

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**PHARMACOLOGIE DES NUCLÉOTIDES EXTRACELLULAIRES ET DE LA
NTPDASE AU NIVEAU DES CIRCUITS MÉSENTÉRIQUES PRÉ ET
POSTCAPILLAIRES DE COBAYE**

par

MARTINE DUVAL

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade

de maître ès sciences (M. Sc.)

Décembre 2000

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES PUBLICATIONS	iv
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
RÉSUMÉ	x

INTRODUCTION..... 1

1.1 SYSTÈME CIRCULATOIRE	1
1.1.1 Vaisseaux sanguins	2
1.1.1.1 Structure	2
1.1.1.2 Cellules sanguines.....	4
1.1.1.3 Facteurs libérés de l'endothélium pouvant moduler le tonus vasculaire ..	9
1.1.1.4 Agents interférant avec l'activité vasodilatatrice de l'endothélium.....	13
1.1.1.5 La circulation mésentérique pré et postcapillaire.....	15
1.2 NUCLÉOTIDES EXTRACELLULAIRES	16
1.2.1 Les sources.....	16
1.2.2 Récepteurs purinergiques	19
1.2.2.1 Les purinocepteurs de type P1	19
1.2.2.2 Les purinocepteurs de type P2	19
1.2.3 Rôles physiologiques des nucléotides extracellulaires dans le système cardiovasculaires.....	25
1.2.4 Les ectonucléotidases.....	29
1.2.4.1 La NTPDase	30
1.2.4.2 Les inhibiteurs de la NTPDase.....	31
1.2.5 Considérations physiopathologiques.....	32

1.3 BUTS DE L'ÉTUDE	34
MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	36
2.1 ANIMAUX UTILISÉS	36
2.2 PRÉLÈVEMENT DU LIT MÉSENTÉRIQUE DE COBAYE	36
2.3 PERFUSION DU LIT MÉSENTÉRIQUE	37
2.4 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX.....	39
2.4.1 Évaluation de l'activité biologique des nucléotides.....	39
2.4.1.1 Rôle modulateur de la couche endothéliale dans l'effet relaxant des nucléotides.....	39
2.4.1.1.1 Traitement au CHAPS.....	39
2.4.1.1.2 Traitement au L-NAME.....	40
2.4.1.1.4 Réponse de la vascularisation mésentérique au NK-1 et au NaNP..	40
2.4.2 Évaluation de l'activité catalytique de la nucléoside triphosphate diphosphohydrolase.....	41
2.4.2.1 Collecte des échantillons biologiques	41
2.4.2.1.1 Infusion d'ATP.....	41
2.4.2.1.2 Traitement au BGO 136.....	42
2.4.2.2 Analyse des échantillons par HPLC.....	42
2.5 COMPOSÉS PHARMACOLOGIQUES UTILISÉS.....	43
2.6 PARAMÈTRES PHARMACOLOGIQUES.....	43
2.7 CALCUL ET ÉVALUATION STATISTIQUE DES DONNÉES	44
RÉSULTATS.....	46

3.1 EFFETS DES NUCLÉOTIDES ET D'UN ANALOGUE DE L'ATP SUR LE TONUS VASCULAIRE DES ARTÈRES ET DES VEINES MÉSENTÉRIQUE DE COBAYE	46
3.1.1 Étude des effets vasoactifs de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP dans le lit mésentérique de cobaye	46
3.1.2 Détermination de la participation de l'endothélium et du NO dans l'effet relaxant de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP au niveau de l'artère mésentérique de cobaye	47
3.1.3 Effet d'un analogue non hydrolysable de l'ATP.....	51
3.2 CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE L'ACTIVITÉ DE LA NUCLÉOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE	58
3.2.1 Contribution de l'endothélium dans l'activité hydrolytique de la NTPDase au niveau du lit mésentérique de cobaye	58
3.2.2 Inhibition de la NTPDase par un traitement au BGO 136	59
3.2.2.1 Prétraitement au BGO 136 1mM	64
3.2.2.2 Prétraitement au BGO 136 10mM	64
DISCUSSION	74
CONCLUSION.....	83
REMERCIEMENTS	85
BIBLIOGRAPHIE.....	86

LISTE DES PUBLICATIONS

1. **Duval, M** , Gendron, F.P., Beaudoin, A. R., Neugebauer, W. and D'Orléans-Juste, P. (2000) Pharmacological and biochemical characterization of adenine nucleotides and the NTPDase enzyme in the guinea-pig mesenteric vasculature. (en préparation)
2. **Duval, M.** and D'Orléans-Juste, P. (2000) ET-1 induces an ETA receptor dependent and L-NAME sensitive vasoconstriction in the isolated perfused guinea-pig kidney. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36** (5 Suppl 1) : S 241-243.
3. Bkaily, G. Shbaklo, H. Taoudi-Benchekroun, M. **Duval, M.** Jacques D. and D'Orléans-Juste, P. (2000) Nitric oxide relaxes the vascular smooth muscle independently of ET-1 and U46619 induced intracellular increase of calcium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36** (5 Suppl 1) : S 110-116.
4. Gendron, F. P., Halbfinger, E., Fisher, B., **Duval, M.**, D'Orléans-Juste, P. and Beaudoin, A.R. (2000) Novel NTPdiphosphohydrolase inhibitors : synthesis, biochemical and pharmacological characterization. *J. of Med. Chemistry.* **43** (11) : 2239-2247.
5. D'Orléans-Juste, P., **Duval, M.**, Berthiaume, N., Labonté, J., Coumoyer, G. and Plante, M. (2000) Mediators and modulators released by endothelins. *Handbook of Experimental Pharmacology.* (sous presse)

