase8 cDNAs were cloned and the genes located on chromosome loci 9q34 and 3p13, respectively. The recombinant proteins, expressed in COS-7 and HEK293T cells, were biochemically characterized. NTPDase8 was also purified from rat liver by Triton X-100 solubilization, followed by DEAE, Affigel Blue and ConA chromatographies. Importantly, NTPDase8 was responsible for the major ectonucleotidase activity in liver. The ion requirement, apparent K_m values, nucleotide hydrolysis profile and preference as well as the resistance to azide were similar for recombinant NTPDase8s and both purified rat NTPDase8 and porcine canalicular ecto-ATPase/ATPDase. Molecular analysis revealed that the partial N-terminal amino acid sequences of all NTPDase8s share high identity with the purified liver canalicular ecto-ATPase/ATPDase. Histochemical analysis showed the presence of high ectonucleotidase activities in the bile canaliculi and large blood vessels of rat liver, in agreement with the immunolocalization of NTPDase1, 2, 8 with antibodies developed for this study. No NTPDase3 expression could be detected in liver. In conclusion, NTPDase8 is the canalicular ecto-ATPase/ATPDase and is responsible for the main hepatic NTPDase activity. The canalicular localization of this enzyme suggests its involvement in the regulation of bile secretion and/or nucleoside salvage.

Keywords: ecto-ATPDase, P1/P2 receptors, ATP, adenosine, nucleoside transporters

Introduction

In liver, extracellular nucleotides are critical regulators of biological functions such as regulation of cell volume and proliferation [33, 146, 201, 202]. These effects are mediated by specific nucleotide P2 receptors [67] which are subdivided into P2X₁₋₇ (ion-gated channels) and P2Y_{1,2,4,6,11-14} (G-protein coupled receptors) [21, 203]. The levels of P2 receptor agonists are regulated by various enzymes expressed at the cell surface called ectonucleotidases. This group of enzymes includes members of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family which is composed of eight proteins (NTPDase1-8). NTPDases hydrolyze tri- and diphosphonucleosides into their monophosphate counterparts with different ability and specificity [95, 106]. Among all tissues, the liver has one of the highest ATPase and ADPase activities [204]. Histochemical studies showed that most of liver ectonucleotidase activity was associated with the canalicular domain of hepatocytes [205]. It was originally believed that this activity, which was different from a classical ATPase activity, was due to a protein structurally similar to the adhesion protein cCAM 105 [206]. However, this protein was later shown to be an embryocarcinogenic antigen that could not explain the high ATPase activity in this tissue [196]. Further studies revealed that NTPDase1 is expressed by Kupffer cells and vascular endothelial cells [197] whereas NTPDase2 is produced by portal fibroblasts and activated hepatic stellate cells [124, 198]. Yet, activity assays indicated that the combined activity of both enzymes could not account for the major ectonucleotidase activity observed in the liver [197]. Thereafter, the major ectonucleotidase activity in porcine liver was shown to bear the basic properties of an NTPDase [197, 207]. Interestingly, this enzyme called hepatic ATPDase was localized in bile canaliculi membrane and was proposed to be responsible for the high ectonucleotidase activity previously detected in liver [205, 208]. This ectonucleotidase represents the oldest canalicular marker and has been of great importance to liver cell biologists [194, 197, 205]. We have recently cloned a novel member of the E-NTPDase family in mouse and designated it NTPDase8 [137]. In the present work, we report the cloning and biochemical characterization of NTPDase8 in human and rat species and its identification as the hepatic canalicular ecto-ATPase/ATPDase.

Materials and Methods

Materials

Culture cell media were obtained from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Agarose, aprotinin, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), nucleotides, tetrabutylammonium hydrogen sulphate, ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N-N-N'-N'*-tetraacetic acid (EGTA) and sodium deoxycholate were provided by Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), sodium azide by Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ), Triton X-100 by Roche Diagnostics GmbH (Manheim, Germany), Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane (Bis-Tris), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) by EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). TOPRO-3 dye was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR) and hematoxylin from Biomeda Corporation (Foster City, CA).

Animals and antibody production

Sprague-Dawley rats, Hartley guinea pigs and New Zealand rabbits were obtained from Charles River Laboratories (Québec, QC, Canada). Genetic immunization protocol was carried out with plasmids (pcDNA3.1) encoding each protein, in New Zealand rabbits for antibodies against rat NTPDase1, and Hartley guinea pigs for rat NTPDase8 antibodies. All procedures were approved by the Canadian Council on Animal Care and the "Université Laval" Animal Welfare Committee.

Plasmids

Cloning: The plasmid encoding rat NTPDase1 (GenBank accession no. NM_022587) has been described in a published report [103]. The complementary DNAs (cDNAs) encoding human NTPDase8 (AY430414) or rat NTPDase8 (AY536920) were cloned as follows. Total RNA was isolated from rat liver with Trizol reagent (Invitrogen) or obtained from AMBION (Austin, TX) (kindly donated by Dr. C. Guillemette, CRCHUL, Université Laval). The cDNA was synthesized with SuperScript®II (Invitrogen) with oligo(dT)₁₈ as the primer, in accordance with manufacturer's instructions. For amplification, 10% of the reverse transcription (RT) reaction was used as template in a reaction mixture containing 0.6 µM primer, 400 µM dNTP and 3.5 U Expand High Fidelity PCR System (Roche, Laval,

Canada) with Mg^{2+} concentrations of 1.5 mM for rat or 2.5 mM for human. Amplification was done with primers designed from human or rat “expressed sequence tags” (ESTs; XM_231041 and AI535212, respectively), that revealed highest homology to mouse NTPDase8 (AY364442): one human forward sequence 5'-CCA-GTA-CCA-CCT-GCA-CCA-3' and two reverse sequences 5'-GCA-GAA-AGG-CAC-CTA-CGG3', 5'-GGG-GTC-CCT-GCT-GTG-TTC-3'; rat sequences, forward 5'-TCA-GCC-CCT-CCC-ACC-ATG-AGA-CTT-3' and reverse 5'-TGT-TTC-TAT-CCC-TGG-GGC-AAC-T-3'. Amplification for human NTPDase8 (or rat) was started by an incubation of 2 min at 94°C, followed by 30 cycles of 30 s (rat: 15 s) denaturation at 94°C, 15 s annealing at 55.5°C (rat: 30 s at 60°C) and 2 min primer extension at 72°C, and ended with 10 min incubation at 72°C. The PCR products of approximately 1.5 kb were purified on 1% agarose gel using the QIAEX II gel extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and ligated into the expression vector pcDNA3.1/V5-His (Invitrogen). Plasmids were purified with QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and orientation of the inserts determined by restriction-enzyme mapping. One clone obtained with each set of primers was amplified and fully sequenced in one direction. These plasmids were used for transfection and generation of antisera.

Characterization of genomic sequences: The human and rat NTPDase8 cDNA sequences were used to blast the National Center for Biotechnology Information (NCBI) genome database. The sequences identified as NT_024000.16 and NW_047651.2 showed 100% homology with human and rat NTPDase8 cDNAs, respectively. The genomic sequences and exon/intron junctions were analyzed with NCBI BLAST programs.

Purification of rat liver NTPDase8

Rat liver membrane fractions and protein solubilization were prepared as previously described [112]. Membrane proteins (6 mg/ml) were mixed with an equal volume of 0.6% Triton X-100. Purification of NTPDase8 was done by column chromatography using a Pharmacia FPLC system. Triton-solubilized proteins (500 mg) were applied to a DEAE fast flow Sepharose column (DEAE 10 cm x 2.5 cm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and resolved in the presence of 0.1% Triton X-100, 7.5% glycerol and 10 mM Tris pH 8.0, with a NaCl gradient: no salt for 0-50 min, 0.03 M NaCl for 50-150 min, 0.03-0.13 M NaCl for 150-650 min, 0.13 M NaCl for 650-750 min. Unless indicated otherwise,

chromatographies were carried out at the flow rate of 1 ml/min and 2 ml fractions were collected. Samples containing NTPDase8, as determined by activity assay and by immunoblotting were pooled, re-equilibrated by ultrafiltration in an Amicon stirred cell in 0.1% Triton X-100 and 25 mM Tris/His pH 5.95 (Millipore PBTK membrane, MWWL 30,000) and applied to an Affigel blue column (20 cm x 1 cm, BioRad, Hercules, CA). Affigel Blue unbound material was washed out with 20 ml of re-equilibrating buffer, and the elution of retained proteins was done by a gradient developed from 0.1% Triton X-100, 7.5% glycerol and 10 mM Tris pH 6.8 (buffer A) and 0.1% Triton X-100, 7.5% glycerol, 1 M NaCl and 10 mM Tris pH 7.5 (buffer B). The following chromatography program was used: gradient A→B from 0% to 100% for the first 2 hours and 100% B for the following 2½ hours. NTPDase8-enriched fractions were pooled and re-equilibrated in ConavalinA (ConA) buffer (1 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 0.1% Triton X-100 and 20 mM Pipes/OH pH 6.8) and loaded on a ConA Sepharose column (Amersham Biosciences, 5 ml) at gravity flow. Unbound proteins were washed out with 6x bed-volume of ConA buffer. NTPDase8 and other remaining glycosylated proteins were desorbed with 0.5 M methyl α -D-mannopyranoside (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) in ConA buffer. For the biochemical characterization, mannopyranoside removal and enzyme concentration (to ~1 mg/ml) were done by ultrafiltration with Centurion® [YM-30] filter devices (Amicon).

Cell transfection and NTPDase activity assays

African green monkey COS-7 or human embryonic kidney 293T cell transfection and preparation of cell lysates were carried out as described previously [209]. Enzyme activity and HPLC hydrolysis profiles were determined as previously described [209]. Intact transfected cells were assayed in 24-well plates. Where indicated, cell lysates were incubated with sodium azide or sodium deoxycholate salts. In assays using sodium deoxycholate, reaction mixtures (100 μ l) were added to 1 M perchloric acid 1:1 to stop the reaction and precipitate the sodium deoxycholate salt before phosphate estimation. Phosphate released was measured by the malachite green assay [210]. In all assays, less than 10% of substrate was hydrolyzed.

PAGE and immunoblotting procedures

Subcellular membrane fractions of rat hepatocytes were prepared following the method of Kipp and Arias [211]. Protein concentration was estimated by the Bradford microplate assay using bovine serum albumin (BSA) as a standard [212]. Protein samples were resuspended in 2% (w/v) lithium dodecyl sulfate (LDS) sample buffer and fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under non-reducing conditions according to Laemmli [213]. Proteins were transferred to Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA) by electroblotting. After incubation with primary antibodies, proteins of interest were visualized with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit, Amersham Biosciences, Boston, MA; anti-guinea pig, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA) and the Chemiluminescent Reagent Plus (Perkin-Elmer, Boston, MA), as recommended.

Immunohistochemistry, immunofluorescence and enzyme histochemistry

For immunohistochemistry, sections of snap-frozen rat liver (6 μm) or cultured cells (10^5 per coverslip) were fixed in cold acetone (Fisher) mixed with 10% phosphate-buffered formaline (Fisher), and incubated with rabbit polyclonal sera to rat NTPDase1 (rN1-6_L), NTPDase2 (BZ3-4F) [124] or a guinea pig polyclonal serum to rat NTPDase8 (rN8-8_C), as described previously [116]. Immunofluorescence was performed with polyclonal rN8-8_C serum and monoclonal anti-multidrug resistance related protein-2 (Mrp-2) antibody (kindly donated by Dr. C. Soroka, Yale Liver Center), as previously described [124]. Localization of ectonucleotidase activities was determined using the Wachstein/Meisel lead phosphate method [214].

Results

Since the presence of NTPDase1 and NTPDase2 have already been demonstrated in the liver and could not account for the canalicular ectonucleotidase activity and that there are low levels of NTPDase3 mRNA in this tissue, we hypothesized that NTPDase8 was responsible for this activity. To address this assumption, we first looked for the existence of NTPDase8 in human and rat and cloned the respective cDNAs.

Cloning and characterization of human *ENTPD8* and rat *Entpd8* cDNAs: The sequence of human NTPDase8 includes an open reading frame (ORF) of 1,485 nucleotides (rat: 1,482) which is translated into a protein of 495 amino acid residues (rat: 494) with a predicted molecular mass of 53,888 Daltons (Da; rat: 54,330) and a calculated isoelectric point of 5.19 (rat: 5.83). The deduced amino acid sequence contains seven (rat: eight) potential N-glycosylation sites, five “apyrase conserved regions” (ACRs) featured by all NTPDases, and various potential phosphorylation sites. Interestingly, there is a conserved potential phosphorylation site for both protein kinase C and casein kinase II on the fourth amino acid of mouse [137], human and rat NTPDase8s. Hydrophobicity analysis of human and rat NTPDase8s predicts two transmembrane domains, one near the N-terminus (amino acids 9-30, for both enzymes) and one near the C-terminus (amino acids 472-488 for human and 466-488 for rat). Both human and rat cDNAs were deposited in the database (Table A1). Sequence analysis on the Website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/> localized the genes to chromosome 9q34 (entry NT_024000.16) for human and chromosome 3p13 (NW_047651.2) for rat. Alignment of the full cDNA with the human genomic sequence reveals that *ENTPD8* covers 3,631 bases and is organized into 9 exons (data not shown). The rat gene study is not yet completed because of inconsistencies in information available from databases. However, our most recent analysis indicates that it would be organized into 9 exons with localization of ACRs regions, similar to those found in *ENTPD8* and mouse *Entpd8*.

When compared with the N-terminal sequence of the canalicular ecto-ATPase/ATPDase purified from porcine liver, the N-terminal amino acid sequence deduced from the coding sequence of *ENTPD8* shows highest homology (60%), followed by mouse and rat

NTPDase8s (54.9% and 42.8%; Table A1). Comparison of partial pig ORF sequence with human, mouse, rat and chicken corresponding ORFs portions showed high homology: 81%, 79.5%, 77.7% and 61.9% respectively (Table A1). These data suggest that NTPDase8 and the hepatic canalicular ecto-ATPase/ATPDase are identical proteins.

Cellular distribution of NTPDases in rat liver: To further characterize hepatic NTPDases, antibodies were developed and specificity verified by immunocytochemistry and immunoblotting (Fig. A1). Antibodies to NTPDase1, 2 and 8 were all specific, as verified by cross-reaction experiments in transfected COS-7 cells (data not shown). These antibodies also stained different cells in liver tissue (Fig. A2), confirming that the antibodies do not cross-react.

Expression of NTPDase8 was evaluated in murine particulate fractions by immunoblotting with the serum rN8-8C. A strong protein band with molecular weight of about 75 kDa was detected in rat liver while weaker bands were observed in kidney and jejunum (Fig. A1B, right panel). No signal could be detected in tissues devoid of NTPDase8 mRNA expression such as spleen (data not shown). Interestingly, a very intense NTPDase8 immunoreactive band was detected in a canalicular membrane vesicle preparation, suggesting the presence of NTPDase8 in this cellular compartment (Fig. A1B, right panel). Additionally, and in agreement with this observation, NTPDase8 expression was limited to the canalicular domain of hepatocytes (Fig. A2, upper panels). This result was confirmed by the colocalization of NTPDase8 with the canalicular transport protein Mrp-2 (Fig. A2, middle panels). No NTPDase8 immunostaining was detected neither in other compartments of the biliary tree, such as small and large bile ducts nor the portal space area. Immunostaining of NTPDase1 on rat liver sections showed its expression at the surface of vascular endothelium, Kupffer cells and smooth muscle cells (Fig. A2). NTPDase2 was detected at the external surface of blood vessels and periductular area. No staining was observed with an antiserum to NTPDase3 (data not shown). The combined immunohistological expression pattern of NTPDase1, 2 and 8 observed here in rat liver correlates with histochemical data with ATP, UTP, ADP and UDP (Fig. A2, lower panels and data not shown). Indeed, the hydrolysis of all nucleotides was detected mainly at the bile canaliculi and at the luminal surface of large blood vessels. In bile canaliculi, the hydrolysis of diphosphonucleosides

was fainter than the one of triphosphonucleosides, in agreement with the biochemical properties of NTPDase8 (see below).

Purification of NTPDase8 from rat liver: To evaluate the relative contribution of each ectonucleotidase in the liver, we purified ectonucleotidase activities from rat liver and identified the enzymes involved with an emphasis on NTPDase8. DEAE was chosen for the separation of NTPDase1, 2 and 8 because these enzymes are characterized by different predicted isoelectric points of 7.5, 8.8 and 5.83, respectively. This separation resulted in three ATP- and ADP-hydrolyzing fractions (Fig. A3A and data not shown). Immunoblotting revealed that peaks 2 and 3 corresponded to NTPDase1 and NTPDase8 respectively, as expected from their isoelectric points. The first peak of activity can be attributed to NTPDase2 because of its isoelectric point and chromatograms from previous purifications [215]. A qualitative assessment of surface areas of activity in figure 3A suggests that the main nucleotidase activity in the liver is attributable to NTPDase8. A particular attention was taken to exclude fractions containing NTPDase1 in the NTPDase8 pooled fractions that were further separated on an Affigel Blue column. One peak of ATPase and ADPase activities was obtained, that did not contain NTPDase1, as verified by immunoblotting (Fig. A3B and data not shown). In order to exclude contamination with ecto-5'-nucleotidase, fewer fractions with NTPDase8 activity were pooled and applied to a ConA affinity column, as indicated in the figure. One peak of activity corresponding to NTPDase8 was observed, as confirmed by immunoblotting (data not shown). During the purification process, a clear increase in NTPDase8 contents can be observed (Fig. A3C).

Note that the purification factor of NTPDase8 shown in Table A2 is underestimated as there are no specific substrates for NTPDase8. Phosphatases, ATPase pumps, nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (NPPs) and other NTPDases, including intracellular NTPDase4-7, can also hydrolyze the same substrates. These enzymes are present in the homogenate but are most likely eliminated during the steps of purification. In addition, as alluded above, to avoid contamination with other ectonucleotidases, some fractions with high NTPDase8 activity were discarded during the purification procedure. This resulted in an important loss of NTPDase8 and a much lower purification factor of the enzyme (Table

A2). Most importantly, the ConA purified NTPDase8 fraction was almost completely devoid of any other nucleotidases, allowing its biochemical characterization.

Biochemical characterization of NTPDase8s: The biochemical properties of human and rat recombinant NTPDase8s were determined with cell lysates and with intact COS-7 and 293T cells transiently transfected with an expression vector (pcDNA3.1) encoding either human or rat NTPDase8. Activity assays were carried out for 12 to 20 min to ascertain the linearity of the reaction (data not shown). Recombinant human and rat NTPDase8s, as well as purified rat NTPDase8, required Ca^{2+} and Mg^{2+} for biochemical activity with a marked preference for Ca^{2+} for all nucleotides tested. The substrate specificity of these enzymes was measured in the presence of Ca^{2+} (Fig. A4). Both recombinant enzymes hydrolyzed ATP, UTP, ADP and UDP and preferred the triphosphonucleosides. In these assays, we observed some variation in the ratio of hydrolysis of ATP/ADP between intact cells and cell lysates as well as between the cell lines transfected. Neither recombinant human nor rat NTPDase8 hydrolyzed AMP (data not shown). The purified enzyme from rat liver hydrolyzed tri- and diphosphonucleosides with a ratio ATP/ADP of 0.94 and UTP/UDP of 0.98. The NTPDase8 ConA purified fraction could still hydrolyze AMP at the rate of 16% of ATP, but this was most likely due to the presence of some remaining ecto-5'-nucleotidase (see Fig. A3B).

Next, we tested if azide, an inhibitor of NTPDase1 [216], could affect the activity of recombinant and purified NTPDase8s. ATPase and ADPase activities of NTPDase8s were less affected by 10 mM sodium azide than the recombinant NTPDase1s (Fig. A4B and data not shown). Since the purified enzymes were solubilized in Triton X-100, the effect of this detergent was tested. NTPDase1 has been previously reported to be highly sensitive to azide inhibition after solubilization in Triton X-100 [197]. Once solubilized in this detergent, recombinant rat NTPDase8 was totally resistant to azide inhibition, as for the purified enzymes.

We also compared the activity of NTPDase1 and NTPDase8 in the presence of a common bile salt, sodium deoxycholate, which has been reported to affect differently bovine spleen NTPDases (dominantly NTPDase1) and porcine liver ATPDase activities [207]. ATPase and ADPase activities of these recombinant NTPDases were affected similarly by

deoxycholate (Fig. A4C and data not shown), suggesting that the canalicular micro-environment, rather than the NTPDase, is responsible for the enzyme resistance to deoxycholate.

The apparent K_m and V_{max} values of recombinant human NTPDase8 are summarized in Table A3. In agreement with its kinetic constant, NTPDase8 hydrolyzed ATP and UTP first to their respective diphosphonucleoside and then to the monophosphonucleoside with the distinction that ADP was dephosphorylated to AMP much faster than UDP to UMP (Fig. A5). This resulted in an accumulation of UDP. Simultaneous hydrolysis of ATP and UTP confirmed that human NTPDase8 preferred adenine over uracil nucleotides as substrates, as expected from the kinetic values. Purified rat NTPDase8 also displayed similar nucleotide preferences and hydrolysis profiles when compared to its recombinant isoform (data not shown).

Discussion

By molecular cloning (1) biochemical approaches (2) and immunolocalization (3), we have demonstrated that the newly cloned ectonucleotidase NTPDase8 accounts for the high ectonucleotidase activity observed in the bile canaliculi. Thus, the molecular identity of the long known hepatic canalicular ecto-ATPase is NTPDase8.

1) The existence of human and rat liver NTPDase8s was established by cDNA cloning based on a sequence homology with the mouse NTPDase8 [137]. Importantly, the transfection of COS-7 and HEK293T cells with an expression vector encoding human or rat NTPDase8 led to the appearance of nucleotidase activity at the cell surface, demonstrating that these enzymes are ectonucleotidases. Genomic analysis with these cDNAs revealed that *ENTPD8* is localized on chromosome 9q34 and rat *Entpd8* on chromosome 3p13. The distinct localization of *ENTPD8* and rat *Entpd8* confirms that the products of these genes are different from the other previously characterized NTPDases [209]. Analysis of the deduced amino acid sequence of these NTPDase8s with the canalicular ecto-ATPase/ATPDase purified from porcine liver showed high homology, suggesting that these enzymes are identical.

2) Our purification procedure combined with immunoblotting experiments showed that NTPDase8 is responsible for the main ectonucleotidase activity in liver. In rat liver, the combined ecto-ATPase activities of the two other ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2 were far less than that of NTPDase8 alone. In further support for this notion, ectonucleotidase activity and histochemistry performed in *Entpd1^{-/-}* mice showed that, despite the absence of NTPDase1, the liver of these mice retained most ATPase and ADPase activities (O. Guckelberger and J. Sévigny, personal observations). Recombinant human and rat NTPDase8s as well as the purified rat NTPDase8 favored hydrolysis of triphosphonucleosides over diphosphonucleosides also with a preference for adenine over uracil nucleotides. All NTPDase8s preferred Ca^{2+} over Mg^{2+} for nucleoside triphosphatase and diphosphatase activities and were resistant to sodium azide. Similar properties were previously described for recombinant mouse NTPDase8 and purified porcine hepatic ATPDase [197]. We have also observed that the solubilization of rat NTPDase8 with Triton X-100 affected the biochemical properties of the enzyme. For example, the addition of

Triton to rat recombinant NTPDase8 made this nucleotidase more resistant to azide. This effect may be due attributable to the transmembrane domains of the enzyme, as shown by Knowles *et al.* with a mutant of human NTPDase8 lacking both hydrophobic domains [217]. In general, the recombinant enzyme cloned from human by the latter group showed similar biochemical characteristics with some differences for deoxycholate and azide inhibition that may be due to different buffer conditions.