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Structure des différents vaisseaux sanguins.....	5
FIGURE 2 : Schématisation de la libération et du mécanisme d'action du NO, de la PGI₂ et du EDHF	12
FIGURE 3 : Structure chimique du CHAPS	13
FIGURE 4 : Structure chimique du L-NAME	14
FIGURE 5 : Structure chimique de l'ATP	17
FIGURE 6 : Signalisation intracellulaire des différents récepteurs purinergiques de type P2	24
FIGURE 7 : Mécanisme d'hydrolyse catalysé par la nucléoside triphosphate diphosphohydrolase	29
FIGURE 8 : Structure chimique du BGO 136.....	32
FIGURE 9: Modèle de perfusion du lit mésentérique de cobaye	38
FIGURE 10: Effet relaxant de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP au niveau de la vascularisation mésentérique artérielle et veineuse de cobaye	48
FIGURE 11: Démonstration de la réactivité post capillaire.....	50
FIGURE 12 : Courbes dose-réponse de l'ATP au niveau précapillaire en absence ou en présence d'un prétraitement au L-NAME ou au CHAPS	52
FIGURE 13 : Courbes dose-réponse de l'ADP au niveau précapillaire en absence ou en présence d'un prétraitement au L-NAME ou au CHAPS	53
FIGURE 14 : Courbes dose-réponse de l'AMP au niveau précapillaire en absence ou en présence d'un prétraitement au L-NAME ou au CHAPS	54

FIGURE 15 : Courbes comparatives des effets de l'ATP et du CTP au niveau de la vascularisation artérielle	55
FIGURE 16 : Courbes dose-réponse du CTP au niveau précapillaire en absence ou en présence d'un prétraitement au L-NAME ou au CHAPS	56
FIGURE 17 : Courbes comparatives entre l'ATP et le β,δ-MeATP au niveau de la vascularisation artérielle	57
FIGURE 18 : Concentration d'ATP, d'ADP et d'AMP au niveau de l'artère mésentérique en présence ou en absence d'endothélium	61
FIGURE 19 : Concentration d'ATP, d'ADP et d'AMP au niveau de la veine mésentérique en présence ou en absence d'endothélium	63
FIGURE 20 : Concentration d'ATP, d'ADP et d'AMP au niveau de l'artère mésentérique en présence ou en absence d'un prétraitement au BGO 136 1mM	67
FIGURE 21 : Concentration d'ATP, d'ADP et d'AMP au niveau de la veine mésentérique en présence ou en absence d'un prétraitement au BGO 136 1mM	69
FIGURE 22 : Concentration d'ATP, d'ADP et d'AMP au niveau de l'artère mésentérique en présence ou en absence d'un prétraitement au BGO 10mM.....	71
FIGURE 23 : Concentration d'ATP, d'ADP et d'AMP au niveau de l'artère mésentérique en présence ou en absence d'un prétraitement au BGO 10mM.....	73

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Classification des purinocepteurs de type P1	20
TABLEAU 2: Classification des purinocepteurs de type P2X	21
TABLEAU 3: Classification des purinocepteurs de type P2Y	23
TABLEAU 4: Liste des composés utilisés.....	45
TABLEAU 5: Résumé qualitatif des quantités de nucléotides déterminées par HPLC...75	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	adénylate cyclase
ADP	adénosine 5'-diphosphate
ADPase	adénosine diphosphatase
AMP	adénosine 5'-monophosphate
AMPc	adénosine 3'5'-monophosphate
ATP	adénosine 5'-triphosphate
ATPase	adénosine triphosphatase
BK	bradykinine
BGO 136	acide 1-hydroxynaphthlène-3,6-disulfonique
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propansulfonate
CTP	cytidine 5'-triphosphate
E	enzyme
ECE	enzyme de conversion de l'endothéline
EDHF	facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
GTP	guanosine 5'-triphosphate
HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
IP₃	inositol 1, 4, 5-triphosphate
ITP	inositol 5'-triphosphate
K_m	constante de Michaelis-Menten
K_i	constante d'inhibition
L-NAME	N^G-nitro-L-arginine méthyl ester

M	molaire
β, δ-MeATP	adénosine 5'-(β, δ-méthylène)-triphosphate
μL	microlitre
μM	micromolaire
mM	millimolaire
min	minute
NA	noradrénaline
NaNP	nitroprussiate de sodium
NTPDase	nucléoside triphosphate diphosphohydrolase
pmol	picomole
PIP₂	phosphatidyl inositol biphosphate
PKC	protéine kinase C
PLA₂	phospholipase A₂
PLC	phospholipase C
[Sar⁹,Met(O₂)¹¹]SP	agoniste NK-1
UTP	uridine 5'-triphosphate

**PHARMACOLOGIE DES NUCLÉOTIDES EXTRACELLULAIRES ET DE LA
NTPDASE AU NIVEAU DES CIRCUITS MÉSENTÉRIQUE PRÉ ET
POSTCAPILLAIRES DE COBAYE**

Par

Martine Duval

**Mémoire présenté au département de pharmacologie en vue de l'obtention du grade de
maître ès science (M. Sc.), Faculté de médecine, Université de Sherbrooke.**

RÉSUMÉ

La présente étude avait comme buts principaux de déterminer l'action vasoactive de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP au niveau de la vascularisation méésentérique pré et postcapillaires de cobaye, ainsi que de vérifier la modulation de cet effet par l'endothélium. L'ATP est rapidement métabolisé en adénosine par l'action de deux enzymes soient, la nucléoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) et la 5'-nucléotidase. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la NTPDase qui hydrolyse de façon séquentielle les liens δ et β des groupements phosphates de l'ATP. Nos résultats ont démontré que les nucléotides étudiés ont un effet relaxant tant au niveau de la vascularisation précapillaire que postcapillaire. Cependant, cet effet était beaucoup plus faible du côté veineux. Nous avons également identifié que l'effet relaxant induit par l'ATP, l'ADP et l'AMP extracellulaires, était dépendant de l'endothélium. Nos résultats suggèrent l'implication de la prostacycline, de l'oxyde nitrique et de l'EDHF dans le mécanisme de vasodilatation induit par ces purines. Par chromatographie en phase liquide à haute performance nous avons mis en évidence la présence et l'efficacité d'une NTPDase au niveau de la vascularisation méésentérique artérielle et veineuse de cobaye. Nos résultats suggèrent que les circuits vasculaires précapillaires et postcapillaires sont impliqués de façon qualitativement différentes dans le métabolisme de l'ATP. Nos résultats démontrent aussi un rôle significatif de l'endothélium et de la NTPDase dans la production d'ADP et d'AMP suite à l'administration exogène d'ATP.

INTRODUCTION

1.1 SYSTÈME CIRCULATOIRE

Le système circulatoire est composé de deux autres systèmes soient; le système cardiovasculaire et le système lymphatique. Le système cardiovasculaire comprend quant à lui, le cœur, les vaisseaux sanguins et le sang. Ce système constitue donc le mode principal de transport de l'oxygène, du gaz carbonique, des nutriments et des produits du catabolisme des cellules. Il transporte aussi des cellules immunitaires, des hormones et d'autres substances importantes tel que les facteurs de la coagulation (STEVENS et LOWE 1992).