3) Histochemical data showed that the ectonucleotidase activity in the liver matched the immunolocalization pattern of NTPDase1, 2 and 8. NTPDase8 accounted for the activity in the bile canaliculi. NTPDase1 and NTPDase2 were responsible for the ectonucleotidase activity in blood vessels; NTPDase1 was present on endothelial cells and smooth muscle cells while NTPDase2 was on adventitial cells. NTPDase2 was also detected on portal fibroblasts, in the vicinity of bile ducts. These observations for NTPDase1 and NTPDase2 are in agreement with previous reports [124, 197].

Other hepatic ectonucleotidases have been previously reported in the liver and their contribution to nucleotide hydrolysis needs to be considered as well. The expression of NPP1 and NPP3 has been described in rat liver [150, 154, 218, 219]. The products of triphosphonucleoside hydrolysis by NPPs are a monophosphonucleoside and a pyrophosphate group, both undetectable by the malachite green method used in this work to estimate ectonucleotidase activity [106, 220]. The latter enzymes are meanwhile more active in alkaline pHs than at physiological pH [219]. Another class of ectonucleotidases expressed in the liver is the alkaline phosphatase family [106]. However, their contribution to the ectonucleotidase activity in the liver may be considered minimal in our experiments, as the hydrolysis of tri-, di- and monophosphonucleosides was not significantly reduced in the presence of tetramisole, an inhibitor of this enzyme.

Taken together, these data indicate that NTPDase8 is the canalicular ecto-ATPase/ATPDase and, moreover, accounts for the major liver ectonucleotidase activity. The highly specific localization and biochemical properties of NTPDase8 suggest potential functions in the liver. NTPDase8, which efficiently hydrolyzes ATP and UTP, may attenuate and/or terminate the activation of receptors for these two nucleotides (P2X₁₋₇ and P2Y_{2,4,11}), but may also favor the activation of ADP and UDP specific receptors

(P2Y_{1,6,12,13}), as it produces a transient accumulation of diphosphonucleosides. As a result, NTPDase8 would modulate the activity of P2 receptors present in the hepatocyte membrane bordering the bile canaliculi upstream, but also along the epithelium lining the intrahepatic biliary tree downstream. Interestingly, the expression of multiple P2 receptors (P2X_{2-4,6} and P2Y_{1,2,4,6,13}) mRNAs has been reported in hepatocytes [221] and cholangiocytes [69, 222, 223]. The activation of these nucleotide receptors is involved in the regulation of various functions like cell volume regulation, ATP release, ion secretion and bile formation [69, 85, 201, 222, 224-228]. A potential function of NTPDase2 in the physiology of cholangiocytes has recently been demonstrated *in vitro* [144]. In the latter study, NTPDase2 expressed by portal fibroblasts blocked the mitogenic response of neighboring cholangiocytes, through the modulation of their basolateral P2Y receptors.

The co-expression of NTPDase8 with ecto-5'-nucleotidase/CD73 (data not shown and [229]) in the bile canaliculi suggests that the monophosphonucleosides (e.g. AMP) eventually produced by NTPDase8 are further dephosphorylated to the nucleosides (e.g. adenosine), also responsible for various biological functions in liver. For example, adenosine has been shown to protect the liver against inflammation-induced injury via specific A_{2A} receptor activation [55, 230, 231]. By their enzymatic activities, NTPDase8 and ecto-5'-nucleotidase would control the levels of nucleotide/nucleosides present in the bile flow and possibly their salvage/reuptake by hepatocytes. Of great importance for such a function, nucleoside transporters are also highly expressed in the canalicular domain of hepatocytes [33, 232, 233]. There are evidences that nucleotides are released from hepatocytes and bile duct cells *in vitro*; the concentration of adenine nucleotides in canalicular effluents was estimated in the order of 0.1 to 5 μ M [21, 234]. As liver represents the major source of purines for tissues incapable of *de novo* nucleotide synthesis such as brain, intestinal mucosa, muscles and bone marrow, adequate nucleotide hydrolysis and nucleoside reuptake in the bile canaliculi may be essential for maintenance of purine balance at the extrahepatic level.

In summary, the canalicular ecto-ATPase is NTPDase8. The co-expression of NTPDase8, CD73 and nucleoside transporters in bile canaliculi suggests the importance of extracellular

nucleotide signaling in the control of bile secretion and in nucleoside/nucleotide balance and reuptake.

Acknowledgements

The authors thank Dr. J.L. Boyer (Yale University School of Medicine) for drafting suggestions and Dr. R. Lemmens (Limburgs Universitair Centrum, Belgium) for donation of a purified porcine liver ATPDase sample.

Financial support

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-49460 to J.S.) and National Institutes of Health Grant DK02379 (to J.A.D.). M.F. is a recipient of a scholarship from the government of Gabon, F.K. of a fellowship from CIHR/Wyeth, S.A.L. from "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ) and J.S. of a New Investigator award from the CIHR.

Tables and Figures

Table A1: Alignment of amino acid sequences of the purified porcine canalicular ecto-ATPase/ATPDase with NTPDase8s and chicken ATPDases.

Enzyme name	GenBank accession number or reference ^a	NH ₂ -terminal amino acid sequence	Identity (%)	
			NH ₂ -terminal	cDNA-based homology
Porcine canalicular ecto-ATPase/ATPDase	Séigny <i>et al.</i> 2000(51)	-GQTRKDRVFTALLAAA	100	n/a
Porcine EST	BF192072 / BG894445	MGQTRKDRVFTALLWAA	85.3	100
Human NTPDase8	AY430414	MGLSRKEQVFLALLGAS	60.0	64.0
Mouse NTPDase8	AY364442	MGLSWKERVFMALLGVA	54.9	58.1
Rat NTPDase8	AY536920	MRLSWKERVFMVLLGVA	42.8	58.3
Chicken ATPDase	AF426405	MEYKGGKVVAGLLTATCV	28.2	37.3
Chicken stomach ecto-apyrase/ATPDase	Lewis-Carl and Kirley, 1997(36)	MEYKGGKVVAGLLTATWV	28.2	n/a

^a References are provided for partial amino acid sequences obtained from purified proteins and accession numbers are given for cDNA sequences used to deduce the amino acid sequence.

Table A1: Alignment of amino acid sequences of the purified porcine canalicular ecto-ATPase/ATPDase with NTPDase8s and chicken ATPDases.

Alignment of the NH₂-terminal amino acid sequence of the purified porcine canalicular ecto-ATPase/ATPDase was done with various NTPDase8s, chicken ATPDase and purified chicken stomach ecto-apyrase/ATPDase. The identical amino acids between the different sequences are underlined. The indicated percentage of amino acid identity was calculated using the sequence of the porcine canalicular ecto-ATPase/ATPDase as template and determined by pair wise alignment. Once translated into amino acids, the 5'ends of a porcine liver EST revealed to be nearly identical to this enzyme. The "cDNA-based homology" was calculated by comparing the deduced partial amino acid sequence (260 aa of ORF) obtained from overlapping porcine ESTs to the corresponding sequences of all NTPDase8s (determined by pair wise alignment). All forms of NTPDase8 have high homology with the porcine liver canalicular ecto-ATPase/ATPDase, suggesting that all these proteins are orthologues.

Table A2: Summary table of rat liver NTPDase8 purification.

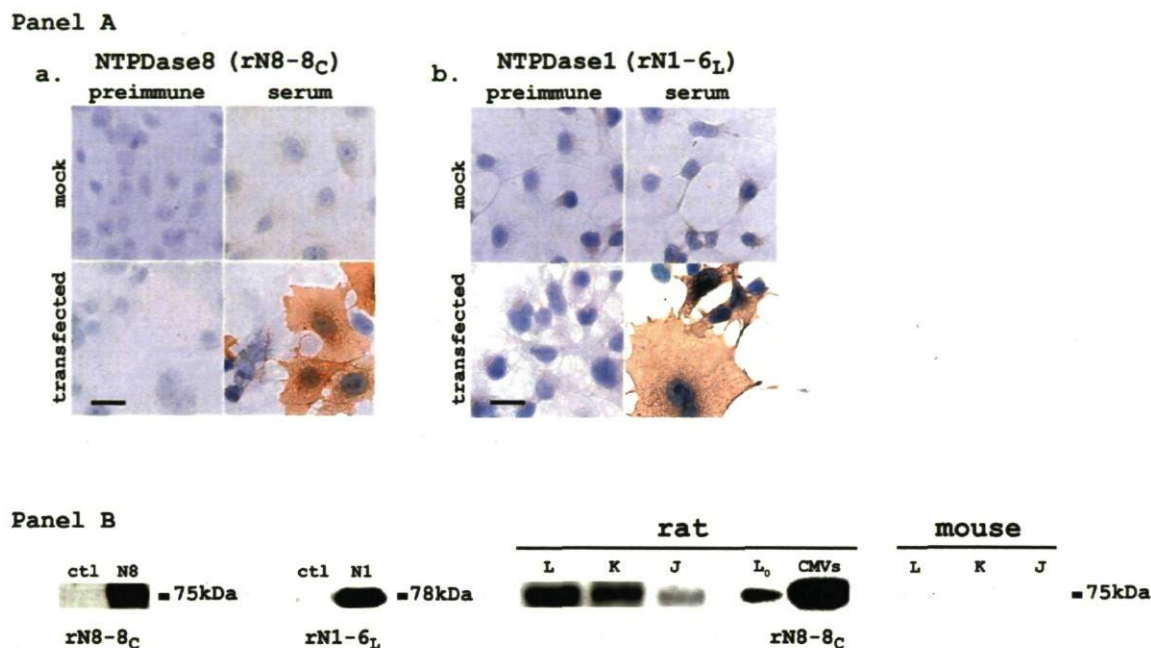
Step	Total protein (mg)	Total activity ($\mu\text{mol Pi}/\text{min}$)			Specific activity ($\text{nmol Pi}/\text{min}\cdot\text{mg}$)			Purification fold		Yield (%)	
		ATP	ADP	AMP	ATP	ADP	AMP	ATP	ADP	ATP	ADP
Homogenate	19,000	1067	615	461	56	32	24	1	1	100	100
Particulate fraction	998	187	76	27	187	76	27	3.3	2.4	17.5	12.4
Particulate fraction + Triton X-100	998	153	112	231	153	112	231	2.7	3.5	14.3	18.2
Solubilized proteins	918	55	62	108	60	68	118	1.1	2.1	5.1	10
DEAE	160	7	11	20	44	69	22	0.8	2.1	0.7	1.8
Affigel	9.2	0.80	1.40	0.70	87	152	76	1.5	4.8	0.07	0.2
ConA	0.86	0.39	0.40	0.10	454	465	116	8	15	0.04	0.07

Table A3: Kinetic parameters of human recombinant NTPDase8.

Substrate	K_m (μM)	V_{max} (nmol Pi/min*mg)
ATP	81 ± 7	790 ± 35
ADP	137 ± 13	163 ± 9
UTP	480 ± 32	1100 ± 50
UDP	241 ± 17	110 ± 4

Human NTPDase8 exhibited Michaelis-Menten kinetics for the hydrolysis of ATP, ADP, UTP and UDP. Apparent K_m and V_{max} values were estimated from Eadie-Hofstee plots created with GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Results are expressed as the mean \pm SEM of three separate experiments, each performed in triplicate

Figure A1: Specificity of antibodies to rat NTPDases.



The specificity of polyclonal sera to rat NTPDase8 (rN8-8_C) and NTPDase1 (rN1-6_L) was tested in A by immunocytochemistry and in B by immunoblotting.

A) Immunocytochemistry on mock or transfected COS-7 cells with plasmids encoding rat NTPDase8 (a) or rat NTPDase1 (b). Transfected cells expressing rat NTPDase8 displayed a high staining with rN8-8_C (a, lower right), whereas untransfected cells (mock) were devoid of immunoreactivity (a, upper right) as well as when the preimmune serum was incubated with these cells (a, two left panels). Similar results were obtained with sera to rat NTPDase1, rN1-6_L (b). *Scale bar 20 μm.*

B) Immunoblotting of protein extracts from mock (ctl) or transfected COS-7 cells with plasmids encoding rat NTPDase8 (N8) or rat NTPDase1 (N1) and protein fractions from rat and mouse tissues. Protein samples of 6 μg, for cell lysates (recombinant proteins), or 10 μg for murine tissues, were loaded in each well. Each serum is specific for its antigen, as demonstrated by immunoblotting with transfected cell lysates (left and middle panels). When tested on protein extracts from murine tissues, rN8-8_C detected NTPDase8 in liver (L; highest expression), kidney (K) and jejunum (J) from rat species, but not from mouse (right panel). Subcellular membrane fractionation of rat liver showed a much higher intensity of the NTPDase8 immunoreactive band in the canalicular membrane vesicle fraction (CMVs) than in the total liver membrane fraction (L₀). Molecular weights are indicated in kDa.

Figure A2: Cellular localization of ectonucleotidases in rat liver.

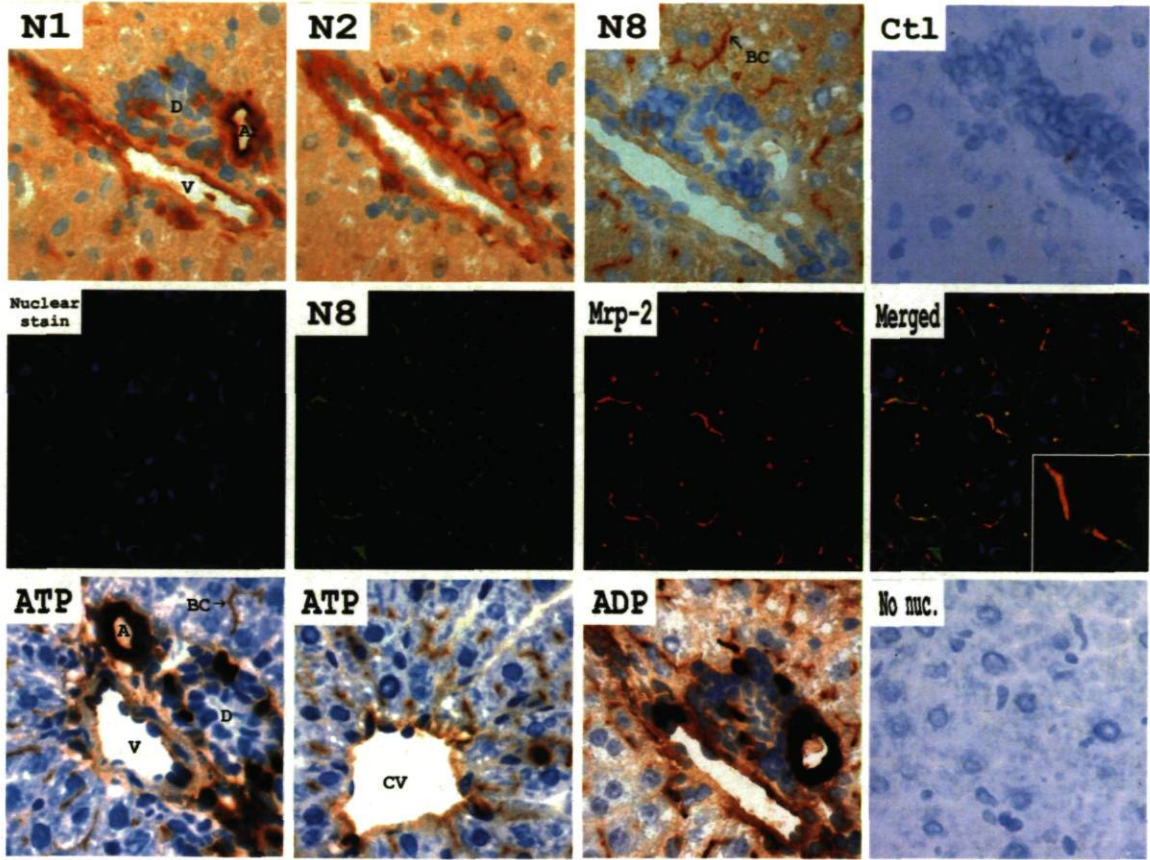
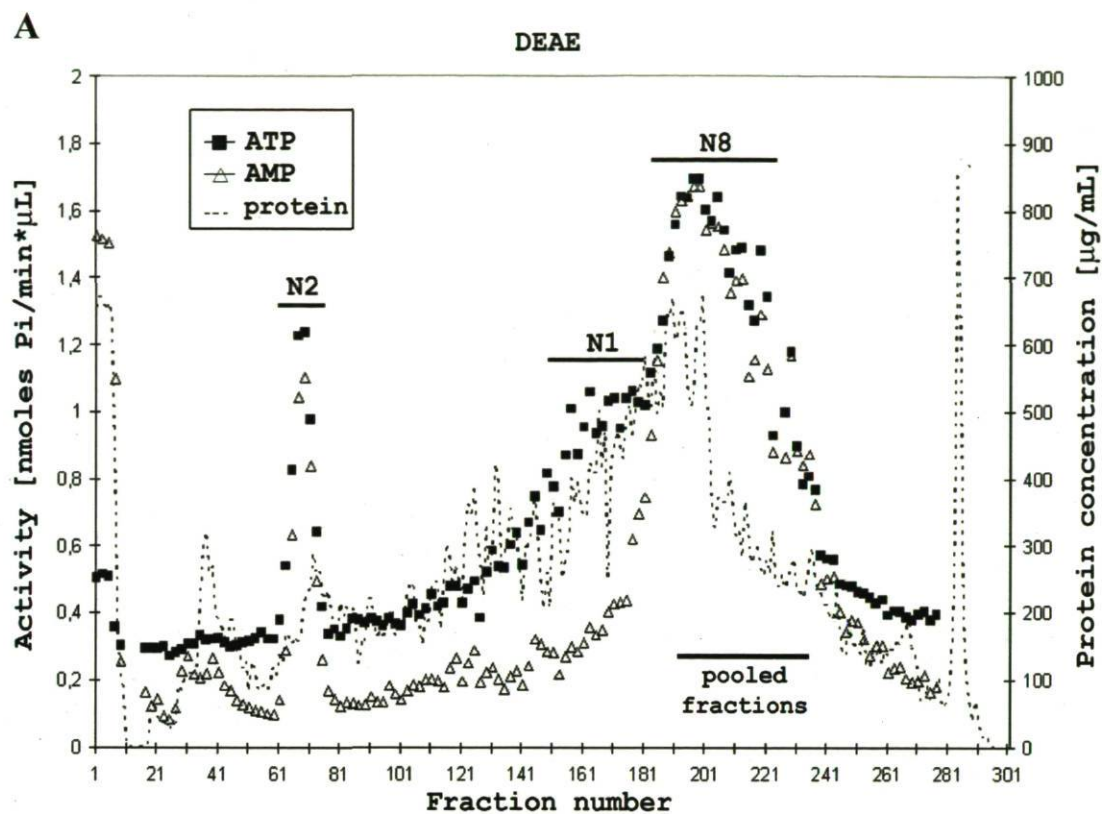


Figure A2: Cellular localization of ectonucleotidases in rat liver.

Upper panels: The distribution of rat NTPDases was determined in consecutive rat liver sections by immunohistochemistry, as described in "Materials and methods". Counterstaining of nuclei in blue was performed with aqueous hematoxylin. No staining is observed in control sections incubated with preimmune sera (Ctl). While NTPDase1 is detected at the luminal surface of large blood vessels (N1), NTPDase2 is present at the external face of large blood vessels and in periductular area (N2). Rat NTPDase8 staining is restricted to the canalicular domain of hepatocytes (N8). Portal artery (A), portal vein (V), duct (D), bile canaliculus (BC). *Scale bar 20 μ m.*

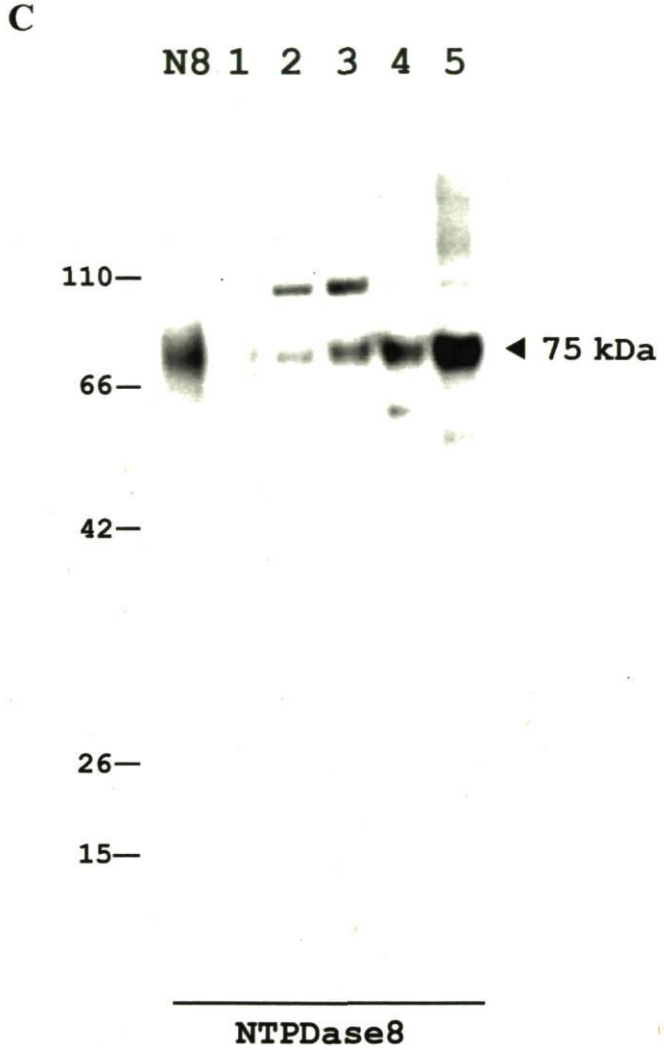
Middle panels: To confirm the canalicular localization of NTPDase8, double immunofluorescence staining was performed with a Mrp-2 antibody as canalicular marker. Nuclear staining was performed with TOPRO-3 dye (blue). NTPDase8 (green) co-localizes with Mrp-2 (red; Merged). Insert shows 4.5x magnification of canalicular co-localization of NTPDase8 and Mrp-2. *Scale bar 40 μ m.*

Lower panels: Ectonucleotidase activity was located after incubation (1h) with various nucleotides (1 mM) as substrates. In all assays, tissue sections were incubated with tetramisole (5 mM) to block alkaline phosphatase activity. A portal tract area is shown for ATP and ADP (lower panels, 1st and 3rd to left) and a central vein for ATP (lower panels, 2nd to left). ATPase and ADPase activities are mainly detected at the bile canaliculi level and in large blood vessels. Hydrolysis of ATP is also detected in periductular regions, in the hepatic triad, but not in cholangiocytes. The control assay without any nucleotide (no nuc.) showed no reaction. Portal artery (A), portal vein (V), duct (D), bile canaliculus (BC), central vein (CV). *Scale bar 20 μ m.*

Figure A3: Purification of NTPDase8 from rat liver.