Les nucléotides extracellulaires jouent un rôle important dans l'hémostase et dans le système cardiovasculaire en général (DUBYAK et EL-MOATASSIM, 1993). À notre connaissance, il n'y a pas d'études comparant les influences des nucléotides au niveau des circuits vasculaires intacts au niveau pré et postcapillaires. Nous étudierons donc dans la présente étude, les effets des nucléotides extracellulaires et l'activité de la NTPDase dans un modèle perfusé de lit mésentérique artériel et veineux de cobaye que

nous avons antérieurement développé dans notre laboratoire (BERTHIAUME et al, 1995).

1.1.1 Vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins se divisent en trois catégories : les artères, les capillaires et les veines. Lors d'une contraction cardiaque, le sang est chassé du cœur pour se rendre dans les grosses artères via un passage ventriculaire. Ensuite, le sang parcourt les ramifications des artères, jusqu'aux plus petites, les artérioles. Le sang aboutit ainsi dans les lits capillaires des organes et des tissus. À sa sortie des capillaires, le sang emprunte les veinules, les veines et finalement les grosses veines qui convergent au cœur. La pression du sang veineux étant basse, de nombreuses veines sont dotées de valvules qui empêchent le sang de refluer et aident à diriger le sang vers le cœur. Les artères et les veines servent simplement de conduits pour le sang. Seuls les capillaires sont en contact étroit avec les cellules. Leurs parois extrêmement fines permettent les échanges entre le sang et le liquide interstitiel dans lequel baignent les cellules. Ces échanges fournissent aux cellules les nutriments et l'oxygène nécessaire à leur physiologie normale (MARIEB, 1993).

1.1.1.1 Structure

Les parois des artères et des veines sont composées de trois tuniques (figure 1) entourant un espace rempli de sang, la lumière. L'intima ou tunique interne est

composée d'un endothélium qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux. L'arrangement des cellules endothéliales constitue une surface lisse qui réduit au minimum la friction entre le sang et la surface interne des vaisseaux. Cependant, il est maintenant clair que l'endothélium est beaucoup plus qu'une simple barrière entre le sang et le muscle lisse vasculaire. L'endothélium a la capacité de libérer plusieurs substances vasoactives qui viennent agir au niveau du muscle lisse vasculaire (LA et REID, 1995; HASSÉSIAN et al, 1993 et SHEPHERD et al, 1991) . Dans les vaisseaux dont le diamètre est supérieur à 1 mm, l'endothélium repose sur une couche sous-endothéliale faite de tissu conjonctif lâche (MARIEB, 1993).

La tunique moyenne (media) est composée principalement de cellules musculaires lisses. Cette couche est très développée au niveau artériel, elle permet notamment la distinction entre une artère élastique et une artère musculaire (STEVENS et LOWE 1992). La média devient indistincte dans les veines et pratiquement inexistante dans les petits vaisseaux comme les capillaires (STEVENS et LOWE 1992).

L'adventice est la tunique externe des vaisseaux sanguins, composée en grande partie de collagène, avec parfois quelques cellules musculaires lisses, surtout au niveau veineux (STEVENS et LOWE 1992). Dans les artères, l'adventice est séparée de la média par une condensation de fibres élastiques qui forment une limitante élastique externe, plus ou moins distincte (STEVENS et LOWE 1992). L'adventice est la couche la plus développée dans les parois des veines. Dans les vaisseaux à parois épaisses, on retrouve dans la tunique externe des petits vaisseaux appelés vasa vasorum, qui envoient des ramifications pénétrant dans la média pour lui fournir du sang (STEVENS et LOWE

1992). Les capillaires sont les plus petits vaisseaux du système circulatoire. Ils relient habituellement les artérioles aux veinules dans d'autres cas, ils forment de vastes réseaux de ramifications. Leurs parois, extrêmement minces, ne sont formées que d'une seule couche de cellules endothéliales et d'une membrane basale (STEVENS et LOWE 1992). Dans certains cas, une seule cellule endothéliale constitue l'entière circonférence de la paroi. Il existe deux types de capillaires; les capillaires continus et les capillaires fenestrés. Les capillaires continus sont les plus répandus. Cependant on retrouve le type fenestré dans les organes où se produit une absorption capillaire importante comme dans l'intestin grêle, le foie, dans les glandes endocrines ou encore dans les reins (STEVENS et LOWE 1992 ; MARIEB, 1993).

1.1.1.2 Cellules sanguines

Le processus par lequel se forment les cellules sanguines s'appelle hématopoïèse. Les cellules souches (hématocytoblastes) à l'origine des cellules sanguines différenciées se trouvent dans la moelle osseuse et parfois dans le sang (TORTORA et GRABOWSKI, 1993). Il existe trois types de cellules sanguines; les érythrocytes (globules rouges), les leucocytes (globules blanc) et les thrombocytes (plaquettes).

Les érythrocytes sont des disques biconcaves dont le diamètre ne mesure qu'environ $8\mu\text{m}$ (TORTORA et GRABOWSKI, 1993). Leur forme malléable et biconcave leur permet de franchir des capillaires étroits de $3\mu\text{m}$. Les globules rouges matures sont des cellules anuclées. La membrane plasmique entoure l'hémoglobine, formée avant la perte du noyau, qui représente environ 33% de la masse cellulaire (MARIEB, 1993).