The purification procedure was performed as detailed in "Materials and methods".

Figure A3: Purification of NTPDase8 from rat liver.



The purification procedure was performed as detailed in "Materials and methods".

Figure A3: Purification of NTPDase8 from rat liver.

A) DEAE column: Liver membrane proteins were solubilized with Triton X-100, loaded on a DEAE column and eluted by a NaCl gradient from fractions 1 to 281. Three peaks of ATPase activity are distinguishable and the third and most important peak of activity corresponds to NTPDase8 (N8), as determined by immunoblotting (data not shown). A significant AMPase activity was also associated with the peaks corresponding to NTPDase2 (N2) and NTPDase8. Fractions containing NTPDase8 activity (pooled fractions) were collected and applied to an Affigel Blue column. Note that we chose to avoid NTPDase1 activity in the selected pooled fractions.

B) Affigel Blue column: After washing the column and eluting the bound proteins, one peak of ATPase activity corresponding to NTPDase8 as determined by immunoblotting (data not shown), was collected (pooled fractions), and used for further purification on a ConA column. Note that we chose to avoid most AMPase activity in the selected pooled fractions.

C) Protein samples from the pooled fractions of each purification step were monitored for NTPDase8 content by SDS-PAGE and immunoblotting. NTPDase8 levels increase with each purification step: N8, NTPDase8 transfected COS-7 cell lysate (4 μg); lane 1, total liver homogenate (5 μg); lane 2, liver particulate fraction (5 μg); lane 3, DEAE chromatography pooled fractions (5 μg = 220 pmolsPi/min); lane 4, Affigel Blue chromatography pooled fractions (5 μg = 435 pmolsPi/min); lane 5, ConA chromatography pooled fractions (5 μg = 2270 pmolsPi/min). Molecular weights are indicated in kDa.

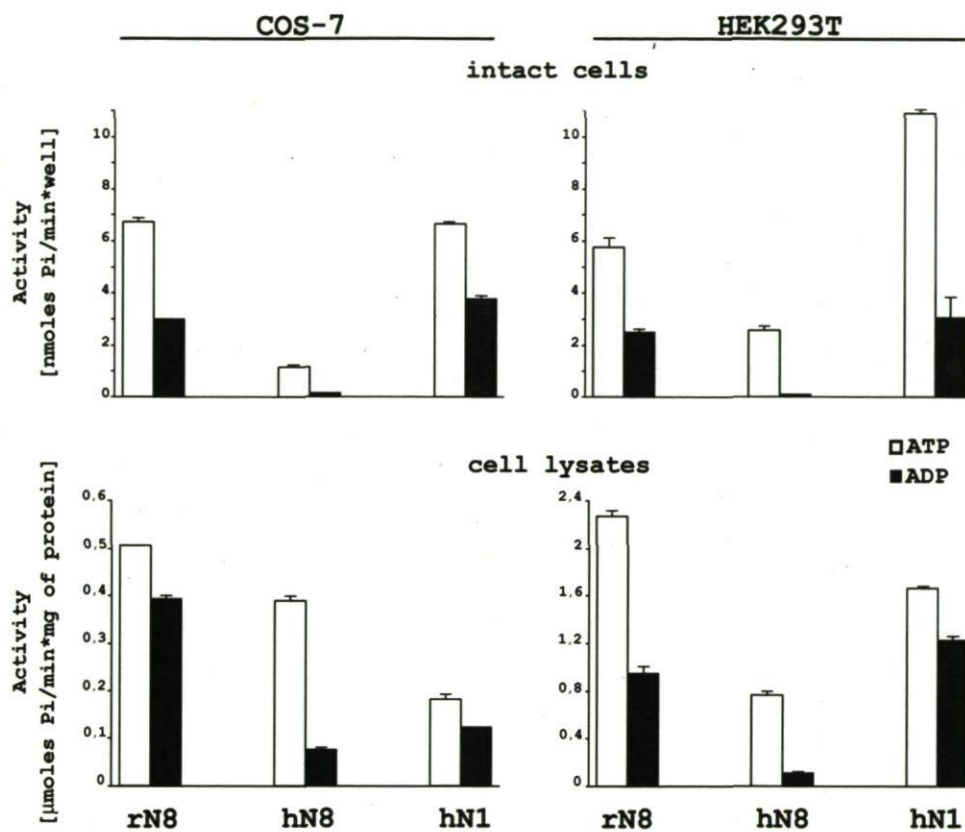
Figure A4: Catalytic properties of human and rat NTPDase8s, effect of inhibitors.**A**

Figure A4: Catalytic properties of human and rat NTPDase8s, effect of inhibitors.

B

recombinant:	+	+	+	+	+	+	+	-	-
purified:	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Triton X-100:	-	-	-	-	-	-	+	+	+

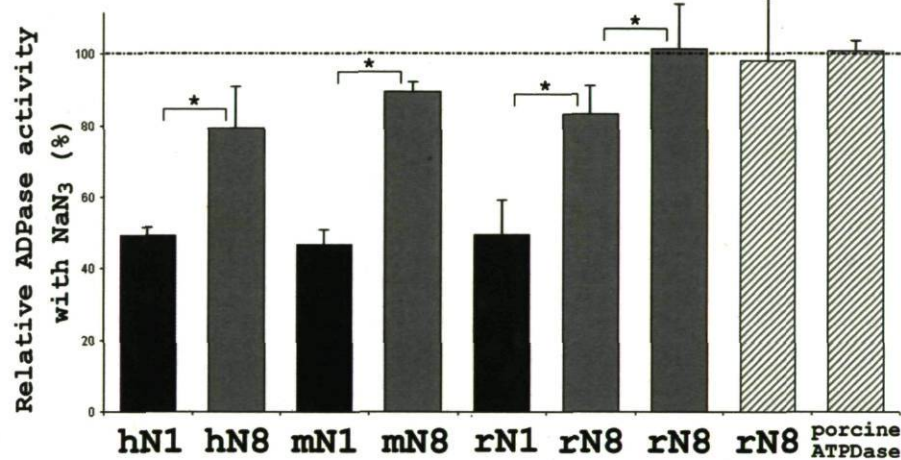


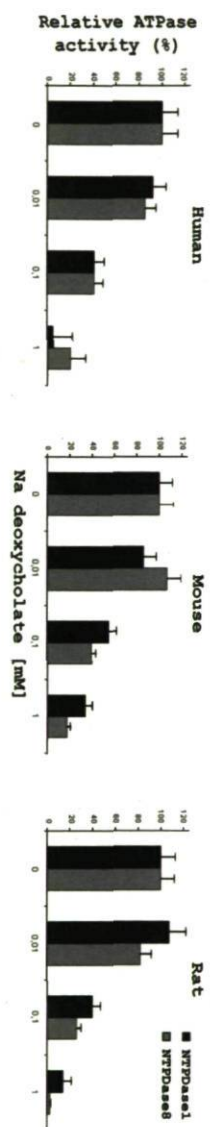
Figure A4: Catalytic properties of human and rat NTPDase8s, effect of inhibitors.**C**

Figure A4: Catalytic properties of human and rat NTPDase8s, effect of inhibitors.

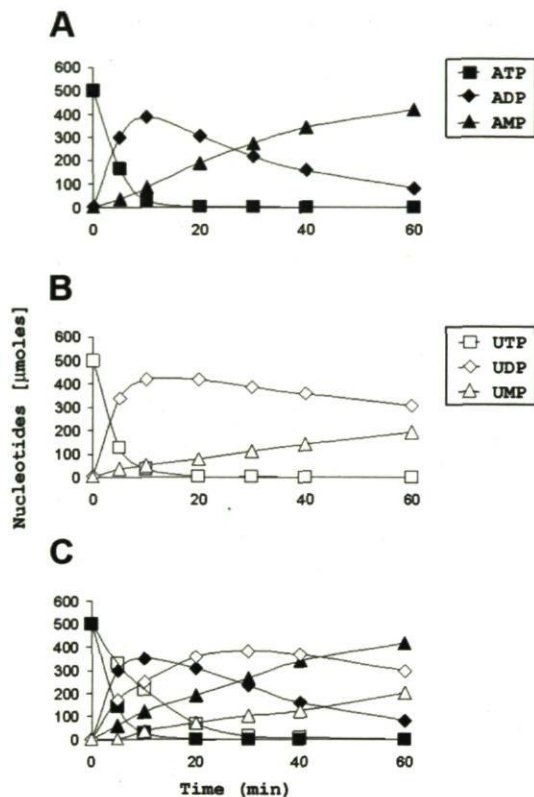
ATPase and ADPase activities were measured in COS-7 and 293T intact cells and cell lysates using the malachite green method, as described in "Materials and methods". Residual activity from untransfected cells, that varied from 3 to 13% of the activity detected in transfected cells, was subtracted.

A) Activities with ATP (open bars) and ADP (filled bars) as substrates were measured on intact COS-7 and HEK293T cells transfected with recombinant human NTPDase1 (hN1) or human and rat NTPDase8 (hN8, rN8), or using the indicated cell lysates. Overall, NTPDase8 transfected cells or lysates showed both ATPase and ADPase activities. The activity measured for each cell lysate was higher in transfected 293T cells compared to transfected COS-7 cells. Data show the mean values \pm standard deviation of three independent experiments, each performed in triplicate.

B) The effect of 10 mM sodium azide on the activity of recombinant human, mouse and rat NTPDase1s (black), NTPDase8s (gray) or purified NTPDase8s (dashed gray) from rat and porcine hepatic ATPDase was tested. ADP was used as substrate for the hydrolysis assay. While azide only slightly inhibited recombinant NTPDase8 activities, it blocked NTPDase1 activities by approximately 50%. Solubilized NTPDase8s were totally resistant to azide. Data show the mean values \pm standard deviation of one (porcine hepatic ATPDase) or three independent experiments (other enzymes), each performed in triplicate. A star (*) indicates significant differences as evaluated by Student T-test analysis (P values < 0.01).

C) The effect of sodium deoxycholate (0.01-1 mM) on the activity of recombinant human, mouse and rat NTPDase1s (black) or NTPDase8s (gray) was tested. ATP was used as substrate for this hydrolysis assay. Although some differences could be detected, there are no significant variations between NTPDase1 and NTPDase8 inhibition by deoxycholate. Data show the mean values \pm standard deviation of at least two independent experiments, each performed in triplicate.

Figure A5: Nucleotide hydrolysis and product formation by human recombinant NTPDase8.



The nucleotide hydrolysis pattern was determined by HPLC, as described in “Materials and methods”. Human NTPDase8 was incubated with ATP and/or UTP (500 μM) and the formation of nucleotide derivatives followed over a period of 1 hour. In A and B, 24 nmol/min of enzymatic activity were used. This amount was doubled in Panel C.

A) ATP hydrolysis: ATP (■), ADP (◆), AMP (▲). Human NTPDase8 dephosphorylates ATP into ADP, which is then hydrolyzed into AMP. No adenosine production was detected.

B) UTP hydrolysis: UTP (□), UDP (◇), UMP (Δ). The profile of UTP hydrolysis (UTP → UDP → UMP) is similar to the one observed for ATP with the difference that the conversion of UDP to UMP is slower than that of ADP to AMP. No uridine production was detected.

C) Simultaneous hydrolysis of ATP and UTP: ATP (■), ADP (◆), AMP (▲), UTP (□), UDP (◇), UMP (Δ). NTPDase8 prefers adenine nucleotides over uracil nucleotides as substrates. Notice that AMP accumulates more rapidly than UMP.

Chapitre 3 : Modulation de la signalisation purinergique par les NTPDases et l'ecto-5'-nucléotidase dans le foie

Co-expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 with different NTPDases regulates distinctly adenosine formation in the liver

Michel Fausther¹, Joanna Lecka¹, Elwy Soliman², Julie Pelletier¹, Gilles Kauffenstein¹, Jonathan A. Dranoff² and Jean Sévigny^{1§}

¹Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada.

²Section of Digestive Diseases, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA.

Running head: Fine regulation of adenosine formation by liver ectonucleotidases

Contact information: [§]Address correspondence to Jean Sévigny, Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, 2705 Boulevard Laurier, local T1-49, G1V 4G2 Québec, QC, Canada.

email:jean.sevigny@crchul.ulaval.ca; phone number: 1-418-654-2772; fax number: 1-418-654-2765

List of abbreviations: α -SMA, alpha smooth muscle actin; ADPase, adenosine diphosphatase; AMPase, adenosine monophosphatase; ATPase, adenosine triphosphatase; E-NTPDase, ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; kDa, kiloDaltons; HRP, horseradish peroxidase; E-NPP, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PECAM-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule-1; TNAP, tissue non-specific alkaline phosphatase

Résumé

Plusieurs fonctions hépatiques sont modulées par les nucléo(s/t)ides extracellulaires suite à l'activation de récepteurs P1 et P2 spécifiques. Pour réguler les voies de signalisation activée par les nucléotides extracellulaires, les cellules hépatiques expriment à leur surface diverses enzymes, ou ectonucléotidases, incluant la NTPDase1/CD39, NTPDase2/CD39L1, NTPDase8 et l'ecto-5'-nucléotidase/CD73. Les NTPDases hydrolysent les nucléosides tri- et diphosphate (ex : ATP et ADP) en nucléosides monophosphate (ex : AMP) qui sont ensuite convertis en nucléosides par l'ecto-5'-nucléotidase/CD73. Le but de cette étude était de caractériser l'impact de la distribution cellulaire des ectonucléotidases hépatiques sur les niveaux d'agonistes des récepteurs P1 et P2 présents dans le milieu environnant. L'activité ectonucléotidase a été détectée par histochimie enzymatique avec les nucléotides suivants comme substrats, ATP, UTP, ADP, UDP, AMP, UMP, CMP, GMP et IMP. Les NTPDase1, 2 et 8, et CD73 ont été localisées par immunofluorescence. Les essais d'activité ectonucléotidasique à forte (500 μ M) et basse (1 μ M) concentrations ont été réalisés avec des échantillons protéiques provenant de lysats de cellules COS-7 transfectées avec des plasmides codant pour les enzymes recombinantes de rat. Des aliquots de la réaction enzymatique ont été prélevés à différents temps et analysés par HPLC en phase inverse. CD73 est exprimée par des cellules fibroblastiques localisées d'une part sous les cellules endothéliales et les cellulaires musculaires lisses exprimant toutes les deux la NTPDase1, et d'autre part présent dans le tissu conjonctif de l'espace porte hépatique avec les fibroblastes portaux exprimant la NTPDase2. De plus, CD73 est co-exprimée avec la NTPDase8 au niveau du domaine membranaire canaliculaire des hépatocytes. En présence de NTPDase1 et CD73, l'ATP est rapidement hydrolysé en adénosine, alors que la combinaison NTPDase2 et CD73 en produit très peu. En présence de NTPDase8 et CD73, l'ATP est déphosphorylée successivement en ADP puis en AMP, retardant la formation de l'adénosine. L'expression de CD73 avec les NTPDases hépatiques dans des compartiments cellulaires spécifiques du foie pourrait entraîner une activation différente des récepteurs P1 et P2, et ainsi réguler l'homéostasie cellulaire en conditions physiologiques et pathologiques.

Abstract

Extracellular nucleos/tides modulate various liver functions upon activation of specific P1 and P2 receptors. To regulate extracellular nucleotide signalling, liver cells express various surface-located ectonucleotidases including NTPDase1/CD39, NTPDase2/CD39L1, NTPDase8 and ecto-5'-nucleotidase/CD73. NTPDases hydrolyze tri- and diphosphonucleosides (eg: ATP and ADP) to monophosphonucleosides (eg: AMP) that are converted into nucleosides (eg: adenosine) by ecto-5'-nucleotidase/CD73. The purpose of this study was to characterize the impact of the cellular distribution of these hepatic ectonucleotidases on the levels of neighbouring P1 and P2 receptor agonists. Histochemical detection of ectonucleotidase activities was performed with various nucleotides as substrates, ATP, UTP, ADP, UDP, AMP, UMP, CMP, GMP and IMP. The localization of NTPDase1, 2, 8 and CD73 was performed by immunofluorescence microscopy. Ectonucleotidase activity assays were performed with recombinant rat enzymes from transfected COS-7 cell lysates at high ATP (500 μ M), a concentration allowing the enzyme activity to be near V_{max} values and mimicking inflammatory conditions, and low ATP (1 μ M), a more physiological concentration. Aliquots of enzymatic reaction were collected at different time points and analyzed by reverse phase HPLC. CD73 is expressed by a novel fibroblastic cell type located underneath both vascular endothelial cells and smooth muscle cells expressing NTPDase1 and in the connective tissue of portal/peri-portal space with NTPDase2-positive portal fibroblasts. In addition, CD73 is also co-expressed with NTPDase8 in the canalicular membrane domain of hepatocytes. In presence of NTPDase1 and CD73, ATP was rapidly converted to adenosine, while the NTPDase2 and CD73 combination hardly produced this nucleoside. In presence of both NTPDase8 and CD73, ATP was sequentially dephosphorylated to ADP, then to AMP, resulting in a delayed adenosine formation. The precise cellular localisation of CD73 with distinct NTPDases in specific liver cell compartments may lead to differential activation of P1 and P2 receptors and therefore regulate of the related and pathophysiological conditions.

Keywords: NTPDase, ecto-5'-nucleotidase/CD73, P1/P2 receptors, ATP, adenosine, liver

Introduction

By activating specific transmembrane P1 and P2 receptors, extracellular nucleos/tides modulate various physiological functions in almost all tissues, including blood vessels, heart, lungs, brain, muscles etc. [41]. In the liver, they regulate key cellular pathways like glucose metabolism, cell cycle progression, cell volume autoregulation and ionic secretion [95]. To regulate extracellular nucleos/tide signalling and maintain tissue homeostasis, liver cells express various ectonucleotidases at their surface, including members of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family, of the ecto-nucleotide pyrophosphatase-phosphodiesterase (E-NPP) family, of the alkaline phosphatase (AP) multigene family as well as ecto-5'-nucleotidase/CD73 [49, 95]. These ectoenzymes act in concert, to sequentially dephosphorylate extracellular nucleotides and closely regulate their levels in the hepatic extracellular fluids.

In physiological conditions (i.e. at neutral pH), plasma membrane-bound NTPDases, namely NTPDase1/CD39, NTPDase2/CD39L1 and NTPDase8, represent the dominant liver ectonucleotidases [1, 197]. NTPDases hydrolyze various tri- and diphosphate nucleosides (e.g. ATP and ADP) with distinct affinity and ability. Rat NTPDase1 hydrolyses ATP and ADP equally well, NTPDase2 preferentially breaks down ATP over ADP, and NTPDase8 acts as a functional intermediate between NTPDase1 and NTPDase2 [107, 235]. In the liver, NTPDases are expressed in a cell-specific manner: NTPDase1 is expressed by vascular endothelial cells [1, 197] and smooth muscle cells, NTPDase2 by cells in the vascular external layer and portal fibroblasts [116, 124] while NTPDase8 is restricted to the canalicular membrane domain of hepatocytes [1]. The monophosphonucleosides (e.g. AMP), generated by NTPDases enzymatic activity, are finally converted into the corresponding nucleosides (e.g. adenosine) by ecto-5'-nucleotidase [164, 170, 172]. Interestingly, the NTPDases substrates ATP and especially ADP are natural inhibitors of ecto-5'-nucleotidase monophosphatase activity [236]. In the liver, the ecto-5'-nucleotidase protein expression has been associated with the canalicular domain of hepatocyte plasma membrane and undefined cellular elements of the portal space [237, 238].

Due to their complementary biochemical properties, NTPDases and ecto-5'-nucleotidase represent central elements of liver purinergic signalling. However, the potential influence of the coordinated action of NTPDases and ecto-5'-nucleotidase on local hepatic purinergic signalling has yet to be established. In the present study, we characterize the impact of the cellular distribution of these hepatic ectonucleotidases on the levels of neighbouring P1 and P2 receptor agonists. We show that ecto-5'-nucleotidase is co-expressed with NTPDase 1, 2 and 8 in distinct liver compartments and that these specific combinations of ecto-5'-nucleotidase with each hepatic NTPDase have the ability to regulate distinctly the signalling pathways via extracellular nucleosides in the liver.

Materials and Methods

Materials

Culture cell media were obtained from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Adenosine 5'-(α,β -methylene)diphosphate, 2-chloroacetaldehyde, 3, 3'-diaminobenzidine (DAB), 1,4-diaza-bicyclo [2.2.2]octane (DABCO), nucleotides, levamisole, tetrabutylammonium hydrogen sulphate (TBA) were provided by Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dye was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR) and hematoxylin from Biomeda Corporation (Foster City, CA). Mouse monoclonal antibody to rat CD31/PECAM-1 (clone TLD-3A12) was purchased from BD Pharmingen (Mississauga, ON, Canada), to rat CD68 (clone ED-1) from Serotec AbD (Raleigh, NC), and those to mouse/rat alpha-smooth muscle actin (clone 1A4) and to rat vimentin (clone V9) from Sigma-Aldrich.

Animals and antibody production

Sprague-Dawley rats, Hartley guinea pigs and New Zealand rabbits were obtained from Charles River Laboratories (Québec, QC, Canada). Genetic immunization protocol was carried out by the direct injection of a plasmid encoding rat ecto-5'-nucleotidase/CD73 [239], as before for other proteins of interest [1], in Hartley guinea pigs and New Zealand rabbits. All procedures were approved by the Canadian Council on Animal Care and the *Université Laval* Animal Welfare Committee.

Plasmids

The plasmids encoding rat NTPDase1 (NM_022587) [235], NTPDase2 (NM_172030) [103], NTPDase8 (AY536920) [1], and ecto-5'-nucleotidase/CD73 (NM_021576) [239] have all been described in published reports and were used for cell transfection and for antisera generation.

Cell transfection and ectonucleotidase activity assays

Transfection of COS-7 cells using plasmids encoding either recombinant NTPDase1, 2, 8 or ecto-5'-nucleotidase and preparation of cell lysates were carried out as previously described [107].

For the assays with high ATP concentration (500 μ M), cell lysates were added to obtain an activity of 24 nmol of Pi per min with ATP as substrate for each NTPDase and AMP for ecto-5'-nucleotidase, as determined by the Malachite Green procedure according to Baykov *et al.* [129, 210]. The enzymatic reactions were performed at 37°C for 150 minutes in a Ringer buffer: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl, 2.5 MgCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM dextrose, 80 mM Tris-HCl, pH 7.4, and the products of ATP hydrolysis were determined by reverse phase HPLC, as previously described [107].

For the assay with low ATP concentration (1 μ M), ectonucleotidase cell lysates with an ATPase activity (for NTPDase) and AMPase activity (for ecto-5'-nucleotidase) able to convert 40% of substrate in 5 minutes, as determined by HPLC, were used. The enzymatic reactions were performed at 37°C for 30 minutes in a modified Krebs buffer: 114 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.16 mM MgSO₄, 20 mM HEPES, 2.5 mM CaCl₂, 2.5 MgCl₂, 25.5 mM NaHCO₃, pH 7.4 and the products of ATP hydrolysis were determined by reverse phase HPLC after transformation to fluorescent etheno(ϵ)-derivatives, according to a modified derivatization protocol by Levitt *et al.* [240, 241]. This additional step decreases by about 100 fold the detection limit of adenylated species concentrations, when using a fluorescent detector. The modified Krebs buffer is more suitable than the Ringer buffer for the etheno-derivatization method employed here since it does not produce autofluorescence, nor does influence the kinetics of ATP hydrolysis at high substrate concentration (data not shown). Briefly, 150 μ l-aliquots of reaction mixture were collected at different time points and transferred to an equal volume of ice-cold 5% (v/v) trichloroacetic acid (TCA) for deproteinization. The samples were centrifuged for 3 min at 10,000 \times g at 4°C and the supernatants were subjected to lipids extraction with diethyl ether (3:1, v/v; 5 times), before transformation to etheno(ϵ)-derivatives. In a representative derivatization assay, 200 μ l-aliquots of the extracted samples were incubated for 60 min at 70°C in the presence of 1 M ClCH₂CHO and 25 mM Na₂HPO₄ (pH 4.0) in a

final volume of 250 μ l. The resulting fluorescent 1, N6-etheno-adenine derivatives (ϵ -ATP, ϵ -ADP, ϵ -AMP and ϵ -Adenosine) were separated by reverse phase HPLC, as previously described [107], where the mobile phase was replaced with the following one: 25 mM TBA, 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7.0 and 10% methanol (v/v). All experiments were performed in triplicate, with controls where the cell lysates were added after the reaction had been stopped. Identification and quantification of etheno-adenylated derivatives were performed with an automated Waters[®] and Beckman[®] HPLC apparatus equipped with a Shimadzu[®] RF-10Ax1 fluorescence detector.

Flow cytometry and isolation of rat liver cell populations

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was carried out on isolated hepatocytes, hepatic stellate cells (from Dr. Rebecca Wells), portal fibroblasts and non-parenchymal cell (NPC) preparations from fresh rat liver tissue, as previously described [124, 198].

Immunoblotting

Protein preparation, SDS-PAGE fractionation and electroblotting were performed as previously described [1]. Following incubation with primary antibodies, proteins of interest were visualized with the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit IgG, Amersham Biosciences, Boston, MA; anti-guinea pig IgG, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA) and the Chemiluminescent Reagent Plus (Perkin-Elmer, Boston, MA), upon manufacturer's recommendations.

Immunofluorescence, immunocytochemistry and enzyme histochemistry

COS-7 cells (10^5 /coverslip) or 6 μ m sections of snap-frozen rat liver specimens were fixed with cold acetone mixed with 10% (v/v) phosphate-buffered formalin. For immunofluorescence, fixed sections were incubated with the following polyclonal antibodies to rat enzymes: to NTPDase1 (rN1-6_L) [1], to NTPDase2 (BZ3-4F) [124], to NTPDase8 (rN8-8_C) [1] and to CD73 (either r5'NT-4_C or r5'NT-9_L). Then, the appropriate

AlexaFluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) were applied, as previously described [1]. In one set of double immunostaining experiments, rabbit rN1-6_L and BZ3-4F antibodies were each used in combination with the guinea pig r5'NT-4_C serum, and the guinea pig rN8-8_C antibody with the rabbit r5'NT-9_L serum. In the other set of experiments, mouse monoclonal antibodies to rat CD31/PECAM-1 (clone TLD-3A12), rat alpha-smooth muscle actin (clone 1A4) and rat vimentin (clone V9) were each used in combination with the rabbit r5'NT-9_L serum. For immunocytochemistry, fixed cells were incubated with the polyclonal antibodies r5'NT-4_C and r5'NT-9_L and appropriate biotinylated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA), before addition of Vectastain Elite ABC reagent (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada). All antibodies were used at a 1:1000 working dilution, except for r5'NT-9_L that was used at a final concentration of 1:2000. Endogenous peroxidase was quenched by incubating the fixed cells with 0.15% (v/v) H₂O₂ diluted in phosphate-buffered saline solution (PBS). Endogenous avidin and biotin were blocked, using the Avidin/Biotin blocking kit (Vector Laboratories). The peroxidase reaction was performed with the following substrate solution: 0.4 mg DAB/ml, 0.03% (v/v) H₂O₂ in PBS and stopped with excess water washing. Control experiments (not shown) were performed using serum samples collected prior to the first immunization (pre-immune).

For enzyme histochemistry, ectonucleotidase activities were localized using the lead phosphate method according to Wachstein/Meisel [1]. The enzymatic reaction was carried out by incubating liver sections with various nucleotides (200 μM) as substrates for 1 hour. All experiments were performed in presence of the tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) inhibitor levamisole (5 mM). In a set of experiments, αβ-methylene-ADP (1 mM) was used as an inhibitor of ecto-5'-nucleotidase. Control assays (not shown) were performed in absence of nucleotide and devoid of precipitate.

Nuclei were counterstained with DAPI (Molecular Probes) or aqueous hematoxylin (Biomedica Corp.). All labelled sections were mounted in Mowiol 4-88® medium, with or without anti-fade reagent DABCO.

Results

While the hepatic expression of NTPDase1, 2 and 8 has previously been reported [1, 124, 197], the cellular localisation of ecto-5'-nucleotidase/CD73 remained incomplete. Here, we first looked at the distribution of ecto-5'-nucleotidase in relation to these NTPDases in rat liver, using enzyme histochemical and immunohistochemical methods.

Histochemical detection of ectonucleotidase activities: All enzyme histochemistry assays were performed in presence of the TNAP inhibitor levamisole (5 mM), to exclude any contribution of this enzyme in the catalytic activities observed for each nucleotide. In our experimental conditions, no significant differences were observed in terms of ectonucleotidase activities, in presence or absence of levamisole in reaction medium (data not shown). In the rat liver, enzyme histochemical assays with ATP as substrate revealed a prominent staining activity at the level of vascular endothelium and sub-endothelium, in the connective tissue in the portal/peri-portal space areas and surrounding central veins, and in the bile canaliculi (Fig. B1-ATP). No nucleotide hydrolysis was detected at the level of ductular epithelium. The hepatic ADPase activity displayed a distribution pattern similar to that observed for the ATPase activity, but with a slightly weaker staining intensity (Fig. B1-ADP). When AMP was applied as substrate, catalytic activity products were mainly detected in the sub-endothelium, in the connective tissue associated with the peri-vascular and peri-ductular areas, and in the bile canaliculi. Note that both ductular epithelium and vascular endothelium were devoid of AMPase activity (Fig. B1-AMP). The absence of AMPase activity at the endothelium level was observed in all blood vessels, regardless of the type or caliber. When the specific inhibitor $\alpha\beta$ -methylene-ADP (1 mM) was used to block ecto-5'-nucleotidase activity, the overall AMP hydrolysis was significantly reduced, suggesting that this enzyme contributes to most, if not all rat liver AMPase activity, at physiological pH (Fig. B2). In agreement, enzyme histochemical assays performed with other ecto-5'-nucleotidase substrates namely, CMP, GMP and IMP showed similar patterns of activity (not shown).

Generation of polyclonal antibodies to rat ecto-5'-nucleotidase/CD73 and specificity: To determine the cellular distribution of ecto-5'-nucleotidase and NTPDases in the liver, we

used a panel of polyclonal antibodies developed in our laboratory. The specificity of polyclonal sera to NTPDase1 (rN1-6_L), to NTPDase2 (BZ3-4F) and to NTPDase8 (rN8-8_C) has been previously demonstrated [1, 124]. Guinea pig and rabbit polyclonal antibodies directed against rat ecto-5'-nucleotidase have been generated and their specificity tested by the following immunological techniques. By immunocytochemistry, a positive dark brown staining could be seen only with ecto-5'-nucleotidase-transfected COS-7 cells incubated in presence of either the guinea pig serum r5'NT-4_C or the rabbit serum r5'NT-9_L, respectively (Fig. B3A,B-serum). The same antibodies detected a strong protein band with a molecular weight of about 66 kDa by immunoblot in the lane corresponding to the cell lysates from ecto-5'-nucleotidase-transfected cells. No proteins could be detected in the lanes with cell lysates from nontransfected cells, confirming the specificity of both antibodies (Fig. B3A, B-immunoblot). Furthermore, both r5'NT-4_C and r5'NT-9_L antibodies displayed similar distribution patterns for hepatic ecto-5'-nucleotidase, as determined by immunohistochemistry and immunofluorescence (see below and not shown).

Immunolocalization of NTPDases and ecto-5'-nucleotidase: Immunofluorescence labelling in the rat liver with the polyclonal antibody rN1-6_L showed prominent staining for NTPDase1 at the level of the vascular endothelium and smooth muscle cells as well as in liver resident macrophages, namely Kupffer cells (positive for CD68 marker, not shown) (Fig. B4A). As seen with the serum BZ3-4F, NTPDase2 was detected in the sub-endothelial basement membrane cells, in portal fibroblasts (PFs) and in peri-ductular "bundle-shaped" structures, in the connective tissue of portal space area, possibly nerves processes (Fig. B4B). Staining with the polyclonal antibody rN8-8_C showed that NTPDase8 expression was restricted to bile canaliculi (Fig. B4C). Both r5'NT-4_C and r5'NT-9_L polyclonal sera revealed a strong expression of ecto-5'-nucleotidase in the connective tissue associated with the peri-vascular and peri-ductular areas, and in bile canaliculi with a faint immunostaining at the level of basal membrane of hepatocytes (Fig. B4-ECTO-5'NT). Double immunofluorescence staining showed that although, ecto-5'-nucleotidase did not strictly co-localize with NTPDase1, both proteins were located in the same structures in nearby cells, such as NTPDase1-positive Kupffer cells present in the peri-vascular and/or peri-ductular connective tissue areas, and the basolateral surface of the endothelial cell

layer that makes contact with the peri-vascular extracellular matrix (Fig. B4A, Merged). Ecto-5'-nucleotidase did not co-localize with NTPDase2 either. Again, both enzymes were expressed in the same vicinity, in the peri-vascular and peri-ductular connective tissue areas (Fig. B4B, Merged). In contrast, NTPDase8 and ecto-5'-nucleotidase co-localized in bile canaliculi (Fig. B4C, Merged).

We further investigated the expression of ecto-5'-nucleotidase in the rat liver, using markers: the cell adhesion molecule PECAM-1 for the vascular endothelium, the cytoskeletal proteins alpha-smooth muscle actin (α -SMA) expressed by smooth muscle cells and myofibroblasts, and vimentin for the main liver fibroblastic cell population. The ecto-5'-nucleotidase labelling was clearly distinct from those of PECAM-1 and α -SMA, but was overlapping partially with vimentin staining in the peri-vascular and peri-ductular areas (Fig. B5-Merged, all panels). We further confirmed the expression of ecto-5'-nucleotidase in primary liver cell preparations by FACS analysis. Our data demonstrated that it is produced by NTPDase8-positive hepatocytes and a non-parenchymal cell type, distinct from hepatic stellate cells and NTPDase2-positive PFs (Fig. B6).

Taken together, the histochemical localization of ATPase and ADPase activities correlated with the combined expression of NTPDase1, 2 and 8, as detected by immunohistochemistry while the AMPase activity corresponded with the immunohistological expression pattern of ecto-5'-nucleotidase. In addition, our results suggest that ecto-5'-nucleotidase is expressed by a liver fibroblastic population devoid of NTPDase activity.

HPLC analysis of ATP hydrolysis by ecto-5'-nucleotidase in combination with different hepatic NTPDases: Based on the above localization results of NTPDases and ecto-5'-nucleotidase activities and proteins, we evaluated how the biochemical activity resulting from the combination of ecto-5'-nucleotidase with each NTPDase1, NTPDase2 or NTPDase8 could impact the generation of nucleotides and nucleosides species in the liver. As described in the “*Experimental procedures*” section, ATP hydrolysis assays were performed at high (500 μ M) substrate concentration that may occur in specific conditions, e.g. inflammation or hepatic failure, and that also allow the enzymes to work at V_{\max} and low (1 μ M) substrate concentration, a nucleotide level in the physiological range. Aliquots

of the reaction mixtures were collected at different time points and the nucleotide and nucleoside contents evaluated by HPLC. The time course of ATP hydrolysis and the time-dependent generation of adenosine were analysed for the combinations of rat ectonucleotidases, observed above for each liver structure.

- **High ATP concentration (500 μ M).** For a comparison of the hydrolysis by the different combinations, we fixed the ATPase (NTPDase) and AMPase (ecto-5'-nucleotidase) at 24 nmol of Pi released per min, for each ectonucleotidase. In presence of NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase, ATP was hydrolyzed rapidly to adenosine with transient increases of ADP and AMP concentrations (Fig. B7, NTPDase1 & CD73, high). The adenosine formation by ecto-5'-nucleotidase appeared to be slower than the AMP disappearance during the first hour, likely because the inhibitory nucleotides ATP and ADP are still present in the medium at this time. When both ATP and ADP concentrations decreased, the adenosine formation increased until the complete conversion of AMP to adenosine. When ATP was incubated with NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase, it was converted fairly into ADP and very poorly into AMP, as ADP is a poor substrate of NTPDase2 (Fig. B7). Because of the prolonged accumulation of ADP in the assay medium as well as the low abundance of CD73 substrate, the appearance of adenosine was limited. It is worthy to note that under the described conditions, rat NTPDase2 was active only for 50-60 minutes. The ATP hydrolysis profile by NTPDase8 and ecto-5'-nucleotidase combination showed a rapid accumulation of ADP, peaking after 20 minutes, which was followed by the delayed generation of AMP that reached a plateau between 50 and 120 minutes (Fig. B7). These observations can be explained by the fact that NTPDase8 ATPase activity is greater than its ADPase activity. As a result, the ecto-5'-nucleotidase activity was transiently inhibited by the presence of ADP which delayed the formation of adenosine, when compared to the hydrolysis profile obtained with the NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase combination.

- **Low ATP concentration (1 μ M).** In the presence of NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase combination, ATP was directly converted to AMP, ADP being processed as soon as it was formed (Fig. B7, NTPDase1 & CD73, low). Consequently, the adenosine formation by ecto-5'-nucleotidase almost paralleled the AMP appearance in the reaction mixture. After

about 20 minutes, about 80% of total ATP was hydrolyzed to adenosine. The ADP generated upon ATP hydrolysis by NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase combination accumulated in the reaction medium allowing little AMP production and therefore low level of adenosine formation (Fig. B7). The hydrolysis pattern of ATP by NTPDase8 and ecto-5'-nucleotidase was very similar to the latter combination. It resulted in a continuous accumulation of ADP (Fig. B7) and a slow production of AMP that did allow neither a fast nor an important formation of adenosine. At this ATP concentration, the level of ADP appeared insufficient to inhibit the ecto-5'-nucleotidase activity as it was observed for the high ATP concentration assay seen in Figure 7 (NTPDase8 & CD73, high).

Discussion

In the present study, we show a clear correlation between liver ecto-5'-nucleotidase/CD73 protein expression and nucleoside monophosphatase activity. They were both detected in the canalicular and sinusoidal membrane domains of hepatocytes as well as in the connective tissue surrounding central veins or associated with the portal and larger septal space areas, in rat species. Notably, ecto-5'-nucleotidase protein expression and AMPase activity were absent from the cell surface of hepatic vascular endothelium and bile duct epithelium. Our examination of ecto-5'-nucleotidase distribution by double fluorescence immunostaining using cell markers (CD31/PECAM-1, alpha smooth muscle actin and vimentin) as well as flow cytometry analysis of primary liver cells further indicated that ecto-5'-nucleotidase is mainly expressed by hepatocytes and non-myofibroblastic (non-parenchymal) liver cells, distinct from portal fibroblasts and hepatic stellate cells. When the distribution of ecto-5'-nucleotidase was compared to the ones of (previously described) hepatic NTPDase1, 2 and 8 with respect to the same parameters *i.e.* protein expression and ectonucleotidase (ATPase and ADPase) activity [1, 124], specific combinations of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase expression patterns were found: A) NTPDase1 (vascular endothelium, smooth muscle cells and Kupffer cells) and ecto-5'-nucleotidase, while not intrinsically expressed by the same cells, were collectively found at the junction between the vascular *tunica media* and the perivascular connective tissue or at the level of the sinusoidal face of hepatocyte membrane; B) NTPDase2 (portal fibroblasts) and ecto-5'-nucleotidase were also expressed by neighbouring cells, here located within the portal/periportal connective tissue; and finally C) NTPDase8 and ecto-5'-nucleotidase were co-expressed by hepatocytes, in bile canaliculi.

We next addressed the potential impact of this specific distribution of NTPDases and ecto-5'-nucleotidase on the levels of the extracellular nucleotides by performing a biochemical ATP hydrolysis assay in presence of each combination of ecto-5'-nucleotidase with NTPDase1, 2 or 8. The results showed that at low substrate concentration, the enzymatic activity of NTPDase1/ecto-5'-nucleotidase combination generated adenosine directly from ATP, while both NTPDase2/ecto-5'-nucleotidase or NTPDase8/ecto-5'-nucleotidase combinations produced significant ADP levels and could hardly generate adenosine. At

high substrate concentration, adenosine is mainly the final product of ATP hydrolysis in presence of NTPDase1/ecto-5'-nucleotidase. The NTPDase8/ecto-5'-nucleotidase combination also generated adenosine, however with a transient ADP appearance more pronounced and longer lasting than the one observed with NTPDase1 isoenzyme. In contrast, both ATP and ADP were still available in presence of NTPDase2/ecto-5'-nucleotidase, with little adenosine production.

What could be the functional importance of such NTPDases and ecto-5'-nucleotidase distribution in the liver? At physiological pH, hepatic NTPDase1, 2 and 8 enzymatic activities account for the major bulk of the liver ectonucleotidase activity, degrading the tri- and diphosphate nucleosides into their monophosphate counterparts which are essential for the activity of ecto-5'-nucleotidase, the rate-limiting ectoenzyme in adenosine formation [49]. Thus, the biochemical data presented here, demonstrate that the particular expression pattern of ectonucleotidases in the liver could be of physiological relevance, by regulating distinctly the purinergic signalling. Indeed, each combination of hepatic NTPDases and ecto-5'-nucleotidase/CD73 complementary activities would lead to different signal transduction pathways, depending on the availability of extracellular purinergic mediators but also the identity of P1 and P2 receptors expressed at the cell membrane, in a given cellular compartment or tissular microenvironment. In our assay, we used two different ATP concentrations, a low micromolar (1 μ M) substrate condition, similar to the reported physiological levels of circulating nucleosides, ranging from 50 to 1000 nanomolars in both sinusoidal blood and bile flows [19], and a high micromolar (0.5 mM) substrate condition, using a value closer to the nucleotide levels that can be conceivably reached in the extracellular medium during the development of inflammatory liver diseases [42]. Our results show that the substrate concentration used can influence the combined biochemical activity of the different NTPDase/ecto-5'-nucleotidase combinations, suggesting that the cellular context is an important parameter that determines the impact of these ectonucleotidases on extracellular nucleotide signalling. Consequently, purinergic receptors expressed in the vicinity of a particular NTPDase/ecto-5'-nucleotidase combination could be stimulated differently, depending on the existing biological conditions. Moreover, our results support the notion that NTPDase1, 2 and 8 likely play non-redundant roles in their

ability to modulate the purinergic signalling pathways, since the ATP hydrolysis profiles noticeably change along with the NTPDase isoenzyme added in the reaction mixture. (See figure 7). Several liver functions could be affected by this specific distribution of NTPDases and ecto-5'-nucleotidase: A) ion transport by cholangiocytes, an extracellular nucleotide-dependent mechanism which is essential in the bile formation process [85, 242]; B) purine salvage pathways in hepatocytes, as the liver represents the main source of nucleos/tides for the extrahepatic tissues incapable of de novo biosynthesis [33]; C) cell proliferation, an important feature of the liver tissue which has been shown to involve P2 receptor signalling in hepatocytes, sinusoidal endothelial cells and portal fibroblasts [144, 146, 147]; D) cell death, as stimulation of P1 as well as P2 receptors on hepatocytes has been shown to induce apoptosis [243, 244]; and finally E) the inflammation process, as hepatocytes and liver immune cells such as Kupffer cells, portal fibroblasts and hepatic stellate cells express different P1 and P2 receptors susceptible to modulate their activation or deactivation state during the development of liver diseases [49].

In summary, the specific distribution of NTPDase1, 2 and 8 with ecto-5'-nucleotidase in the liver regulates distinctly the levels of extracellular nucleos/tides and therefore must also regulate differentially the associated signalling pathways.

Acknowledgements

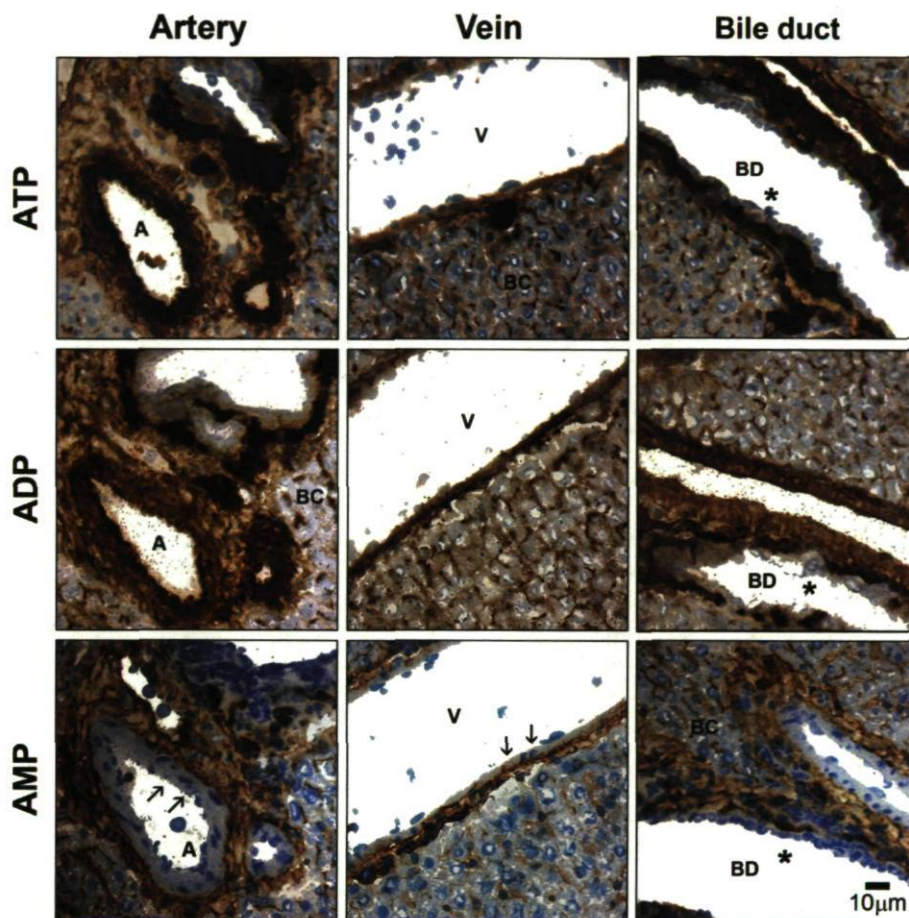
The authors thank Dr. H. Zimmermann for providing the plasmid encoding for rat ecto-5'-nucleotidase/CD73.