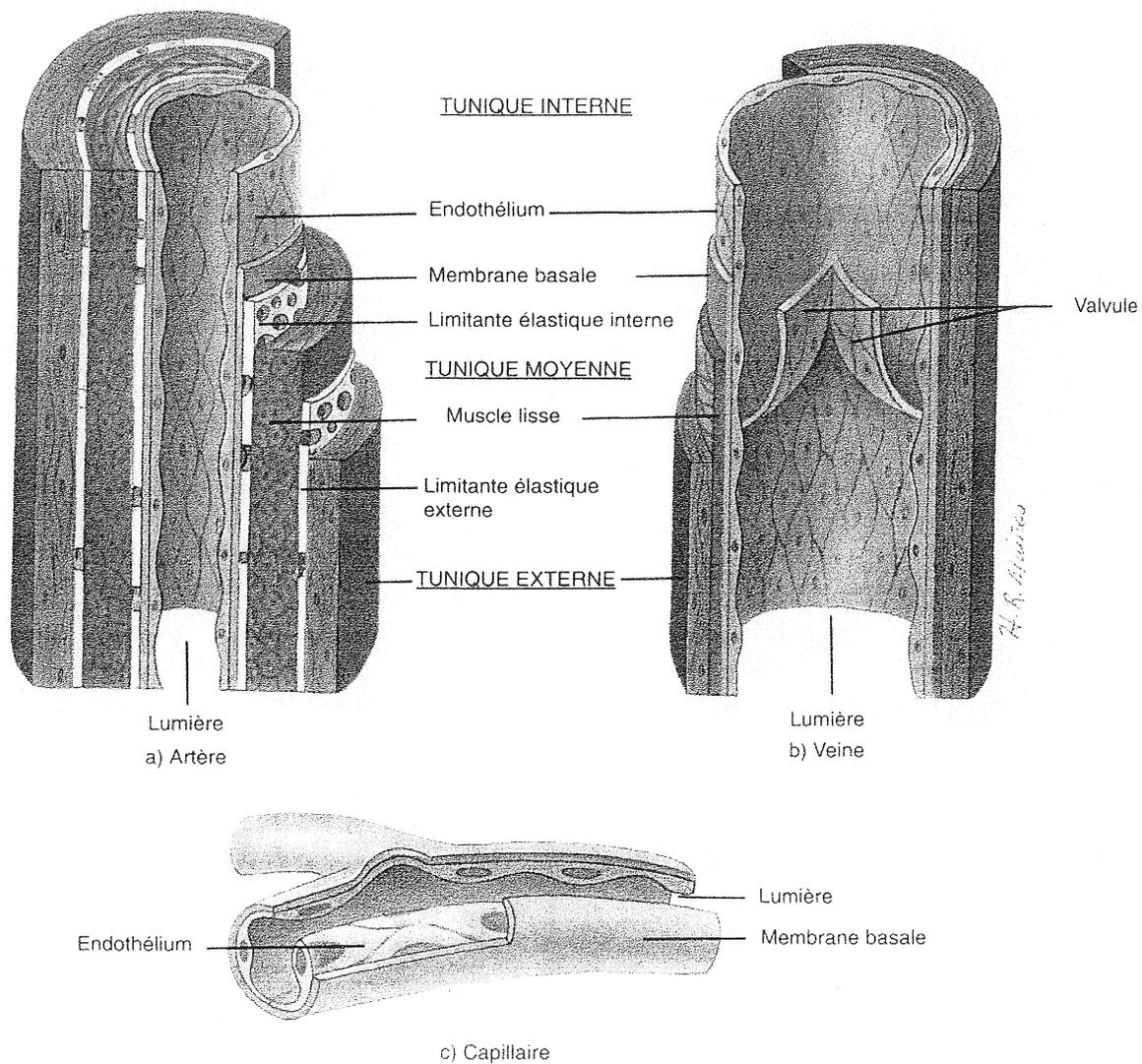


Figure 1 Structure des différents types de vaisseaux sanguins (tirée de TORTORA et GRABOWSKI, 1993)

La principale fonction des érythrocytes est de capter l'oxygène grâce à l'hémoglobine et de le distribuer aux cellules tissulaires. Les globules rouges possèdent une quantité importante d'ATP (TORTORA et GRABOWSKI, 1993). Il fut également rapporté la présence de récepteurs à l'ATP (P2Y) couplé aux protéines G qui activent une phospholipase C spécifique sur les érythrocytes de dinde qui sont nucléés (BERRIE et al, 1989). Le nombre de globules rouges qui circulent dans le sang est déterminé par le besoin de transport d'oxygène, et leur taux de production est influencé par les variations de leur retrait de la circulation (STEVENS et LOWE 1992). En effet, la durée de vie d'un érythrocyte est de 120 jours après quoi, les globules rouges sont retirés de la circulation et détruits par les macrophages de la rate et du foie (TORTORA et GRABOWSKI, 1993).

Les leucocytes sont beaucoup moins nombreux que les globules rouges, mais ils jouent un rôle essentiel dans la défense de l'organisme face aux corps étrangers (MARIEB, 1993). Les globules blancs se divisent en deux groupes soient, les granulocytes et les agranulocytes.

Il existe trois types de granulocytes; les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. La différence entre ces trois types réside surtout en l'aspect de leur granulation (TORTORA et GRABOWSKI, 1993). De façon générale, les granulocytes défendent l'organisme par phagocytose. Par exemple, les neutrophiles phagocytent des bactéries et des cellules mortes. Pour atteindre la zone d'infection ou de lésion tissulaire, les neutrophiles quittent la circulation en adhérant aux cellules endothéliales par des molécules d'adhésion, exprimées en réponse à une sécrétion locale de cytokines, puis traversent l'endothélium et la lame basale (STEVENS et LOWE 1992). SUD'INA et al.

(1998) ont démontré que cette adhésion est contrecarrée par une ecto-ATPase ou par un récepteur à l'ATP ayant une activité ATPasique. De plus, ils soutiennent que ces interactions pourraient jouer un rôle dans le roulement et la diapédèse des neutrophiles.

Les agranulocytes sont de lymphocytes ou des monocytes. Les monocytes sur un lieu infecté, se transforment en macrophages (TORTORA et GRABOWSKI, 1993). Ceux-ci ont pour mission de nettoyer le tissu de débris cellulaires des microbes qui s'y trouvent. Ce type d'immunité est qualifié d'inné. À la suite de la phagocytose, les macrophages ainsi que les neutrophiles libèrent des bactéricides tel que les radicaux superoxydes (TORTORA et GRABOWSKI, 1993). Il est notamment démontré chez le cobaye, que les macrophages au niveau du péritoine libèrent une quantité significative de superoxydes, en présence d'ATP (NAKAZAWA et al, 1991). Ceci démontre l'implication possible de l'ATP dans les processus inflammatoires.

L'immunité acquise, assurée par les lymphocytes, est plus spécialisée que l'immunité innée et amène une protection supplémentaire. Les lymphocytes sont répertoriés en deux grandes catégories, les lymphocytes B et les lymphocytes T. L'immunité humorale est assurée par les lymphocytes B qui font la synthèse des immunoglobulines libérées dans le sang. Les lymphocytes T quant à eux permettent une immunité cellulaire en synthétisant et en libérant différentes cytokines qui peuvent affecter d'autres cellules (STEVENS et LOWE 1992). L'ATP exogène peut moduler les fonctions de plusieurs cellules immunitaires incluant les lymphocytes B humains (PADEH et al, 1991), les lymphocytes T (FILLIPINI et al, 1990), les cellules NK humaines (SCHMIDT et al, 1984) etc. In vitro l'ATP peut modifier ou atténuer

diverses réponses lymphocytaires tels que l'apoptose et la synthèse de l'ADN (DUBYAK et EL-MOATASSIM, 1993).

Les plaquettes sont des fragments cytoplasmiques des mégacaryocytes. Cette fragmentation a lieu au niveau de la moelle osseuse, puis les thrombocytes passent dans la circulation sanguine. Les plaquettes sont des éléments discoïdes contenant des granulations, mais dépourvus de noyau, dont le diamètre varie entre 2 et 4 μm (TORTORA et GRABOWSKI, 1993). Parmi les granulations, on retrouve des nucléotides concentrés dans des corps denses. On y trouve l'ATP, l'ADP, l'UTP ainsi que des dinucléotides (SÉVIGNY et BEADOIN, 1994). Les thrombocytes jouent un rôle primordiale dans la coagulation qui prend place dans le plasma à la suite d'une rupture d'un vaisseau sanguin ou d'une lésion de son endothélium (MARIEB, 1993). En adhérant à l'endroit endommagé, les plaquettes forment un bouchon temporaire qui contribue à colmater la brèche (MARIEB, 1993). Depuis longtemps, nous savons que l'ADP est un activateur des plaquettes. Les plaquettes en présence d'ADP résulte en une augmentation du calcium intracellulaire, un rapide influx calcique, une activation de la phospholipase C ainsi qu'une inhibition de l'adénylate cyclase (KANAPULI et DANIEL, 1998). Nous aborderons ce sujet plus en détails dans la section rôles des nucléotides extracellulaires. Comme les plaquettes n'ont pas de noyaux, elles vieillissent rapidement et dégèrent en 10 jours. Les macrophages de la rate et du foie se chargent de retirer les plaquettes du sang et de détruire ces dernières par phagocytose (MARIEB, 1993).

1.1.1.3 Facteurs libérés de l'endothélium pouvant moduler le tonus vasculaire

Comme mentionné précédemment, l'endothélium n'est pas seulement une barrière physique entre les composantes du sang et le muscle vasculaire. Il est un élément important dans le maintien du tonus vasculaire. Plusieurs études biochimiques et pharmacologiques de l'endothélium intact et du muscle lisse vasculaire ont mené à l'identification de plusieurs facteurs relâchés des cellules endothéliales (RALEVIC et al.1992). Mise à part les purines (voir section 1.2.1) nous retrouvons parmi ceux-ci, une substance vasoconstrictrice qui est nommée l'endothéline. La découverte de l'endothéline remonte à 1988 par le groupe de YANAGISAWA et al. . Ce peptide est composé de 21 acides aminés et contient quatre résidus cystéines formant deux ponts disulfures. Il existe trois isoformes de ce peptide que l'on nomme endothéline-1, endothéline-2 et endothéline-3. Ces trois isoformes sont la résultante de l'action enzymatique de la ECE sur leurs précurseurs respectifs soient: Big-ET-1, Big-ET-2 et Big-ET-3. Jusqu'à ce jour l'endothéline est reconnu comme étant l'agent vasoactif le plus puissant.

L'endothélium libère également des substances vasorelaxantes telles que: la prostacycline (PGI_2), l'oxyde nitrique (NO) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (Figure 2).

L'effet relaxant de la prostacycline fut démontré par MONCADA et al (1976). Elle est dérivée de la cascade de l'acide arachidonique. La cyclooxygénase est l'enzyme responsable de la synthèse de prostacycline dans l'endothélium. La sécrétion des

prostacyclines peut être induite par les forces de cisaillements (HANADA et al. 2000) ainsi que par certains médiateurs endogènes comme l'endothéline (ORJI. 1999), la bradykinine (YAMASAKI et al. 2000), l'angiotensine II (ISHIHATA et al. 1999), l'ATP et l'ADP (PATEL et al. 1996a) et autres facteurs. La PGI₂ produit son effet relaxant en stimulant l'adénylate cyclase, ce qui augmente les taux d'AMPc au niveau du muscle lisse vasculaire.

L'oxyde nitrique est également un agent relaxant dérivé de l'endothélium. Le NO est synthétisé dans les cellules endothéliales suite à l'action de l'oxyde nitrique synthase sur la L-arginine (PALMER et al. 1988). Le produit de la réaction, l'oxyde nitrique, diffuse vers la couche de muscle lisse vasculaire dans lequel il stimule la guanylate cyclase soluble (MONCADA et al. 1991). Ceci provoque une augmentation des taux de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui induit la relaxation des cellules musculaires (MONCADA et al. 1991). Il existe deux formes d'oxyde nitrique synthase au niveau de l'endothélium. Une forme dite constitutive, elle est responsable de la sécrétion basale de NO. L'autre forme est dite inductible. Celle-ci est présente au niveau de l'endothélium et du muscle lisse vasculaire. La forme inductible a la capacité de produire environ mille fois plus d'oxyde nitrique que la forme constitutive (STAR, 1993). La libération endothéliale de NO peut être induite par plusieurs facteurs dont les forces de cisaillements (HORI et al. 1998), l'endothéline (HIGUCHI et SATOH, 1997), l'ATP (XIAO et al. 1999), le cisaillement combiné à l'interaction de l'ATP (HASSÉSIAN et BURNSTOCK, 1995) ainsi que la BK et l'angiotensine (HILL-KAPURCZAK et al. 1999). La demi-vie de l'oxyde nitrique est très courte, il est

rapidement inactivé dans le sang par l'hémoglobine et par les radicaux superoxydes dans la paroi vasculaire (MARSHALL et KONTOS, 1990).

Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium est un facteur relaxant distinct du NO et de la prostacycline (BRANDES et al. 2000) mais demeure le moins bien compris des trois. L'EDHF peut causer un changement transitoire du potentiel d'action de la membrane des cellules musculaires lisses. Certaines évidences portent à croire que l'EDHF dérive de l'acide arachidonique, possiblement par la voie du cytochrome P450 (CAMPBELL et al. 1996). Cependant, l'équipe de RANDALL et al (1996) a proposé que l'anandamine, un endocannabinoïde dérivé de l'acide arachidonique, pourrait être l'EDHF. Cette hypothèse est basée sur le fait qu'un antagoniste sélectif des récepteurs aux endocannabinoïdes, SR 141716A, inhibe l'action de l'EDHF au niveau du lit mésentérique de rat ainsi que chez le rat conscient (RINALDI-CARMONA et al. 1994). D'autres études faites sur le mésentère de rat par le groupe de MALMSJO et al (2000) ont démontré que l'effet relaxant de l'EDHF peut être induit par l'activation des purinocepteurs $P2Y_1$, $P2Y_2$ / $P2Y_4$. De plus il soutient que la stimulation du des récepteurs $P2X$ au niveau des cellules musculaires lisses contrecarrent sélectivement l'effet relaxant de l'EDHF. Ceci démontre qu'aujourd'hui encore l'action de l'EDHF suscite de nombreuses controverses.

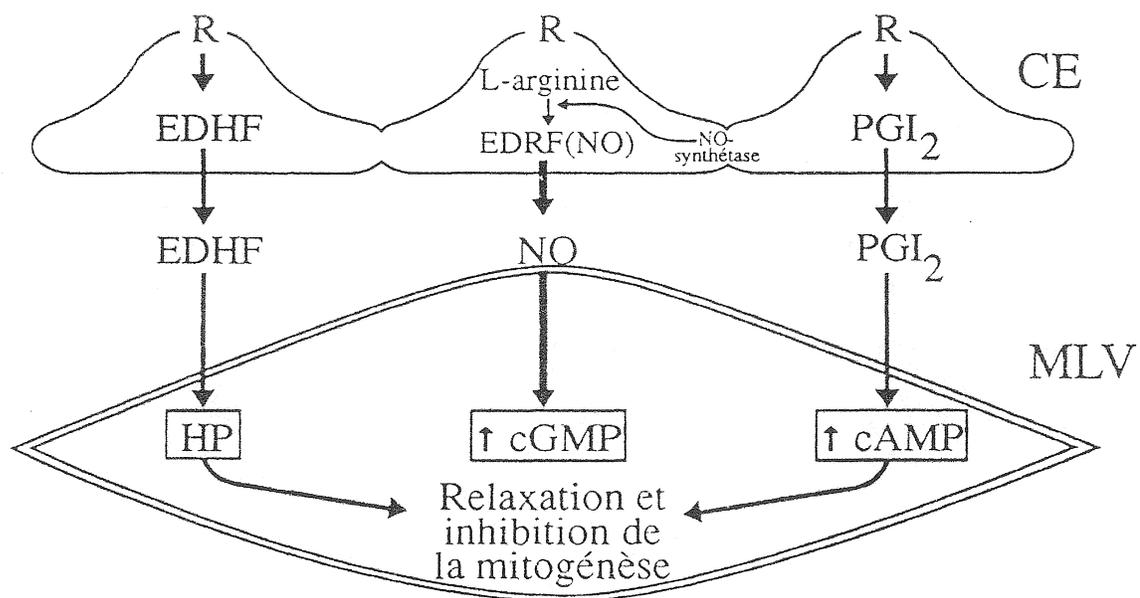


Figure 2 Schématisation de la libération et du mécanisme d'action du NO, de la PGI₂ et de l'EDHF (tirée et traduit de KATUSIC, Z.D. et SHEPHERD J.T., 1991).

1.1.1.4 Agents interférant avec l'activité vasodilatatrice de l'endothélium

Différentes approches sont utilisées pour étudier la contribution de la couche endothéliale en tant que barrière modulatrice de la réponse aux agents vasoactifs.

Tout d'abord, il est possible d'éliminer la couche de cellules endothéliales en traitant la préparation vasculaire avec un détergent. Ce traitement induit la lyse cellulaire. Le détergent que nous avons utilisé se nomme CHAPS, [(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate (figure 3). C'est un zwitterion synthétique résultant de la combinaison d'un groupe de sels biliaires hydrophobes et d'un groupe polaire de type sulfobetaine (HJELMELAND, 1980).

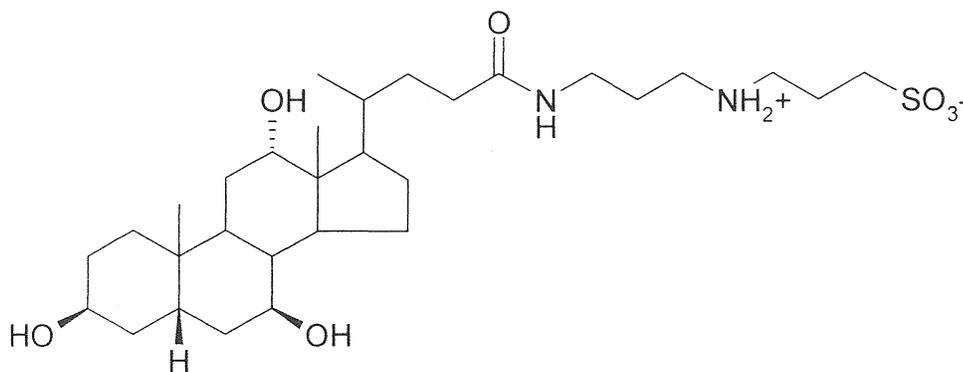


Figure 3 Structure chimique du CHAPS (tirée de HJELMELAND, 1980)

Ensuite, il est possible d'inhiber la synthèse de PGI_2 dans les cellules endothéliales à l'aide de l'indométhacine. L'indométhacine a pour effet de bloquer sélectivement la cyclooxygénase, l'enzyme responsable de la formation des prostanoïdes (LEVINE, 1972).

Afin d'inhiber la production d'oxyde nitrique, nous avons employé un analogue de la L-arginine, le N^G -nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) (figure 4). Le L-NAME est un inhibiteur compétitif de l'oxyde nitrique synthase (REES et al, 1990). Nous avons fait le choix de cet inhibiteur, car nous avons démontré dans notre laboratoire que le L-NAME inhibe de façon significative les relaxations endothélium-dépendantes au niveau du lit mésentérique de cobaye et de souris (BERTHIAME et al, 1995 et 1997). Nous avons également démontré que le L-NAME induit une augmentation significative de la pression artérielle moyenne chez le lapin anesthésié (GRATTON et al, 1997). Ces observations montrent que le NO joue un rôle primordial dans le tonus vasculaire.