Financial support

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-49460 to J.S.). M.F. was a recipient of a scholarship from the government of Gabon and J.S. of a New Investigator award from the CIHR.

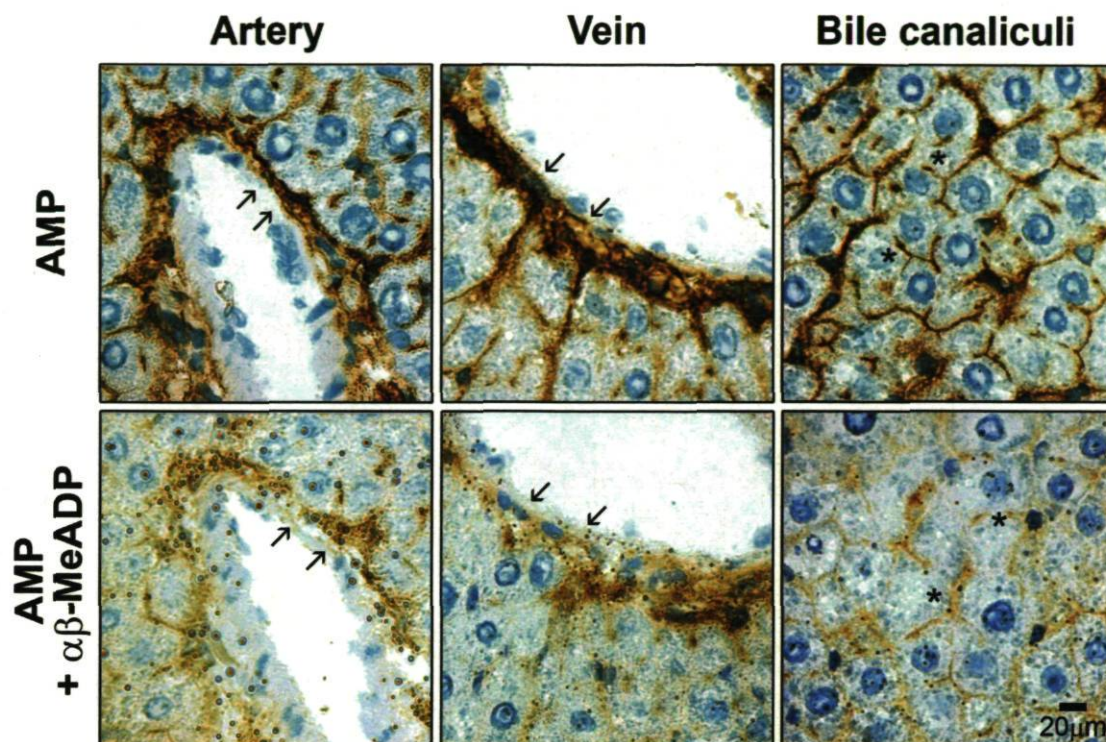
Figures

Figure B1: Histochemical detection of liver ectonucleotidase activities.



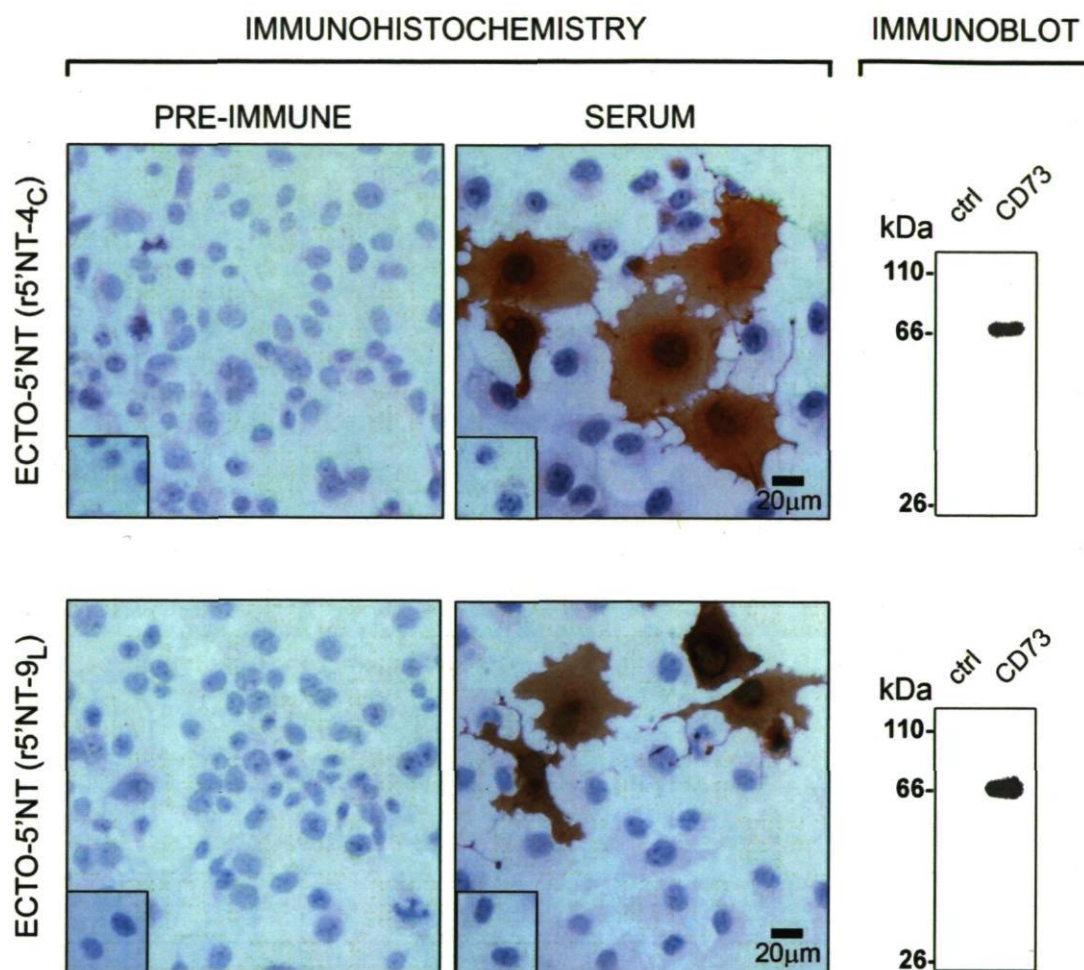
Ectonucleotidase activities were located in serial sections of a rat liver, with various nucleotides (200 μ M) as substrates. All three structural components of a classical hepatic triad are depicted, including branches of hepatic artery, portal vein and the intrahepatic bile ducts. ATPase and ADPase catalytic products are mainly detected at the level of all vasculature (arterial>venous), in the connective tissue associated with the portal space and in the bile canaliculi (upper and middle panels). The AMP hydrolysis pattern is located in similar structures to those of ATPase and ADPase activities, though no signal is observed neither in endothelium nor in the vascular smooth muscle cells (arrows, lower panels). No ectonucleotidase activity is detected in cholangiocytes for none of the substrates tested (asterisks, all right panels). All enzyme histochemical assays were performed in presence of the TNAP activity inhibitor levamisole (5 mM). Artery (A), vein (V), bile duct (BD), bile canaliculi (BC). *Scale bar 10 μ m.*

Figure B2: Histochemical detection of liver ecto-5'-nucleotidase activity.



Ecto-5'-nucleotidase activity was located in rat liver sections with AMP (200 μM) as substrate. Prominent signals for hepatic AMPase activity are detected in the connective tissue associated with the peri-vascular areas (arrows, upper panels), and in the bile canaliculi and (asterisks, upper panels). The ecto-5'-nucleotidase inhibitor $\alpha\beta$ -methylene-ADP (1 mM) reduces significantly the AMPase activity in all structures (arrows and asterisks, lower panels). All enzyme histochemical assays were performed in presence of the TNAP inhibitor levamisole (5 mM). *Scale bar 20 μm .*

Figure B3: Specificity of the polyclonal antibodies to rat ecto-5'-nucleotidase.



Immunocytochemistry was performed with intact nontransfected (insets) or transfected (panels) COS-7 cells with an expression vector encoding rat ecto-5'-nucleotidase. Cells were incubated with either the pre-immune serum or the polyclonal antibody to ecto-5'-nucleotidase made in guinea pig (upper panels) or rabbit (lower panels). Immunoreactivity is present only with transfected cells incubated with either the guinea pig r5'NT-4_C antibody or the rabbit r5'NT-9_L antibody. *Scale bar 20 µm.*

Immunoblot analysis of lysates from nontransfected COS-7 cells (ctrl) next to lysates from COS-7 cells transfected with the ecto-5'-nucleotidase expression vector shows a single band of about 66 kDa exclusively in the transfected cell lysates, again confirming the specificity of both guinea pig r5'NT-4_C and rabbit r5'NT-9_L sera. KiloDalton (kDa).

Figure B4: Comparative distribution of liver NTPDases and ecto-5'-nucleotidase.

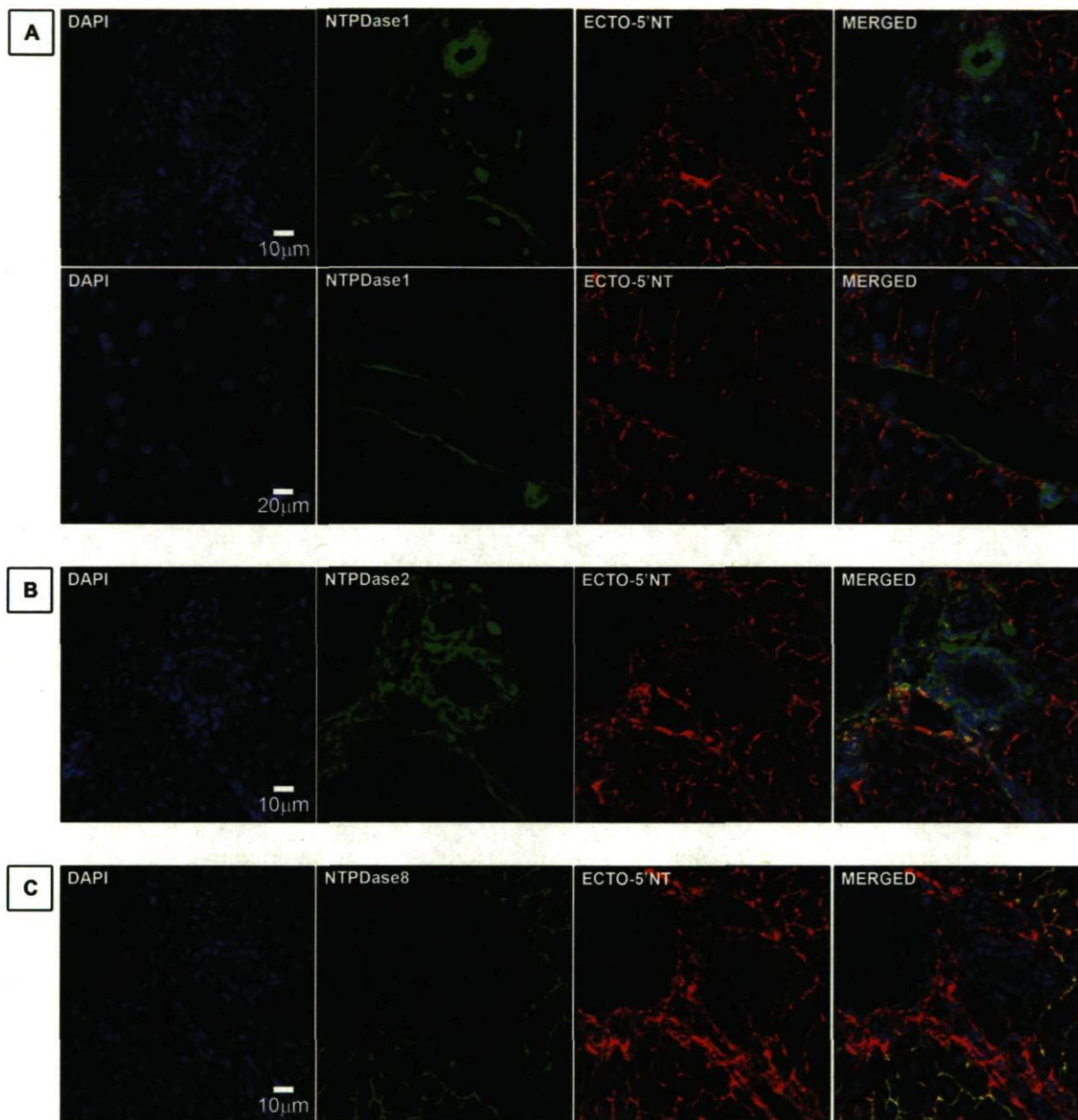
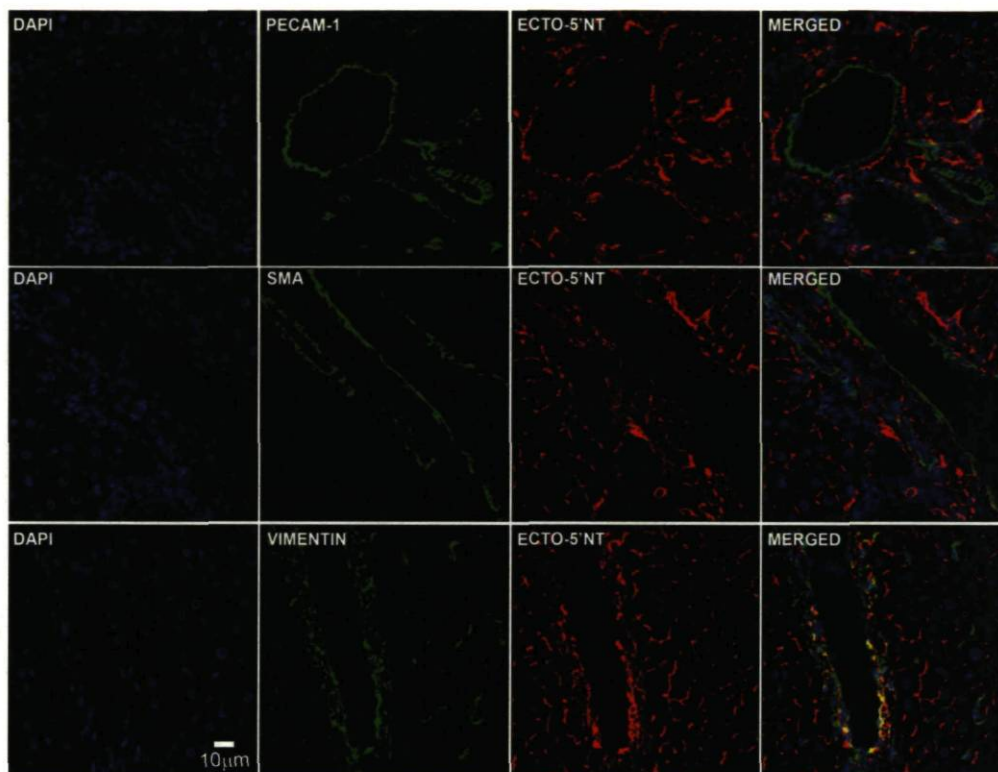


Figure B4: Comparative distribution of liver NTPDases and ecto-5'-nucleotidase.

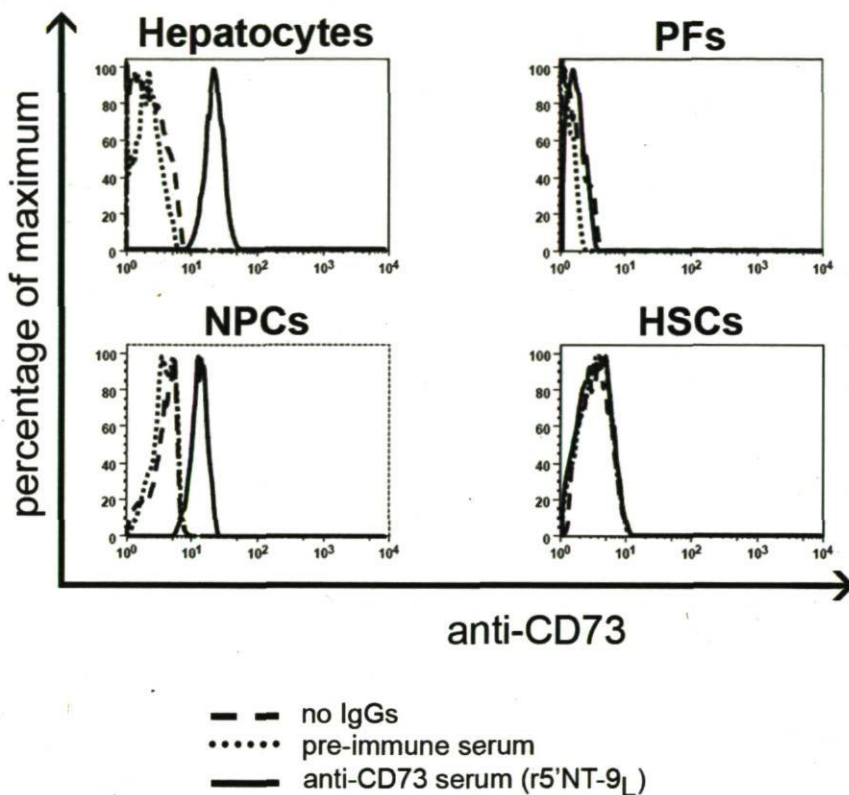
Double immunofluorescence labelling of NTPDases and ecto-5'-nucleotidase was performed in serial sections of fresh rat liver. A) NTPDase1 staining is associated with the liver vascular network and Kupffer cells. B) NTPDase2 labelling is detected in the connective tissue of portal and septal spaces and peri-vascular areas. C) NTPDase8 signal is present exclusively in bile canaliculi. All panels) Ecto-5'-nucleotidase immunostaining is observed in the connective tissue in the portal space or peri-vascular areas as well as in the bile canaliculi. Double staining of NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase reveals that both ectoenzymes are expressed by different cell populations that are present in the same vicinity, in the vasculature, the hepatic sinusoids and the hepatic extracellular matrix (A-MERGED, all panels). Similarly, NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase proteins are both present at the surface of distinct cell types of the hepatic connective tissue (B-MERGED). Both NTPDase8 and ecto-5'-nucleotidase co-localize in the bile canaliculi (C-MERGED). *Scale bar 10 μ m except for A lower panels, scale bar 20 μ m.*

Figure B5: Comparative distribution of liver ecto-5'-nucleotidase with cell markers.



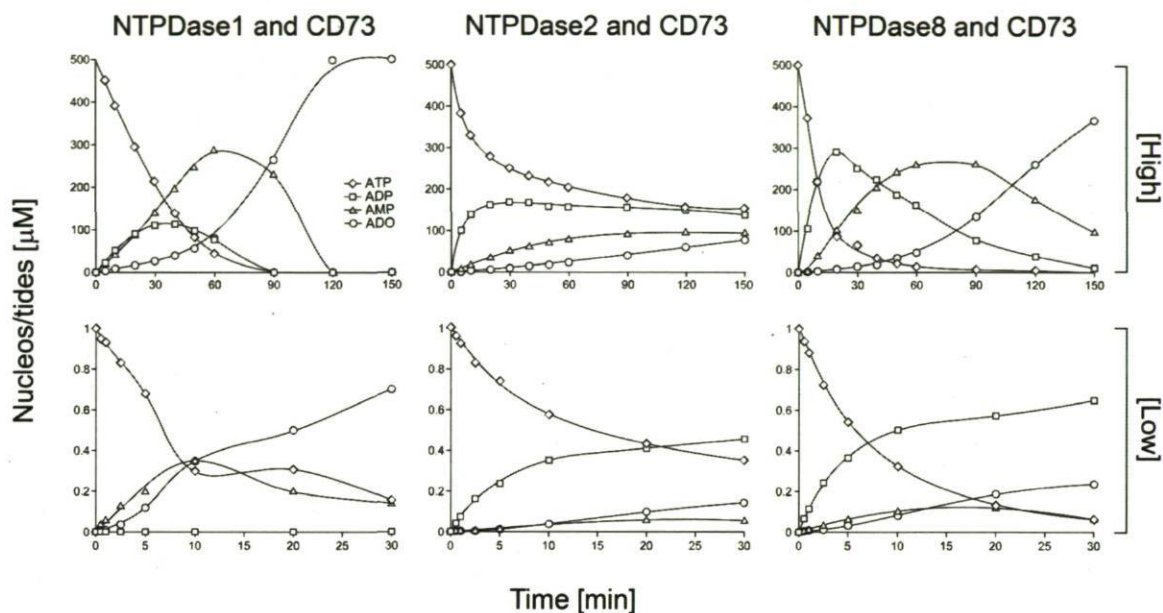
Double immunofluorescence labelling of ecto-5'-nucleotidase and cell markers for vascular endothelial cells (PECAM-1), myofibroblastic cells (α -SMA) and non-myofibroblastic cells (vimentin) was performed in rat liver sections. Ecto-5'-nucleotidase immunostaining is clearly distinct from those of PECAM-1 and α -SMA while it overlaps partially with that of vimentin. *Scale bar 10 μ m.*

Figure B6: Flow cytometry analysis of ecto-5'-nucleotidase expression on liver primary cell populations.



Cell populations were prepared as described in the “*Experimental procedures*” section. The ecto-5'-nucleotidase was labelled using the rabbit polyclonal r5'NT-9_L serum. Isolated hepatocytes and non-parenchymal cells (NPCs) are positive for ecto-5'-nucleotidase staining while portal fibroblasts (PFs) and hepatic stellate cells (HSCs) are negative.

Figure B7: ATP hydrolysis profiles of different combinations of ecto-5'-nucleotidase with hepatic NTPDases.



Hydrolysis products of 500 μM [high] and 1 μM ATP [low] were analyzed over time, as indicated in the “*Experimental procedures*” section.

At high substrate concentration, ATP is rapidly and completely converted into adenosine in presence of both NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase, while this nucleoside is hardly produced by the NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase combination. The ATP hydrolysis in presence of NTPDase8 and ecto-5'-nucleotidase generated a transient accumulation of ADP and AMP that resulted in a delayed (when compared to NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase combination) but substantial adenosine production (when compared to NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase combination).

At low substrate concentration, the incubation of ATP with NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase lead to its rapid dephosphorylation into adenosine with no increase in ADP level. In presence of either NTPDase2 or NTPDase8 together with ecto-5'-nucleotidase combination, the accumulation of generated ADP in the medium was accompanied by little AMP production because of a poor ADP hydrolysis and consequently resulted in a modest adenosine generation by ecto-5'-nucleotidase. The ATP hydrolysis pattern by NTPDase8 and ecto-5'-nucleotidase at low ATP concentration was very similar to the latter combination.

Chapitre 4: Discussion générale

L'objectif principal des travaux présentés dans cette thèse était donc de caractériser fonctionnellement, dans le contexte hépatique, les NTPDases et l'ecto-5'-nucléotidase, les enzymes majoritairement responsables de l'hydrolyse des nucléotides et nucléosides extracellulaires à pH physiologique.

Dans le foie, les prémisses de l'expression par les cellules hépatiques, d'une ou plusieurs enzyme(s) hydrolysant les nucléotides extracellulaires arrivent au début des années 1950, avec la description par Novikoff *et al.* d'une importante activité ATPasique dans le foie, détectée au niveau des canalicules biliaires [194, 195, 208]. Dans des études subséquentes, plusieurs groupes montrent que le développement de tumeurs hépatiques est notamment associé à des changements du niveau d'activité ectonucléotidasique canaliculaire, qui par le fait même devient un marqueur de choix pour les biologistes cellulaires de l'époque [245, 246]. Déjà, ces observations suggèrent l'existence potentielle d'un métabolisme voire d'une signalisation par les nucléotides extracellulaires. Au départ, la localisation canaliculaire de l'activité ATPasique majeure du foie incite les chercheurs à émettre l'hypothèse selon laquelle, la protéine à l'origine de cette activité enzymatique est probablement impliquée dans le transport des acides biliaires [33]. Il est d'abord démontré que cette enzyme est distincte de la pompe Na^+K^+ ATPase canaliculaire, impliquée dans le transport des acides biliaires mais dont l'expression est observée principalement au niveau de la face sinusoidale de la membrane des hépatocytes [247]. Puis, la caractérisation biochimique de l'ecto-ATPase canaliculaire par Lin et Russell démontre que cette protéine ne possède pas une activité ATPasique de transport classique de part sa résistance à l'action des inhibiteurs conventionnels des ATPases cytoplasmiques, de sa spécificité (de substrat) autant pour les nucléosides triphosphate que diphosphate, de sa dépendance envers les ions divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} et de la localisation extracellulaire des produits d'hydrolyse de l'ATP [248]. Plus tard, cette notion sera indirectement confortée avec l'identification de plusieurs glycoprotéines canaliculaires de la famille des transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) telles que MDR1, MDR2, MRP-2 et SPGP impliquées dans la formation de la bile, mais caractérisées par une faible activité ATPase comparativement à celle de l'ecto-ATPase

canaliculaire [33, 249, 250]. D'autres glycoprotéines canaliculaires abondantes comme cCAM-105, pp120/H4A et gp110 vont être identifiées, mais non considérées puisqu'elles ne possédaient aucune activité ectonucléotidasique. En 1996, l'identification et le clonage par Wang et Guidotti de la NTPDase1/CD39 humaine, le premier membre d'une nouvelle famille d'ectonucléotidasés ayant des propriétés biochimiques semblables à celle décrites pour l'ATPase canaliculaire, suscite un nouvel intérêt [110]. Suite à la purification et la caractérisation d'une enzyme canaliculaire appelée hATPDase de porc, Sévigny *et al.* suggèrent que cette protéine, distincte des NTPDase1 et 2 hépatiques par sa résistance à l'azidure de sodium et sa localisation cellulaire, soit responsable de l'activité majeure ATPasique du foie [197]. Par la suite, l'équipe de Knowles *et al.* purifient chez le poulet une autre enzyme canaliculaire appelée ecto-ATPDase et suggèrent également que cette ectonucléotidasé est responsable de l'activité ATPasique majeure du foie [200]. Finalement, une étude menée en 2004 dans notre laboratoire par Bigonnesse *et al.* présente le clonage et la caractérisation biochimique d'une nouvelle ectonucléotidasé, la NTPDase8 qui est fortement exprimée dans le foie [137]. Jusqu'à ce moment, aucune étude n'était parvenue à déterminer l'identité moléculaire de l'ecto-ATPase canaliculaire. Dans les résultats qui ont fait l'objet d'une publication [1] et présentés au chapitre 2 de cette thèse, nous avons clairement démontré que l'identité moléculaire de l'ecto-ATPase canaliculaire correspond à la NTPDase8 récemment clonée, à l'aide de plusieurs approches biochimique, moléculaire et immunologique. Particulièrement, la production d'un plasmide codant pour la NTPDase8 de rat a permis d'une part, la génération par la technique d'immunisation à l'ADNc d'anticorps polyclonaux spécifiques que nous avons utilisés pour étudier l'expression et la localisation de la NTPDase8 de rat. D'autre part, elle nous a permis d'étudier les propriétés biochimiques des NTPDase8s recombinante humaine et de rat. Il est intéressant de noter que la NTPDase8 de rat, la hATPDase porcine et l'ecto-ATPDase de poulet possèdent des caractéristiques biochimiques semblables et une forte homologie de séquence, suggérant que ces enzymes sont des orthologues.

En dehors des NTPDase1, 2 et 8 qui sont principalement responsables des activités d'hydrolyse des nucléosides tri- (ex : ATP) et diphosphate (ex : ADP) dans le foie, les cellules hépatiques expriment l'ecto-5'-nucléotidasé qui hydrolyse spécifiquement les

nucléosides monophosphate (ex : AMP). Ensemble, ces quatre ectoenzymes contribuent à l'activité ectonucléotidasique majeure, mesurée à pH physiologique dans le foie. Dans les résultats présentés au chapitre 3 de cette thèse, nous montrons l'influence de l'action coordonnée de ces ectonucléotidasiques hépatiques sur les niveaux de nucléotides extracellulaires. Le patron de distribution spécifique des NTPDase1, 2 et 8 hépatiques chevauche celui de l'ecto-5'-nucléotidase, tant au niveau de l'activité d'hydrolyse des nucléotides que de l'expression protéique. Ainsi, bien que présentes sur des cellules distinctes, la co-expression de l'ecto-5'-nucléotidase avec les NTPDase1 et 2 est observée au niveau du tissu conjonctif périvasculaire et/ou périductulaire. De plus, l'ecto-5'-nucléotidase est co-localisée avec la NTPDase8 au niveau du domaine membranaire apical des hépatocytes. Cette localisation particulière de l'ecto-5'-nucléotidase par rapport à chaque NTPDase hépatique entraîne une régulation distincte de la nature, du niveau et de la disponibilité dans le temps des nucléotides extracellulaires, comme le démontre l'essai biochimique d'hydrolyse de l'ATP. Par exemple, en présence de concentrations physiologiques de nucléotides extracellulaires c'est-à-dire de l'ordre du micromolaire [19, 21], les récepteurs P1 pourront être activés avec la combinaison NTPDase1 et ecto-5'-nucléotidase, tandis que les récepteurs P2X₁₋₇ et les récepteurs P2Y_{1, 6, 12, 13} sensibles à l'ADP ou l'UDP seront activés en présence des combinaisons NTPDase2 ou NTPDase8 avec l'ecto-5'-nucléotidase. De plus, la concentration de nucléotides extracellulaires semble influencer la ou les voie(s) de signalisation activée(s). En effet, en présence de quantités importantes de nucléotides extracellulaires semblables à celles mesurées lors de conditions pathologiques comme l'hépatite [42], l'action combinée de la NTPDase1 avec l'ecto-5'-nucléotidase conduit à l'activation des récepteurs P1, toutefois précédée par l'activation des récepteurs P2 sensibles à l'ADP de manière transitoire, un phénomène qui n'est pas observé en présence d'une faible concentration de substrat. Ces données montrent que les activités enzymatiques des différentes NTPDases sont non redondantes et donc qu'elles contribuent chacune de manière distincte à la régulation de la signalisation hépatique par les nucléotides extracellulaires.

D'un point de vue fonctionnel, les résultats présentés dans cette thèse vont nous permettre de mieux comprendre l'importance physiologique des NTPDases hépatiques. L'ecto-

ATPase canaliculaire étant aussi connue sous le nom de NTPDase8 maintenant, il serait intéressant d'étudier de manière approfondie son rôle dans la physiologie hépatique, en utilisant des approches moléculaires ciblées comme la technologie de l'ARN interférant ou la génération d'une lignée de souris déficientes pour ce gène. La NTPDase8 pourrait moduler plusieurs fonctions hépatocytaires dépendantes de la signalisation purinergique comme la formation de la bile [85], l'apoptose [243, 244, 251], la prolifération [146, 252, 253] et le métabolisme du glucose [86]. Une avenue prometteuse serait l'étude des changements potentiels du niveau d'expression ou de la localisation de chaque enzyme au cours du développement de conditions inflammatoires hépatiques comme la fibrose. Une telle approche permettrait d'évaluer l'impact de changements des niveaux d'activité ectonucléotidasique sur la réponse cellulaire hépatique, comme il a été démontré pour la NTPDase2 exprimée sur les fibroblastes portaux et son rôle dans le contrôle de la prolifération de l'épithélium biliaire [144]. En dehors du foie, la NTPDase8 est exprimée dans l'intestin, les reins [1, 197] et les poumons (voir figure C1, Annexe 1, *données non publiées du laboratoire Sévigny*). Dans tous ces tissus, la NTPDase8 a la particularité d'être exprimée par des cellules épithéliales de type glandulaire, suggérant un rôle potentiel pour cette enzyme dans les processus sécrétoires. Il est également surprenant mais intéressant de noter que l'ecto-5'-nucléotidase est absente de l'endothélium vasculaire et fortement exprimée par un type cellulaire fibroblastique non identifié présent dans le tissu conjonctif périvasculaire et/ou périductulaire chez le rat (voir figures B2 et B4) et la souris (voir figure C2, Annexe 1, *données non publiées du laboratoire Sévigny*). Ce patron d'expression est différent de celui observé pour l'ecto-5'-nucléotidase humaine qui est présente à la surface de l'endothélium vasculaire et faiblement exprimée dans le tissu conjonctif de l'espace porte (voir figure 6). Récemment, l'expression de l'ecto-5'-nucléotidase humaine a été décrite à la surface de cellules-souches (*human liver stem cells, HLSCs*) et de fibroblastes hépatiques (*human liver fibroblasts, hLFs*) respectivement [254, 255]. Par conséquent, l'identification et la caractérisation de(s) population(s) cellulaire(s) de type fibroblastique exprimant l'ecto-5'-nucléotidase permettra de mieux comprendre la contribution de cette enzyme dans le maintien de l'homéostasie cellulaire hépatique ou dans le développement de pathologies hépatiques comme la fibrose, chez le rat et d'autres espèces.

En résumé, les NTPDase1, 2 et 8, et l'ecto-5'-nucléotidase, par leur capacité à hydrolyser les nucléotides extracellulaires comme l'ATP, l'ADP et l'AMP, participent de manière essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire du foie.

Bibliographie

1. **Fausther M, Lecka J, Kukulski F, Lévesque SA, Pelletier J, Zimmermann H, Dranoff JA, Sévigny J.** Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. *American journal of physiology.* 2007 Mar;292(3):G785-95.
2. **Fiske CH, Subbarow Y.** Phosphorus Compounds of Muscle and Liver. *Science.* 1929 Oct 18;70(1816):381-2.
3. **Lohman K.** Über die Pyrophosphat fraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* [Journal article]. 1929 August, 1929;17(31):624-5.
4. **Voet D, Voet JG.** *Biochemistry* (2nd edition). 2nd edition ed. New York, USA: John Wiley and Sons, Inc. ; 1995.
5. **Bodin P, Burnstock G.** Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res.* 2001 Sep;26(8-9):959-69.
6. **Fitz JG.** Regulation of cellular ATP release. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2007;118:199-208.
7. **Drury AN, Szent-Gyorgyi A.** The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 1929 Nov 25;68(3):213-37.
8. **Buchthal F, Folkow B.** Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol Scand.* 1948 Apr 20;15(2):150-60.
9. **Holton P.** The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol.* 1959 Mar 12;145(3):494-504.
10. **Berne RM.** Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol.* 1963 Feb;204:317-22.
11. **Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A.** Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *British journal of pharmacology.* 1970 Dec;40(4):668-88.
12. **Burnstock G.** Purinergic nerves. *Pharmacological reviews.* 1972 Sep;24(3):509-81.
13. **Burnstock G.** A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In *Cell Membranes Receptors for Drugs and Hormones: A multidisciplinary Approach* [Straub, RW and Bolis, L editions, New York : Raven Press]. [Review]. 1978:107-18.
14. **el-Moatassim C, Dornand J, Mani JC.** Extracellular ATP and cell signalling. *Biochimica et biophysica acta.* 1992 Feb 19;1134(1):31-45.
15. **Gordon JL.** Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J.* 1986 Jan 15;233(2):309-19.
16. **Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK.** Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular pharmacology.* 2003 Oct;64(4):785-95.
17. **Praetorius HA, Leipziger J.** ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic signalling.* 2009 Mar 20.
18. **Miller DS, Horowitz SB.** Intracellular compartmentalization of adenosine triphosphate. *The Journal of biological chemistry.* 1986 Oct 25;261(30):13911-5.
19. **Dunkelberg JC, Feranchak AP, Fitz JG.** Liver cell volume regulation: size matters. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2001 Jun;33(6):1349-52.

20. **Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK.** Interplay of constitutively released nucleotides, nucleotide metabolism, and activity of P2Y receptors. *Drug Development Research*. [Review]. 2001;53(2-3):66-71.
21. **Feranchak AP, Fitz JG.** Adenosine triphosphate release and purinergic regulation of cholangiocyte transport. *Seminars in liver disease*. 2002 Aug;22(3):251-62.
22. **Schwiebert EM, Zsembery A.** Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2003 Sep 2;1615(1-2):7-32.
23. **Pankratov Y, Lalo U, Verkhatsky A, North RA.** Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch*. 2006 Aug;452(5):589-97.
24. **Boeynaems JM, Communi D, Gonzalez NS, Robaye B.** Overview of the P2 receptors. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2005 Apr;31(2):139-49.
25. **Nagasawa J.** Exocytosis: the common release mechanism of secretory granules in glandular cells, neurosecretory cells, neurons and paraneurons. *Arch Histol Jpn*. 1977;40 Suppl:31-47.
26. **Woo K, Dutta AK, Patel V, Kresge C, Feranchak AP.** Fluid flow induces mechanosensitive ATP release, calcium signalling and Cl⁻ transport in biliary epithelial cells through a PKCzeta-dependent pathway. *J Physiol*. 2008 Jun 1;586(Pt 11):2779-98.
27. **Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA.** International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*. 2006 Sep;58(3):281-341.
28. **Nathanson MH, Burgstahler AD, Masyuk A, Larusso NF.** Stimulation of ATP secretion in the liver by therapeutic bile acids. *Biochem J*. 2001 Aug 15;358(Pt 1):1-5.
29. **King AE, Ackley MA, Cass CE, Young JD, Baldwin SA.** Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends in pharmacological sciences*. 2006 Aug;27(8):416-25.
30. **Loffler M, Morote-Garcia JC, Eltzschig SA, Coe IR, Eltzschig HK.** Physiological roles of vascular nucleoside transporters. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 May;27(5):1004-13.
31. **Rose JB, Coe IR.** Physiology of nucleoside transporters: back to the future. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2008 Feb;23:41-8.
32. **Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD.** The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):735-43.
33. **Che MX, Gatmaitan Z, Arias IM.** Ectonucleotidases, purine nucleoside transporter, and function of the bile canalicular plasma membrane of the hepatocyte. *FASEB J*. 1997;11(2):101-8.
34. **Gray JH, Owen RP, Giacomini KM.** The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):728-34.
35. **Lajtha LG, Vane JR.** Dependence of bone marrow cells on the liver for purine supply. *Nature*. 1958 Jul 19;182(4629):191-2.
36. **Lowy BA, Ramot B, London IM.** The biosynthesis of adenosine triphosphate and guanosine triphosphate in the rabbit erythrocyte in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 1960 Oct;235:2920-3.
37. **Mackinnon AM, Deller DJ.** Purine nucleotide biosynthesis in gastrointestinal mucosa. *Biochimica et biophysica acta*. 1973 Aug 10;319(1):1-4.

38. **Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J.** International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacological reviews. 2001 Dec;53(4):527-52.
39. **St Hilaire C, Carroll SH, Chen H, Ravid K.** Mechanisms of induction of adenosine receptor genes and its functional significance. *J Cell Physiol.* 2009 Jan;218(1):35-44.
40. **Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dinsart C, Van Sande J, Maenhaut C, Simons MJ, Dumont JE, Vassart G.** Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science.* 1989 May 5;244(4904):569-72.
41. **Burnstock G.** Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Jun;64(12):1471-83.
42. **Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P.** Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Sep;7(9):759-70.
43. **Gomez G, Sitkovsky MV.** Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood.* 2003 Dec 15;102(13):4472-8.
44. **Linden J.** Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:775-87.
45. **Klaasse EC, Ijzerman AP, de Grip WJ, Beukers MW.** Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic signalling.* 2008 Mar;4(1):21-37.
46. **Kolachala VL, Bajaj R, Chalasani M, Sitaraman SV.** Purinergic receptors in gastrointestinal inflammation. *American journal of physiology.* 2008 Feb;294(2):G401-10.
47. **Hashmi AZ, Hakim W, Kruglov EA, Watanabe A, Watkins W, Dranoff JA, Mehal WZ.** Adenosine inhibits cytosolic calcium signals and chemotaxis in hepatic stellate cells. *American journal of physiology.* 2007 Jan;292(1):G395-401.
48. **Hasko G, Pacher P.** A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *Journal of leukocyte biology.* 2008 Mar;83(3):447-55.
49. **Beldi G, Enjyoji K, Wu Y, Miller L, Banz Y, Sun X, Robson SC.** The role of purinergic signaling in the liver and in transplantation: effects of extracellular nucleotides on hepatic graft vascular injury, rejection and metabolism. *Front Biosci.* 2008;13:2588-603.
50. **Guinzberg R, Cortes D, Diaz-Cruz A, Riveros-Rosas H, Villalobos-Molina R, Pina E.** Inosine released after hypoxia activates hepatic glucose liberation through A3 adenosine receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 May;290(5):E940-51.
51. **Yasuda N, Inoue T, Horizoe T, Nagata K, Minami H, Kawata T, Hoshino Y, Harada H, Yoshikawa S, Asano O, Nagaoka J, Murakami M, Abe S, Kobayashi S, Tanaka I.** Functional characterization of the adenosine receptor contributing to glycogenolysis and gluconeogenesis in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 2003 Jan 17;459(2-3):159-66.
52. **Gallos G, Ruyle TD, Emala CW, Lee HT.** A1 adenosine receptor knockout mice exhibit increased mortality, renal dysfunction, and hepatic injury in murine septic peritonitis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Aug;289(2):F369-76.
53. **Lee HT, Kim M, Joo JD, Gallos G, Chen JF, Emala CW.** A3 adenosine receptor activation decreases mortality and renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 Oct;291(4):R959-69.

54. **Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M.** Targeting hypoxia--A(2A) adenosine receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Drug Discov Today*. 2004 May 1;9(9):403-9.
55. **Ohta A, Sitkovsky M.** Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*. 2001 Dec 20-27;414(6866):916-20.
56. **Linden J.** Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Molecular pharmacology*. 2005 May;67(5):1385-7.
57. **Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC.** Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & therapeutics*. 2006 Nov;112(2):358-404.
58. **Burnstock G.** Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews*. 2007 Apr;87(2):659-797.
59. **Jarvis MF, Khakh BS.** ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*. 2009 Jan;56(1):208-15.
60. **Khakh BS, North RA.** P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*. 2006 Aug 3;442(7102):527-32.
61. **Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G.** A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*. 1994 Oct 6;371(6497):516-9.
62. **Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D.** New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*. 1994 Oct 6;371(6497):519-23.
63. **Murrell-Lagnado RD, Qureshi OS.** Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors (Review). *Mol Membr Biol*. 2008 May;25(4):321-31.
64. **Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP.** Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch*. 2006 Aug;452(5):513-37.
65. **Egan TM, Migita K, Voigt MM.** Relating the Structure of ATP-Gated Ion Channels Receptors to Their Function. In: Schwiebert EM, editor. *Extracellular nucleotides and nucleosides: release, receptors, and physiological and pathophysiological effects* Academic Press; 2003. p. 183-204.
66. **Egan TM, Samways DS, Li Z.** Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch*. 2006 Aug;452(5):501-12.
67. **Burnstock G, Knight GE.** Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol*. 2004;240:31-304.
68. **Emmett DS, Feranchak A, Kilic G, Puljak L, Miller B, Dolovcak S, McWilliams R, Doctor RB, Fitz JG.** Characterization of ionotropic purinergic receptors in hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2008 Feb;47(2):698-705.
69. **Doctor RB, Matzakos T, McWilliams R, Johnson S, Feranchak AP, Fitz JG.** Purinergic regulation of cholangiocyte secretion: identification of a novel role for P2X receptors. *American journal of physiology*. 2005 Apr;288(4):G779-86.
70. **Kawamura H, Aswad F, Minagawa M, Govindarajan S, Dennert G.** P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis. *J Immunol*. 2006 Feb 15;176(4):2152-60.
71. **Surprenant A, North RA.** Signaling at Purinergic P2X Receptors. *Annu Rev Physiol*. 2008 Oct 13.

72. **Ralevic V, Burnstock G.** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews.* 1998 Sep;50(3):413-92.
73. **von Kugelgen I.** Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology & therapeutics.* 2006 Jun;110(3):415-32.
74. **Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA.** Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 1993 Jun 14;324(2):219-25.
75. **Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D.** Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jun 1;90(11):5113-7.
76. **Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N.** Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jul 11;371(4):707-12.
77. **Pasternack SM, von Kugelgen I, Aboud KA, Lee YA, Ruschendorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nurnberg P, Nothen MM, Betz RC.** G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet.* 2008 Mar;40(3):329-34.
78. **Gonzalez FA, Weisman GA, Erb L, Seye CI, Sun GY, Velazquez B, Hernandez-Perez M, Chorna NE.** Mechanisms for inhibition of P2 receptors signaling in neural cells. *Mol Neurobiol.* 2005;31(1-3):65-79.
79. **Bar I, Guns PJ, Metallo J, Cammarata D, Wilkin F, Boeynants JM, Bult H, Robaye B.** Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Molecular pharmacology.* 2008 Sep;74(3):777-84.
80. **Bassil AK, Bourdu S, Townson KA, Wheeldon A, Jarvie EM, Zebda N, Abuin A, Grau E, Livi GP, Punter L, Latcham J, Grimes AM, Hurp DP, Downham KM, Sanger GJ, Winchester WJ, Morrison AD, Moore GB.** UDP-glucose modulates gastric function through P2Y14 receptor-dependent and -independent mechanisms. *American journal of physiology.* 2009 Apr;296(4):G923-30.
81. **Velazquez B, Garrad RC, Weisman GA, Gonzalez FA.** Differential agonist-induced desensitization of P2Y2 nucleotide receptors by ATP and UTP. *Mol Cell Biochem.* 2000 Mar;206(1-2):75-89.
82. **Hardy AR, Conley PB, Luo J, Benovic JL, Poole AW, Mundell SJ.** P2Y1 and P2Y12 receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms. *Blood.* 2005 May 1;105(9):3552-60.
83. **Yoshioka K, Hosoda R, Kuroda Y, Nakata H.** Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains. *FEBS Lett.* 2002 Nov 6;531(2):299-303.
84. **Suzuki T, Namba K, Tsuga H, Nakata H.** Regulation of pharmacology by hetero-oligomerization between A1 adenosine receptor and P2Y2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Dec 15;351(2):559-65.
85. **Zsembery A, Spirli C, Granato A, LaRusso NF, Okolicsanyi L, Crepaldi G, Strazzabosco M.** Purinergic regulation of acid/base transport in human and rat biliary epithelial cell lines. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 1998 Oct;28(4):914-20.
86. **Dixon CJ, White PJ, Hall JF, Kingston S, Boarder MR.** Regulation of human hepatocytes by P2Y receptors: control of glycogen phosphorylase, Ca²⁺, and mitogen-

- activated protein kinases. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005 Jun;313(3):1305-13.
87. **Fabre AC, Vantourout P, Champagne E, Terce F, Rolland C, Perret B, Collet X, Barbaras R, Martinez LO.** Cell surface adenylate kinase activity regulates the F(1)-ATPase/P2Y (13)-mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Dec;63(23):2829-37.
88. **Gachet C.** P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thrombosis and haemostasis*. 2008 Mar;99(3):466-72.
89. **Gachet C, Hechler B.** The platelet P2 receptors in thrombosis. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2005 Apr;31(2):162-7.
90. **Hechler B, Cattaneo M, Gachet C.** The P2 receptors in platelet function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2005 Apr;31(2):150-61.
91. **Zimmermann H.** Extracellular purine metabolism. *Drug Development Research*. 1996;39(3-4):337-52.
92. **Zimmermann H.** Ectonucleotidases: Some recent developments and note on nomenclature. *Drug Development Res*. 2001;52:44-56.
93. **Volonte C, D'Ambrosi N.** Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *The FEBS journal*. 2009 Jan;276(2):318-29.
94. **Yegutkin GG.** Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et biophysica acta*. 2008 May;1783(5):673-94.
95. **Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H.** The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure, function, relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling*. 2006 June 2006;2(2):409-30.
96. **Stefan C, Jansen S, Bollen M.** NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci*. 2005 Oct;30(10):542-50.
97. **Zimmermann H.** Prostatic acid phosphatase, a neglected ectonucleotidase. *Purinergic signalling*. 2009 Mar 26.
98. **Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, Lluís C.** Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol*. 1997 Jul;52(4):283-94.
99. **Picher M, Boucher RC.** Human airway ecto-adenylate kinase. A mechanism to propagate ATP signaling on airway surfaces. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Mar 28;278(13):11256-64.
100. **Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO.** The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr*. 2000 Jun;32(3):247-58.
101. **Kalckar HM.** Adenylpyrophosphatase and Myokinase. *Journal of Biological Chemistry*. [Research Article]. 1944 January 19, 1944;153(2):355-67.
102. **Sévigny J.** PURIFICATION, CARACTÉRISATION ET LOCALISATION DES ATP DIPHOSPHOHYDROLASES DE MAMMIFÈRES, ET CLONAGE DE L'ADNc [Thèse par article scientifique]. Sherbrooke: Université de Sherbrooke; 1997.
103. **Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR, Zimmermann H.** An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology*. 1997 Sep;36(9):1189-200.