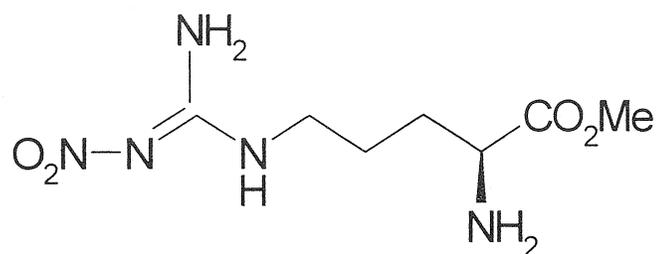


Figure 4 Structure chimique du L-NAME (tirée de REES et al, 1990)

1.1.1.5 La circulation mésentérique pré et postcapillaire

La circulation gastro-intestinale joue un rôle important dans le maintien de la pression artérielle puisqu'une grande portion du volume sanguin total s'y trouve. En fait, le flot sanguin mésentérique est influencé par diverses substances endogènes et exogènes libérées lors des phases prandiales et post-prandiales. La cholecystokinine (XU et SHAFFER, 1992), la substance P (JONHSON et al. 1998), le peptide intestinal vasoactif (ISHIZAWA, 1988) et autres molécules, peuvent influencer le flot sanguin de ce tractus et ainsi jouer un rôle important de le contrôle de la motilité gastro-intestinale.

L'étude des agents vasoactifs au niveau du lit vasculaire mésentérique est donc très importante puisque ces composés sont impliqués dans la régularisation du tonus vasculaire gastro-intestinal et par conséquent, ils influencent le maintien de la pression systémique et l'apport de sang à l'appareil digestif.

C'est en 1965 que Mc GREGOR a mis au point une technique d'isolation du lit mésentérique de rat. Cette préparation permettait de faire une distinction entre les propriétés de la vascularisation et l'activité des muscles intestinaux. Plus tard, cette préparation fut améliorée par WARNER (1990). Il a modifié la technique de façon à ce que les réponses artérielles et veineuses, suite à la stimulation par divers agents pharmacologiques, puissent être étudiées simultanément et indépendamment. En effet, le lit vasculaire mésentérique perfusé permet de faire une comparaison directe entre les réponses de la circulation artérielle perfusée et celle de la circulation veineuse perfusée par voie rétrograde. En 1995, ce modèle fut appliqué au lit mésentérique de cobaye

(BERTHIAUME et al). Nous avons donc utilisé cette dernière préparation vasculaire afin d'étudier les effets pharmacologiques de certaines purines qui pourraient être importantes dans le contrôle du tonus vasculaire mésentérique.

1.2 NUCLÉOTIDES EXTRACELLULAIRES

1.2.1 Les sources

L'ATP (figure 5) intracellulaire est un composant ubiquitaire et donc toute cellule est potentiellement une source de nucléotides (EL-MOATASSIM et al. 1992). Cette section répertorie un certain nombre de ces sources cellulaires. La concentration cytosolique de l'ATP est de l'ordre du millimolaire (SÉVIGNY et BEAU'DOIN, 1994). Une rupture de la membrane plasmique entraîne donc une augmentation significative de la concentration des nucléotides au voisinage des cellules éclatées. En conditions normales, la concentration sanguine des nucléotides est inférieure à 0.1 micromolaire (COADE et PEARSON, 1989). Ce niveau est la résultante de multiples variables comprenant la libération par les cellules, la dégradation par les ectonucléotidases et la capture des nucléotides déphosphorylés par les cellules (CÔTÉ et al. 1993).

Comme mentionné plus tôt, parmi les éléments sanguins les érythrocytes représentent une source importante de nucléotides. Leur libération des globules rouges peut être induite par les forces de cisaillement, l'hypoxie ou simplement par l'éclatement

des cellules (SÉVIGNY et BEAUDOIN, 1994). Les nucléotides peuvent également être sécrétés par les vaisseaux sanguins.

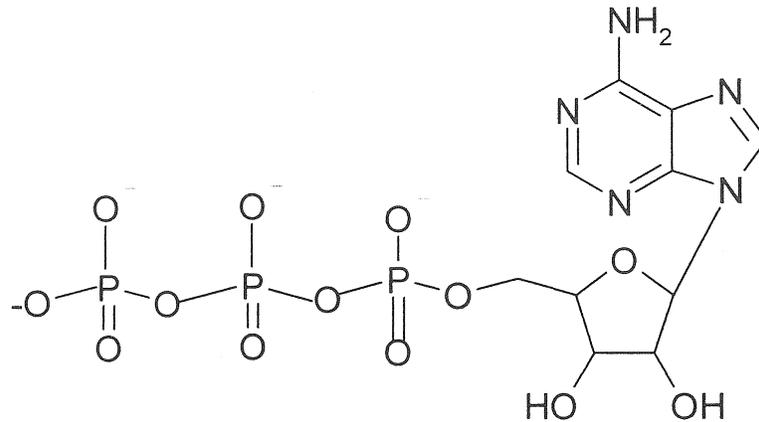


Figure 5 Structure chimique de l'ATP (tirée de HORTON et al, 1994)

En effet, les cellules endothéliales et musculaires lisses peuvent libérer jusqu'à 60% de leur contenu en nucléotides sans que leur viabilité ne soit affectée. Au niveau de l'endothélium, ce phénomène peut être induit en situation d'hypoxie et par les forces de cisaillement (BODIN et BURNSTOCK, 1995), par de hauts niveaux de potassium et par la noradrénaline (TAKEUCHI et al, 1995), par l'ATP (BODIN et BURNSTOCK, 1996) de même que la bradykinine, l'acétylcholine, la sérotonine et l'ADP (YANG et al, 1994). Quant à la couche de muscle lisse, la libération d'ATP peut être stimulée par la noradrénaline ou par l'ATP provenant du système nerveux périphérique efférent (KATSURGI et al, 1991; VIZI et al, 1992), par l'angiotensine II, via son récepteur AT-I (KATSURGI et al, 1996) et par l'histamine, la bradykinine et la substance P