104. **Zimmermann H.** Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 1996 Aug;49(6):589-618.
105. **Zimmermann H, Beaudoin AR, Bollen M, W. GJ, Guidotti G, Kirley TL, Robson SC, Sano K,** editors. Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface. *Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases*; 1999 2000; Diepenbeek, Belgium.: Shaker Publishing BV, Maastricht, The Netherlands.
106. **Zimmermann H.** Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000 Nov;362(4-5):299-309.
107. **Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sévigny J.** Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic signalling.* 2005 Jun;1(2):193-204.
108. **Handa M, Guidotti G.** Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Jan 26;218(3):916-23.
109. **Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C, et al.** The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol.* 1994 Oct 15;153(8):3574-83.
110. **Wang TF, Guidotti G.** CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. *The Journal of biological chemistry.* 1996 Apr 26;271(17):9898-901.
111. **Sévigny J, Côté YP, Beaudoin AR.** Purification of pancreas type I ecto-ATP diphosphohydrolase and identification by affinity labelling with the 5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenine ATP analogue. *Biochemical J.* 1995;312:351-6.
112. **Sévigny J, Lévesque FP, Grondin G, Beaudoin AR.** Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localization by immunological techniques. *Biochimica Biophysica Acta.* 1997 Feb;1334(1):73-88.
113. **Christoforidis S, Papamarcaki T, Tsolas O.** Human placental ATP diphosphohydrolase is a highly N-glycosylated plasma membrane enzyme. *Biochimica et biophysica acta.* 1996 Jul 25;1282(2):257-62.
114. **Christoforidis S, Papamarcaki T, Galaris D, Kellner R, Tsolas O.** Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. *Eur J Biochem.* 1995 Nov 15;234(1):66-74.
115. **Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC.** Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271(51):33116-22.
116. **Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC.** Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood.* 2002 Apr 15;99(8):2801-9.
117. **Kauffmanstein G, Drouin A, Thorin-Trescases N, Bachelard H, Robaye B, D'Orleans-Juste P, Marceau F, Thorin E, Sévigny J.** NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse. *Cardiovasc Res.* 2009 Aug 20.
118. **Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sévigny J, Matsue H, Enjyoji K, Takashima A.** CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase:

- modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med.* 2002 Apr;8(4):358-65.
119. **Vekaria RM, Shirley DG, Sévigny J, Unwin RJ.** Immunolocalization of ectonucleotidases along the rat nephron. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Feb;290(2):F550-60.
120. **Martin-Satue M, Lavoie EG, Pelletier J, Fausther M, Csizmadia E, Guckelberger O, Robson SC, Sévigny J.** Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol.* 2009 Jan 6.
121. **Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjoji K.** Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 2005 Apr;31(2):217-33.
122. **Kirley TL.** Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. Homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *The Journal of biological chemistry.* 1997 Jan 10;272(2):1076-81.
123. **Mateo J, Harden TK, Boyer JL.** Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *British journal of pharmacology.* 1999 Sep;128(2):396-402.
124. **Dranoff JA, Kruglov EA, Robson SC, Braun N, Zimmermann H, Sévigny J.** The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase2/CD39L1 is expressed in a novel functional compartment within the liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2002 Nov;36(5):1135-44.
125. **Iandiev I, Wurm A, Pannicke T, Wiedemann P, Reichenbach A, Robson SC, Zimmermann H, Bringmann A.** Ectonucleotidases in Muller glial cells of the rodent retina: Involvement in inhibition of osmotic cell swelling. *Purinergic signalling.* 2007 Sep;3(4):423-33.
126. **Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Lenz G, Zerbini LF, Libermann TA, Sévigny J, Battastini AM, Robson SC.** Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience.* 2006;138(2):421-32.
127. **Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sévigny J, Finger TE.** Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J Comp Neurol.* 2006 Jul 1;497(1):1-12.
128. **Smith TM, Kirley TL.** Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases1. *Biochimica et biophysica acta.* 1998 Jul 28;1386(1):65-78.
129. **Lavoie EG, Kukulski F, Lévesque SA, Lecka J, Sévigny J.** Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem Pharmacol.* 2004 May 15;67(10):1917-26.
130. **Belcher SM, Zsarnovszky A, Crawford PA, Hemani H, Spurling L, Kirley TL.** Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. *Neuroscience.* 2006;137(4):1331-46.
131. **Lavoie EG, Fausther M, Sévigny J.** Regulation of Insulin Secretion by NTPDase3. *Purines 2008 Meeting, Copenhagen, Denmark ed: Springer Science Business Media B.V.; 2008. p. S50.*

132. **Biederbick A, Kosan C, Kunz J, Elsasser HP.** First apyrase splice variants have different enzymatic properties. *The Journal of biological chemistry.* 2000 Jun 23;275(25):19018-24.
133. **Shi JD, Kukar T, Wang CY, Li QZ, Cruz PE, Davoodi-Semiromi A, Yang P, Gu Y, Lian W, Wu DH, She JX.** Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *The Journal of biological chemistry.* 2001 May 18;276(20):17474-8.
134. **Recio JA, Zambrano N, de La Pena L, Powers C, Siwarski D, Huppi K, Notario V.** cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse pcp proto-oncogene. *Mol Carcinog.* 1999 Oct;26(2):130-6.
135. **Braun N, Fengler S, Ebeling C, Servos J, Zimmermann H.** Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochemical Journal.* 2000 Nov;351(Part 3):639-47.
136. **Chadwick BP, Frischauf AM.** 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 Jun 15;50(3):357-67.
137. **Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJG, Sévigny J.** Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry.* 2004 May 11;43(18):5511-9.
138. **Enjyoji K, Sévigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS, 2nd, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD.** Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med.* 1999 Sep;5(9):1010-7.
139. **Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES, Jr., Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart RA, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR.** Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *The Journal of clinical investigation.* 2002 Apr;109(8):1031-40.
140. **Read R, Hansen G, Kramer J, Finch R, Li L, Vogel P.** Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase type 5 (entpd5)-deficient mice develop progressive hepatopathy, hepatocellular tumors, and spermatogenic arrest. *Vet Pathol.* 2009 May;46(3):491-504.
141. **Masse K, Bhamra S, Eason R, Dale N, Jones EA.** Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature.* 2007 Oct 25;449(7165):1058-62.
142. **Mishra SK, Braun N, Shukla V, Fullgrabe M, Schomerus C, Korf HW, Gachet C, Ikehara Y, Sévigny J, Robson SC, Zimmermann H.** Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development.* 2006 Feb;133(4):675-84.
143. **Grimm I, Messemer N, Stanke M, Gachet C, Zimmermann H.** Coordinate pathways for nucleotide and EGF signaling in cultured adult neural progenitor cells. *J Cell Sci.* 2009 Jul 15;122(Pt 14):2524-33.
144. **Jhandier MN, Kruglov EA, Lavoie EG, Sévigny J, Dranoff JA.** Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *The Journal of biological chemistry.* 2005 Jun 17;280(24):22986-92.

145. **Dranoff JA, Kruglov EA, Toure J, Braun N, Zimmermann H, Jain D, Knowles AF, Sévigny J.** Ectonucleotidase NTPDase2 is selectively down-regulated in biliary cirrhosis. *J Investig Med.* 2004 Nov;52(7):475-82.
146. **Thevananther S, Sun H, Li D, Arjunan V, Awad SS, Wyllie S, Zimmerman TL, Goss JA, Karpen SJ.** Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.* 2004 Feb;39(2):393-402.
147. **Beldi G, Wu Y, Sun X, Imai M, Enjyoji K, Csizmadia E, Candinas D, Erb L, Robson SC.** Regulated catalysis of extracellular nucleotides by vascular CD39/ENTPD1 is required for liver regeneration. *Gastroenterology.* 2008 Nov;135(5):1751-60.
148. **Stefan C, Jansen S, Bollen M.** Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic signalling.* 2006 Jun;2(2):361-70.
149. **Takahashi T, Old LJ, Boyse EA.** Surface alloantigens of plasma cells. *The Journal of experimental medicine.* 1970 Jun 1;131(6):1325-41.
150. **Goding JW, Grobden B, Slegers H.** Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica et biophysica acta.* 2003 May 20;1638(1):1-19.
151. **Dong H, Maddux BA, Altomonte J, Meseck M, Accili D, Terkeltaub R, Johnson K, Youngren JF, Goldfine ID.** Increased hepatic levels of the insulin receptor inhibitor, PC-1/NPP1, induce insulin resistance and glucose intolerance. *Diabetes.* 2005 Feb;54(2):367-72.
152. **Maddux BA, Goldfine ID.** Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes.* 2000 Jan;49(1):13-9.
153. **Xu CS, Chang CF, Yuan JY, Li WQ, Han HP, Yang KJ, Zhao LF, Li YC, Zhang HY, Rahman S, Zhang JB.** Expressed genes in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *World J Gastroenterol.* 2005 May 21;11(19):2932-40.
154. **Yano Y, Hayashi Y, Sano K, Nagano H, Nakaji M, Seo Y, Ninomiya T, Yoon S, Yokozaki H, Kasuga M.** Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-1 (E-NPP1/PC-1) and -3 (E-NPP3/CD203c/PD-Ibeta/B10/gp130(RB13-6)) in inflammatory and neoplastic bile duct diseases. *Cancer Lett.* 2004 Apr 30;207(2):139-47.
155. **Yano Y, Hayashi Y, Sano K, Shinmaru H, Kuroda Y, Yokozaki H, Yoon S, Kasuga M.** Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-3 (E-NPP3/CD203c/PD-I beta/B10/gp130RB13-6) in human colon carcinoma. *Int J Mol Med.* 2003 Nov;12(5):763-6.
156. **Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, Aoki J, Hama K, Okudaira S, Tanaka M, Tomiya T, Yanase M, Tejima K, Nishikawa T, Arai M, Arai H, Omata M, Fujiwara K, Yatomi Y.** Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol.* 2007 Jul;41(6):616-23.
157. **Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN.** Acid phosphatases. *Mol Pathol.* 2002 Apr;55(2):65-72.
158. **Moss DW.** Multiple forms of acid and alkaline phosphatases: genetics, expression and tissue-specific modification. *Clin Chim Acta.* 1986 Dec 15;161(2):123-35.

159. **MacKintosh C.** *Assay and purification of protein (serine/threonine) phosphatases.* In: Hardie DG, editor. *Protein Phosphorylation: A Practical Approach.* Oxford, UK: IRL Press; 1993. p. 34 (pp197–230).
160. **Gee KR, Sun WC, Bhalgat MK, Upson RH, Klaubert DH, Latham KA, Haugland RP.** Fluorogenic substrates based on fluorinated umbelliferones for continuous assays of phosphatases and beta-galactosidases. *Anal Biochem.* 1999 Aug 15;273(1):41-8.
161. **Parinaud J, Blanc M, Fournie A, Bierme S, Grandjean H.** A fluorimetric enzyme-linked immunoassay (FEIA) for measurement of anti-D antibodies. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1984;26(5):299-302.
162. **Kaunitz JD, Yamaguchi DT.** TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *J Cell Biochem.* 2008 Oct 15;105(3):655-62.
163. **Sowa NA, Vadakkan KI, Zylka MJ.** Recombinant mouse PAP has pH-dependent ectonucleotidase activity and acts through A(1)-adenosine receptors to mediate antinociception. *PLoS ONE.* 2009;4(1):e4248.
164. **Hunsucker SA, Mitchell BS, Spychala J.** The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & therapeutics.* 2005 Jul;107(1):1-30.
165. **Reis JL.** *Bull Soc Chim biol, Paris.* 1934;16.
166. **Reis JL.** *Enzymologia.* 1937;2(110, 183).
167. **Misumi Y, Ogata S, Hirose S, Ikehara Y.** Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycopospholipid. *The Journal of biological chemistry.* 1990 Feb 5;265(4):2178-83.
168. **Misumi Y, Ogata S, Ohkubo K, Hirose S, Ikehara Y.** Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *Eur J Biochem.* 1990 Aug 17;191(3):563-9.
169. **Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S.** CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *The Journal of experimental medicine.* 1995 Nov 1;182(5):1603-8.
170. **Strater N.** Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic signalling.* 2006 Jun;2(2):343-50.
171. **Zimmermann H.** 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 1992;285:345-65.
172. **Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF.** Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic signalling.* 2006 Jun;2(2):351-60.
173. **Castrop H, Huang Y, Hashimoto S, Mizel D, Hansen P, Theilig F, Bachmann S, Deng C, Briggs J, Schnermann J.** Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004 Sep;114(5):634-42.
174. **Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J, Cotta RJ, Ibla JC, Robson SC, Colgan SP.** Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood.* 2004 Dec 15;104(13):3986-92.
175. **Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zerneck A, Flogel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UK, Smith ML, Sévigny J, Gear A, Weber AA, Molojavyi A, Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Godecke A, Schrader J.** Targeted disruption of

- cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circulation research*. 2004 Oct 15;95(8):814-21.
176. **Hart ML, Much C, Gorzolla IC, Schittenhelm J, Kloor D, Stahl GL, Eltzschig HK.** Extracellular adenosine production by ecto-5'-nucleotidase protects during murine hepatic ischemic preconditioning. *Gastroenterology*. 2008 Nov;135(5):1739-50 e3.
177. **Okawa A, Nakamura I, Goto S, Moriya H, Nakamura Y, Ikegawa S.** Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat Genet*. 1998 Jul;19(3):271-3.
178. **van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH, Jonkers J.** Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol*. 2006 Jul;26(13):5015-22.
179. **Ferry G, Giganti A, Coge F, Bertaux F, Thiam K, Boutin JA.** Functional invalidation of the autotaxin gene by a single amino acid mutation in mouse is lethal. *FEBS Lett*. 2007 Jul 24;581(18):3572-8.
180. **Narisawa S, Frohlander N, Millan JL.** Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn*. 1997 Mar;208(3):432-46.
181. **Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Cox TM.** Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development*. 1996 Oct;122(10):3151-62.
182. **Pospisilova H, Frebort I.** Aminohydrolases acting on adenine, adenosine and their derivatives. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2007 Jun;151(1):3-10.
183. **Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R.** CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 5;102(27):9583-8.
184. **Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, Camaioni E.** Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev*. 2001 Mar;21(2):105-28.
185. **Schrader WP, West CA.** Adenosine deaminase complexing proteins are localized in exocrine glands of the rabbit. *J Histochem Cytochem*. 1985 Jun;33(6):508-14.
186. **Dinjens WN, ten Kate J, Wijnen JT, van der Linden EP, Beek CJ, Lenders MH, Khan PM, Bosman FT.** Distribution of adenosine deaminase-complexing protein in murine tissues. *The Journal of biological chemistry*. 1989 Nov 15;264(32):19215-20.
187. **Herrera C, Casado V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C, Franco R.** Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Molecular pharmacology*. 2001 Jan;59(1):127-34.
188. **Ciruela F, Saura C, Canela EI, Mallol J, Lluís C, Franco R.** Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett*. 1996 Feb 19;380(3):219-23.

189. **Donaldson SH, Picher M, Boucher RC.** Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Feb;26(2):209-15.
190. **Boissan M, Dabernat S, Peuchant E, Schlattner U, Lascu I, Lacombe ML.** The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. *Mol Cell Biochem.* 2009 Apr 22.
191. **Urano T, Furukawa K, Shiku H.** Expression of nm23/NDP kinase proteins on the cell surface. *Oncogene.* 1993 May;8(5):1371-6.
192. **Willems R, Van Bockstaele DR, Lardon F, Lenjou M, Nijs G, Snoeck HW, Berneman ZN, Slegers H.** Decrease in nucleoside diphosphate kinase (NDPK/nm23) expression during hematopoietic maturation. *The Journal of biological chemistry.* 1998 May 29;273(22):13663-8.
193. **Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK.** Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *The Journal of biological chemistry.* 2000 Oct 6;275(40):31061-8.
194. **Novikoff AB, Hecht L, Podber E, Ryan J.** Phosphatases of rat liver. I. The dephosphorylation of adenosinetriphosphate. *The Journal of biological chemistry.* 1952 Jan;194(1):153-70.
195. **Novikoff AB, Podber E, Ryan J.** Phosphatases of rat liver. II. Adenosinetriphosphate dephosphorylation in regenerating liver. *The Journal of biological chemistry.* 1953 Aug;203(2):665-71.
196. **Knowles AF.** The rat liver ecto-ATPase/C-CAM cDNA detects induction of carcinoembryonic antigen but not the mercurial-insensitive ecto-ATPase in human hepatoma Li-7A cells treated by epidermal growth factor and cholera toxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Feb 15;207(2):529-35.
197. **Sévigny J, Robson SC, Waelkens E, Csizmadia E, Smith RN, Lemmens R.** Identification and characterization of a novel hepatic canalicular ATP diphosphohydrolase. *Journal of Biological Chemistry.* 2000 Feb;275(8):5640-7.
198. **Dranoff JA, Ogawa M, Kruglov EA, Gaca MD, Sévigny J, Robson SC, Wells RG.** Expression of P2Y nucleotide receptors and ectonucleotidases in quiescent and activated rat hepatic stellate cells. *American journal of physiology.* 2004 Aug;287(2):G417-24.
199. **Caldwell CC, Davis MD, Knowles AF.** Ectonucleotidases of avian gizzard smooth muscle and liver plasma membranes: a comparative study. *Arch Biochem Biophys.* 1999 Feb 1;362(1):46-58.
200. **Knowles AF, Nagy AK, Strobel RS, Wu-Weis M.** Purification, characterization, cloning, and expression of the chicken liver ecto-ATP-diphosphohydrolase. *Eur J Biochem.* 2002 May;269(9):2373-82.
201. **Roman RM, Fitz JG.** Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function. *Gastroenterology.* 1999 Apr;116(4):964-79.
202. **Keppens S, Vandekerckhove A, De Wulf H.** Characterization of purinoceptors present on human liver plasma membranes. *FEBS Lett.* 1989 May 8;248(1-2):137-40.
203. **Dranoff JA, Nathanson MH.** It's swell to have ATP in the liver. *J Hepatol.* 2000 Aug;33(2):323-5.

204. **Lemmens R, Vanduffel L, Kittel A, Beaudoin AR, Benrezzak O, Sévigny J.** Distribution, cloning, and characterization of porcine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1. *European Journal of Biochemistry.* 2000 Jul;267(13):4106-14.
205. **Essner E, Novikoff AB, Masek B.** Adenosinetriphosphatase and 5-nucleotidase activities in the plasma membrane of liver cells as revealed by electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol.* 1958 Nov 25;4(6):711-6.
206. **Lin SH, Guidotti G.** 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. *The Journal of biological chemistry.* 1989 Aug 25;264(24):14408-14.
207. **Leclerc MC, Grondin G, Gendron FP, Sévigny J, Beaudoin AR.** Identification, characterization, and immunolocalization of a nucleoside triphosphate diphosphohydrolase in pig liver. *Archives of Biochemistry & Biophysics.* 2000 May;377(2):372-8.
208. **Novikoff AB, Hausman DH, Podber E.** The localization of adenosine triphosphatase in liver: in situ staining and cell fractionation studies. *J Histochem Cytochem.* 1958 Jan;6(1):61-71.
209. **Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sévigny J.** Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling.* 2005;1(2):193-204.
210. **Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM.** A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem.* 1988 Jun;171(2):266-70.
211. **Kipp H, Arias IM.** Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *The Journal of biological chemistry.* 2000 May 26;275(21):15917-25.
212. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
213. **Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G.** A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol.* 1970 Jan 14;47(1):69-85.
214. **Braun N, Sévigny J, Mishra SK, Robson SC, Barth SW, Gerstberger R, Hammer K, Zimmermann H.** Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 2003 Apr;17(7):1355-64.
215. **Beaudoin AR, Sévigny J, Grondin G, Daoud S, Lévesque FP.** Purification, characterization, and localization of two ATP diphosphohydrolase isoforms in bovine heart. *American journal of physiology.* 1997;273(2 Pt 2):H673-H81.
216. **Knowles AF, Nagy AK.** Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. *Eur J Biochem.* 1999 Jun;262(2):349-57.
217. **Knowles AF, Li C.** Molecular cloning and characterization of expressed human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 (E-NTPDase 8) and its soluble extracellular domain. *Biochemistry.* 2006 Jun 13;45(23):7323-33.
218. **Goding JW, Terkeltaub R, Maurice M, Deterre P, Sali A, Belli SI.** Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunol Rev.* 1998 Feb;161:11-26.

219. **Scott LJ, Delautier D, Meerson NR, Trugnan G, Goding JW, Maurice M.** Biochemical and molecular identification of distinct forms of alkaline phosphodiesterase I expressed on the apical and basolateral plasma membrane surfaces of rat hepatocytes. *Hepatology* (Baltimore, Md. 1997 Apr;25(4):995-1002.
220. **Bollen M, Gijbbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Stefan C.** Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000;35(6):393-432.
221. **Dixon CJ, Woods NM, Webb TE, Green AK.** Evidence that rat hepatocytes co-express functional P2Y1 and P2Y2 receptors. *British journal of pharmacology.* 2000 Feb;129(4):764-70.
222. **Dranoff JA, Masyuk AI, Kruglov EA, LaRusso NF, Nathanson MH.** Polarized expression and function of P2Y ATP receptors in rat bile duct epithelia. *American journal of physiology.* 2001 Oct;281(4):G1059-67.
223. **Fumagalli M, Trincavelli L, Lecca D, Martini C, Ciana P, Abbracchio MP.** Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y(13) receptor. *Biochem Pharmacol.* 2004 Jul 1;68(1):113-24.
224. **Haussinger D, Stehle T, Gerok W.** Actions of extracellular UTP and ATP in perfused rat liver. A comparative study. *Eur J Biochem.* 1987 Aug 17;167(1):65-71.
225. **Keppens S, Vandekerckhove A, De Wulf H.** Extracellular ATP and UTP exert similar effects on rat isolated hepatocytes. *British journal of pharmacology.* 1992 Feb;105(2):475-9.
226. **Schlosser SF, Burgstahler AD, Nathanson MH.** Isolated rat hepatocytes can signal to other hepatocytes and bile duct cells by release of nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9948-53.
227. **Schlenker T, Romac JM, Sharara AI, Roman RM, Kim SJ, LaRusso N, Liddle RA, Fitz JG.** Regulation of biliary secretion through apical purinergic receptors in cultured rat cholangiocytes. *Am J Physiol.* 1997 Nov;273(5 Pt 1):G1108-17.
228. **Roman RM, Feranchak AP, Salter KD, Wang Y, Fitz JG.** Endogenous ATP release regulates Cl⁻ secretion in cultured human and rat biliary epithelial cells. *Am J Physiol.* 1999 Jun;276(6 Pt 1):G1391-400.
229. **Schmid TC, Loffing J, Le Hir M, Kaissling B.** Distribution of ecto-5'-nucleotidase in the rat liver: effect of anaemia. *Histochemistry.* 1994 Jul;101(6):439-47.
230. **Ben-Ari Z, Pappo O, Sulkes J, Cheporko Y, Vidne BA, Hochhauser E.** Effect of adenosine A2A receptor agonist (CGS) on ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver. *Apoptosis.* 2005 Oct;10(5):955-62.
231. **Odashima M, Otaka M, Jin M, Komatsu K, Wada I, Matsuhashi T, Horikawa Y, Hatakeyama N, Oyake J, Ohba R, Linden J, Watanabe S.** Selective A2A adenosine agonist ATL-146e attenuates acute lethal liver injury in mice. *J Gastroenterol.* 2005 May;40(5):526-9.
232. **Che M, Nishida T, Gatmaitan Z, Arias IM.** A nucleoside transporter is functionally linked to ectonucleotidases in rat liver canalicular membrane. *Journal of Biological Chemistry.* 1992;267(14):9684-8.
233. **Griffiths M, Beaumont N, Yao SY, Sundaram M, Boumah CE, Davies A, Kwong FY, Coe I, Cass CE, Young JD, Baldwin SA.** Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med.* 1997 Jan;3(1):89-93.

234. **Chari RS, Schutz SM, Haebig JE, Shimokura GH, Cotton PB, Fitz JG, Meyers WC.** Adenosine nucleotides in bile. *American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology.* 1996;33(2):G 246 - G 52.
235. **Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H.** Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem.* 1999 May;262(1):102-7.
236. **Naito Y, Lowenstein JM.** 5'-Nucleotidase from rat heart membranes. Inhibition by adenine nucleotides and related compounds. *Biochem J.* 1985 Mar 15;226(3):645-51.
237. **Bachmann S, Ramasubbu K.** Immunohistochemical colocalization of the alpha-subunit of neutrophil NADPH oxidase and ecto-5'-nucleotidase in kidney and liver. *Kidney Int.* 1997 Feb;51(2):479-82.
238. **Song J, Bosch KS, Tigchelaar W, Van Den Munckhof RJ, Schellens JP, Van Noorden CJ, Frederiks WM.** Demonstration of 5'-nucleotidase activity in unfixed cryostat sections of rat liver using a combined light- and electron-microscope procedure. *Histochem J.* 1995 Nov;27(11):914-22.
239. **Braun N, Zhu Y, Kriegstein J, Culmsee C, Zimmermann H.** Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J Neurosci.* 1998 Jul 1;18(13):4891-900.
240. **Lazarowski ER, Tarran R, Grubb BR, van Heusden CA, Okada S, Boucher RC.** Nucleotide release provides a mechanism for airway surface liquid homeostasis. *The Journal of biological chemistry.* 2004 Aug 27;279(35):36855-64.
241. **Levitt B, Head RJ, Westfall DP.** High-pressure liquid chromatographic-fluorometric detection of adenosine and adenine nucleotides: application to endogenous content and electrically induced release of adenylyl purines in guinea pig vas deferens. *Anal Biochem.* 1984 Feb;137(1):93-100.
242. **Masyuk AI, Gradilone SA, Banales JM, Huang BQ, Masyuk TV, Lee SO, Splinter PL, Stroope AJ, Larusso NF.** Cholangiocyte primary cilia are chemosensory organelles that detect biliary nucleotides via P2Y12 purinergic receptors. *American journal of physiology.* 2008 Oct;295(4):G725-34.
243. **Wen LT, Knowles AF.** Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor. *British journal of pharmacology.* 2003 Nov;140(6):1009-18.
244. **Zoetewij JP, van de Water B, de Bont HJ, Nagelkerke JF.** The role of a purinergic P2z receptor in calcium-dependent cell killing of isolated rat hepatocytes by extracellular adenosine triphosphate. *Hepatology.* 1996 Apr;23(4):858-65.
245. **Allard C, De Lamirande G, Cantero A.** Enzymes and cytological studies in rat hepatoma transplants, primary liver tumors, and in liver following azo dye feeding or partial hepatectomy. *Cancer Res.* 1957 Oct;17(9):862-79.
246. **Karasaki S.** Subcellular localization of surface adenosine triphosphatase activity in preneoplastic liver parenchyma. *Cancer Res.* 1972 Aug;32(8):1703-12.
247. **Blitzer BL, Boyer JL.** Cytochemical localization of Na⁺, K⁺-ATPase in the rat hepatocyte. *J Clin Invest.* 1978 Nov;62(5):1104-8.
248. **Lin SH.** The rat liver plasma membrane high affinity (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase is not a calcium pump. Comparison with ATP-dependent calcium transporter. *The Journal of biological chemistry.* 1985 Sep 15;260(20):10976-80.

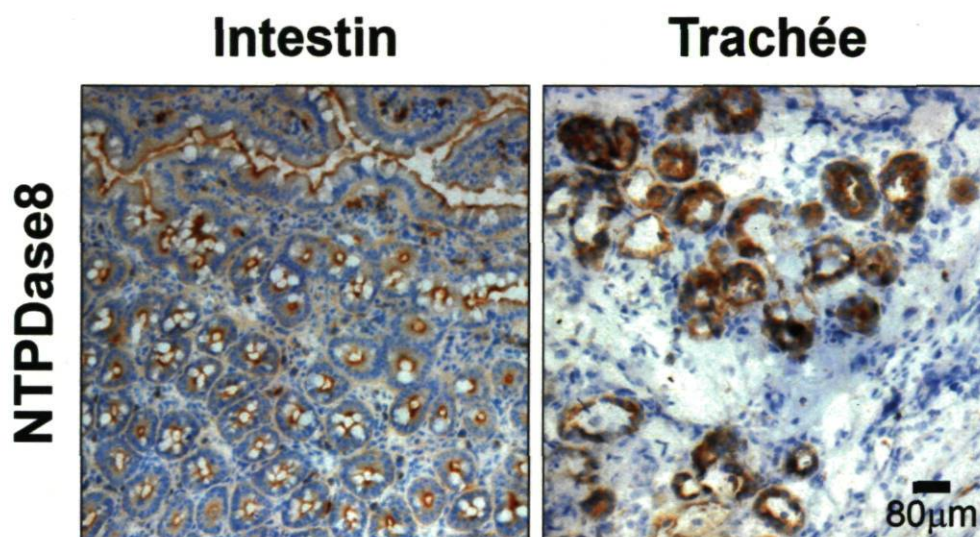
249. **Kipp H, Arias IM.** Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters. *Seminars in liver disease.* 2000;20(3):339-51.
250. **Kipp H, Arias IM.** Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:595-608.
251. **Zoetewij JP, van de Water B, de Bont HJ, Mulder GJ, Nagelkerke JF.** Calcium-induced cytotoxicity in hepatocytes after exposure to extracellular ATP is dependent on inorganic phosphate. Effects on mitochondrial calcium. *The Journal of biological chemistry.* 1993 Feb 15;268(5):3384-8.
252. **Crumm S, Cofan M, Juskeviciute E, Hoek JB.** Adenine nucleotide changes in the remnant liver: An early signal for regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2008 Sep;48(3):898-908.
253. **Gonzales E, Julien B, Serriere-Lanneau V, Nicou A, Doignon I, Lagoudakis L, Garcin I, Azoulay D, Duclos-Vallee JC, Castaing D, Samuel D, Hernandez-Garcia A, Awad SS, Combettes L, Thevananther S, Tordjmann T.** ATP release after partial hepatectomy regulates liver regeneration in the rat. *J Hepatol.* 2009 Oct 24.
254. **Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G.** Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells.* 2006 Dec;24(12):2840-50.
255. **Jodon de Villeroy V, Brouty-Boye D.** Establishment and characterization of atypical fibroblasts from human adult liver contributing to hepatocyte cord-like arrangement. *Cell Biol Int.* 2008 Jun;32(6):605-14.

Annexes

Annexe 1

Je présente, ici, des résultats non publiés d'expériences d'immunolocalisation de la NTPDase8 (figure C1) et l'ecto-5'-nucléotidase (figure C2).

Figure C1: Expression de la NTPDase8 dans l'intestin de rat et la trachée humaine

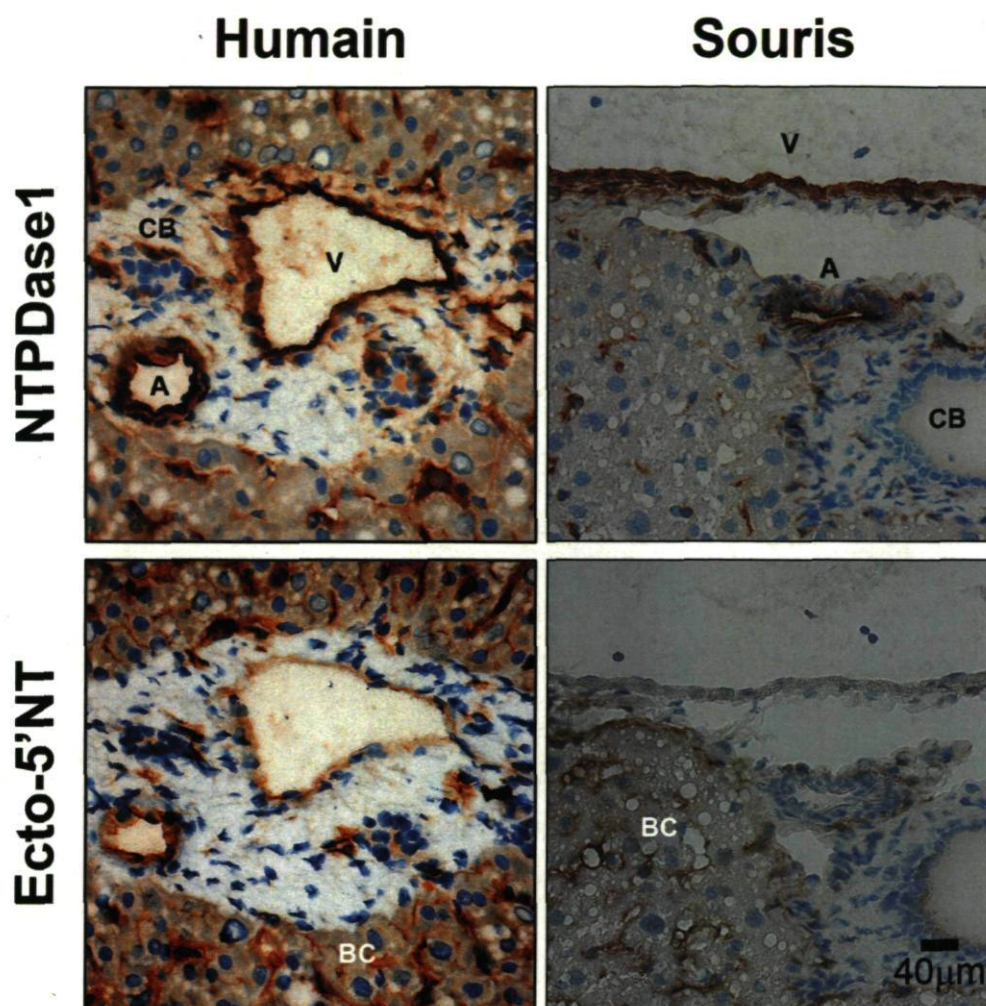


Le patron d'expression de l'ecto-nucléotidase NTPDase8 a été déterminé par immunohistochimie sur des coupes d'intestin de rat (gauche) et de trachée humaine (droite).

Intestin) Des signaux positifs pour l'expression de la NTPDase8 sont détectés au niveau de l'épithélium glandulaire et de cellules circulantes présentes dans la sous-muqueuse intestinale.

Trachée) Des signaux positifs pour l'expression de la NTPDase8 sont détectés au niveau de l'épithélium glandulaire respiratoire. *Échelle 80 μm.*

Figure C2: Expression de la NTPDase1 et l'ecto-5'-nucléotidase dans le foie chez l'humain et la souris



Le patron d'expression des ecto-nucléotidases NTPDase1 et ecto-5'-nucléotidase a été déterminé par immunohistochimie sur des coupes sériées de foie humain (colonne gauche) et de souris (colonne droite). Sur chaque image, les éléments classiques d'une triade hépatique sont représentés: une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte hépatique et un canal biliaire.

NTPDase1) Des signaux positifs pour l'expression de la NTPDase1 sont détectés au niveau de l'endothélium vasculaire (artère et veine), des capillaires sinusoidaux et des cellules de Kupffer dans les deux espèces.

Ecto-5'-NT) Des signaux positifs pour l'expression de l'ecto-5'-nucléotidase sont observés au niveau des hépatocytes (domaines membranaires canaliculaire et basolatéral), de cellules présentes dans l'espace intersinusoidal chez les deux espèces, et de l'endothélium vasculaire uniquement chez l'humain. (A) Artère, (V) Veine, (CB) Canal Biliaire, (BC), Canalicule Biliaire. *Échelle 40 μm.*

Annexe 2

J'ai énuméré ici, par ordre chronologique, une liste de publications et présentations auxquelles j'ai participé:

Publications

1. **Expression of NTPDase1 and NTPDase2 in murine kidney: relevance to regulation of P2 receptor signaling.**
Kishore BK, Isaac J, Fausther M, Tripp SR, Shi H, Gill PS, Braun N, Zimmermann H, Sévigny J, Robson SC.
Am J Physiol Renal Physiol. 2005 May; 288(5):F1032-43. Epub 2005 Jan 4.
2. **Characterization of a monoclonal antibody as the first specific inhibitor of human NTP diphosphohydrolase-3: partial characterization of the inhibitory epitope and potential applications.**
Munkonda MN, Pelletier J, Ivanenkov VV, Fausther M, Tremblay A, Künzli B, Kirley TL, Sévigny J.
FEBS J. 2009 Jan;276(2):479-96.
3. **Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract.**
Martín-Satué M, Lavoie EG, Pelletier J, Fausther M, Csizmadia E, Guckelberger O, Robson SC, Sévigny J.
Histochem Cell Biol. 2009 May; 131(5):615-28. Epub 2009 Jan 6.
4. **Endothelial P2Y₂ receptor regulates LPS-induced neutrophil migration in vitro.**
Kukulski F, Ben Yebdri F, Bahrami F, Fausther M, Tremblay A, Sévigny J.
Mol Immunol. 2009, sous presse. DOI 10.1016/j.molimm.2009.11.020
5. **Ecto-5'-nucleotidase is abundantly expressed in male murine reproductive tract.**
Martín-Satué M, Lavoie EG, Fausther M, Lecka J, Aliagas E, Sévigny J.
Soumis à Histochem Cell Biol. 2009.
6. **Remodeling of purinergic signaling by cystic fibrosis: opposite responses of NTPDase1 and NTPDase3.**
Fausther M, Pelletier J, Ribeiro CM, Sévigny J, Picher M.
Soumis à JBC 2009.

Présentations (par affiche)

*présentateur

1. **Fausther M***, Lecka J, Zimmermann H & Sévigny J. (June 29-July 2 2008). Co-expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 with NTPDases in the liver distinctly regulates adenosine formation. Purines 2008, Copenhagen, Denmark. *Purinergic Signalling* 4: S105.
2. Kukulski F*, Ben Yebdri F, **Fausther M**, Tremblay A & Sévigny J. (June 29-July 2 2008). The endothelial P2Y2 receptor mediates LPS-induced neutrophil transendothelial migration. Purines 2008, Copenhagen, Denmark. *Purinergic Signalling* 4: S30.
3. Kukulski F*, Ben Yebdri F, **Fausther M**, Tremblay A & Sévigny J. (June 29-July 2 2008). P2 receptor(s) mediate IL-8 synthesis and release by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) stimulated with TLR3 and TLR4 agonists. Purines 2008, Copenhagen, Denmark. *Purinergic Signalling* 4: S185.
4. Lavoie EG*, **Fausther M** & Sévigny J. (June 29-July 2 2008). Regulation of insulin secretion by NTPDase3. Purines 2008, Copenhagen, Denmark. *Purinergic Signalling* 4: S50.
5. Lecka J, **Fausther M*** & Sévigny J. (June 29-July 2 2008). Thienopyridines as specific inhibitors of NTPDase1. Purines 2008, Copenhagen, Denmark. *Purinergic Signalling* 4: S107.
6. Lecka J, Munkonda MN, **Fausther M**, Lavoie EG, Kauffenstein G, Lévesque SA, Kogan I, Pelletier J, Tremblay A, Singh Rana M, Ivanenkov V, Kirley T, Fischer B & Sévigny J*. (June 29-July 2 2008). Specific NTPDases' inhibitors. Purines 2008, Copenhagen, Denmark. *Purinergic Signalling* 4: S108.
7. Martín-Satué M, Lavoie EG*, Pelletier J, **Fausther M**, Czismadia E, Guckelberger O, Robson SC & Sévigny J. (June 29-July 2 2008). Localization of the ecto-NTPDases in the murine reproductive tract. Purines 2008, Copenhagen, Denmark. *Purinergic Signalling* 4: S110.
8. Munkonda MN, **Fausther M***, Ivanenkov V, Pelletier J, Tremblay A, Künzli B, Kirley T & Sévigny J. (June 29-July 2 2008). Generation and characterization of a monoclonal antibody as the first specific inhibitor of human NTPDase3. Purines 2008, Copenhagen, Denmark. *Purinergic Signalling* 4: S110.
9. Lavoie EG*, **Fausther M** & Sévigny J. (May 27 2008). La nucléoside triphosphate diphosphohydrolase-3 régule la sécrétion d'insuline. 10^e Journée annuelle de la recherche de la Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC. Cahier des résumés p. 59.
10. Martín-Satué M*, Lavoie EG, **Fausther M**, Pelletier J & Sévigny J. (May 27 2008). Expression des nucléosides triphosphates diphosphohydrolases dans le système reproducteur de la souris. 10^e Journée annuelle de la recherche de la Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC. Cahier des résumés p. 59.

11. **Fausther M***, Lecka J & Sévigny J. (2007). Régulation fine de la signalisation des nucléotides extracellulaires par les NTPDases et l'ecto-5'-nucléotidase dans le foie. 6^e journée scientifique du CRRI. Manoir Montmorency, Québec, Qc. Cahier des résumés p. 35.
12. Lavoie EG*, **Fausther M** & Sévigny J. (2007). La NTPDase3 régule la sécrétion d'insuline. 6^e journée scientifique du CRRI. Manoir Montmorency, Québec, Qc. Cahier des résumés p. 9
13. Kukulski F*, Ben Yebdri F, **Fausther M**, Tremblay A & Sévigny J.(2007). Extracellular nucleotides regulate inflammatory neutrophil migration. 6^e journée scientifique du CRRI. Manoir Montmorency, Québec, Qc. Cahier des résumés p. 38.
14. Lavoie EG*, **Fausther M**, Pelletier J & Sévigny J. (2007). Localisation de la NTPDases3 dans les glandes associées au système digestif de la souris. 9^e Journée annuelle de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Québec, Qc, Canada. Cahier des résumés p.139.
15. **Fausther M***, Lecka J, Kukulski F, Pelletier J, Lévesque SA, Zimmermann H., Dranoff J.A. & Sévigny J. (May 2006). Cloning and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. 8th ISAAN 2006, Ferrara, Italy, May 24-28 2006. Board #71 (poster session #6).
16. Sévigny J*, Ben Yebdri F, **Fausther M**, Kauffenstein G, Kukulski F, Lavoie EG, Lecka J, Lévesque SA, Munkonda MN & Pelletier J. 27 mai 2006. Co-ordinated regulation of P2-receptor signaling by membrane bound NTPDases. 8th Int. Symposium on adenosine and adenine nucleotides. Ferrara, Italy. *Purinergic Signalling* 2 (2): 53.
17. **Fausther M***, Lecka J, Kukulski F, Pelletier J, Lévesque SA, Zimmermann H, Dranoff JA & Sévigny J. (May 2006). Clonage et identification de l'ecto-ATPase majeure du foie comme la NTPDase8. 8^e journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Université Laval, Québec, Canada.
18. **Fausther M***, Lecka J, Pelletier J, Lévesque SA, Dranoff JA & Sévigny J. (May 2005). L'ecto-ATPase des canalicules hépatiques correspond à la nouvelle ecto-nucléotidase NTPDase8. 7^e journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Université Laval, Québec, Canada.
19. **Fausther M***, Lecka J, Pelletier J, Lévesque SA, Dranoff JA & Sévigny J. (May 2005) Identification of the long-known canalicular ecto-ATPase as the novel ecto-nucleotidase NTPDase8. Digestive Disease Week® 2005. Chicago, IL, May 14-19 2005. Board # M1435.
20. **Fausther M***, Pelletier J, Bigonnesse F & Sévigny J. (Juin 2004) Localisation et expression des NTPDases 1 et 2 dans le rein de souris. 6^e journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Université Laval, Québec, Canada.
21. **Fausther M*** & Cadrin M. (Mars 2002) Phosphorylation des kératines et expression de HSP70 dans les hépatocytes de souris intoxiquées à la griséofulvine.

Concours annuel d'affiches scientifiques de l'Université du Québec à Trois-Rivières. UQTR, Trois-Rivières, Québec, Canada.

22. **Fausther M*** & Cadrin M. (Décembre 2001) Keratin phosphorylation and HSP70 expression in griseofulvin-fed mice liver. 41st annual meeting of American Society for Cell Biology, Washington, DC, December 8-12 2001. Board # B284.