(TAMESUS et al. 1998). Les thrombocytes, tel que signalé précédemment, représentent une source importante de nucléotides. Ces nucléotides sont sécrétés par exocytose. Les concentrations combinées d'ATP et d'ADP peuvent alors atteindre l'ordre du molaire. Le phénomène d'exocytose est également observé au niveau du système nerveux. Même si le système nerveux libère une quantité relativement faible de nucléotides, le fait que la terminaison nerveuse soit localisée à proximité immédiate de la cellule cible lui permet d'exercer une action efficace. Les cellules chromaffines de la médullosurrénale possèdent aussi des grains contenant de l'ATP ainsi que des quantités plus faibles d'ADP, d'UTP, de GTP et de CTP. Ces nucléotides sont aussi libérés par exocytose dans la circulation sanguine. En dernier lieu, mentionnons d'autres types cellulaires pouvant libérer des nucléotides tels que les mastocytes dont les grains d'histamines contiennent de l'ATP, les hépatocytes (LIDOFYSY, 1997), les lymphocytes et les macrophages (RARAPORT et FONTAINE, 1989 et SPERLAGH et al. 1998), les cellules épithéliales (WILSON et al. 1999) ainsi que les cellules nerveuses (FIEDLER et al. 1992).

Les nucléotides libérés dans l'espace extracellulaire par l'une ou l'autre des sources mentionnées, peuvent exercer une action autocrine ou paracrine par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques désignés récepteurs purinergiques ou purinorécepteurs.

1.2.2 Récepteurs purinergiques

Il existe deux types de récepteurs purinergiques; les récepteurs P1 et les récepteurs P2. Les purinocepteurs de type P1 répondent à l'adénosine tandis que ceux du type P2 répondent de façon préférentielle à l'ATP, l'ADP, et à l'UTP (BURNSTOCK, 1978). Dans cette partie, nous traiterons principalement des purinocepteurs P2 retrouvés au niveau du système cardiovasculaire.

1.2.2.1 Les purinocepteurs de type P1

On a identifié quatre récepteurs à l'adénosine faisant partie de la famille P1 grâce aux études moléculaires, biochimiques et pharmacologiques. Ces récepteurs sont classés sous les noms de A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ (tableau 1). Ces récepteurs sont couplés à des protéines G et leurs activations modulent l'AMPc .

1.2.2.2 Les purinocepteurs de type P2

Les récepteurs P2 ont classiquement été divisés en six sous-types; P2X, P2Y, P2U, P2D, P2Z et P2T. Avec l'avancement du clonage moléculaire, cette nomenclature a dû être modifiée. Les récepteurs P2 sont maintenant divisés en deux groupes. Les récepteurs formant des canaux ioniques se nomment P2X et les récepteurs couplés à des protéines G sont appelés P2Y. On dénombre présentement sept sous-types des récepteurs P2X (P2X₁₋₇) et dix sous-types P2Y (P2Y₁₋₁₁). Cependant, certains de ces

Tableau 1 Classification des purinocepteurs de type P1 (tirée de RALEVIC et BURNSTOCK, 1998).

	A₁	A_{2A}	A_{2B}	A₃
Protéine G	G _{i/o}	G _s	G _s G _q	G _i G _q
Agonistes	CCPA, CPA, NECA, CGS 21680	CGS 21680, NECA, CV 1808, R-PIA, CPA	NECA	APNEA, R- PIA, NECA, CGS 21680
Effets	↓ AMPc, ↑ IP ₃ , ↑ K ⁺ , ↓ Ca ²⁺	↑ AMPc	↑ AMPc, ↑ IP ₃	↓ AMPc, ↑ IP ₃

sous-types ont seulement été mis en évidence par clonage, leur activité physiologique reste à être prouvée (BARNARD et al, 1997 et HARDEN et al, 1997).

Les récepteurs P2X, comme signalé précédemment, sont des récepteurs formant des canaux ioniques qui médient une perméabilité sélective et rapide aux cations Na⁺, K⁺ et Ca²⁺ (tableau 2). Ceci résulte en une augmentation des taux de calcium intracellulaires ainsi qu'en une dépolarisation (DUBYAK et EL-MOATASSIM, 1993). Les récepteurs P2X₁₋₆ sont composés de 379 à 472 acides aminés et comprennent deux domaines transmembranaires hydrophobes, une longue boucle extracellulaire contenant dix résidus

cystéines conservés dans les sept sous-types. Les extrémités carboxy et amino terminales sont intracellulaires. La distribution principale de ces récepteurs se trouve au niveau des tissus excitables tels que le muscle lisse et le tissu nerveux (RALEVIC et BURNSTOCK, 1998). Le récepteur P2X₁ est le principal sous-type exprimé au niveau du muscle lisse vasculaire et est impliqué dans le phénomène de vasoconstriction (BOARDER et HOURANI, 1998). Le récepteur P2X₇ a une structure similaire aux autres sous-types à l'exception du fait qu'il possède un domaine carboxy-terminal intracellulaire beaucoup plus long (RALEVIC et BURNSTOCK, 1998).

Tableau 2 Classification des purinocepteurs (tiré de KUNAPULI et DANIEL, 1998)

Sous-types	Agonistes	Courants induits
P2X ₁	ATP, αβ-MeATP, 2-MeSATP	NA ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺
P2X ₂	ATP, αβ-MeATP, 2-MeSATP	NA ⁺ /K ⁺
P2X ₃	ATP, αβ-MeATP, 2-MeSATP	NA ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺
P2X ₄	ATP, αβ-MeATP, 2-MeSATP, CTP	NA ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺
P2X ₅	ATP, αβ-MeATP, 2-MeSATP, ADP	NA ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺
P2X ₆	ATP, 2-MeSATP, ADP	NA ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺
P2X ₇	BzATP, ATP, 2-MeSATP, ADP	NA ⁺ /K ⁺ , pores

Il est le seul des sous-types à être activé par l'ATP⁴⁻ et contrôle l'ouverture de pores non-sélectifs. L'ARNm et la protéine du récepteur P2X₇ sont distribuées au niveau des cellules provenant de la moelle osseuse incluant les granulocytes, les macrophages et les lymphocytes B (COLLO et al, 1997). De plus, plusieurs évidences portent à croire que le récepteur P2X₇ serait impliqué dans le signalement entre les macrophages (ou autres cellules immunitaires) et la cellule cible (DUBYAK et EL-MOATASSIM, 1993). Les récepteurs P2Y sont composés de 308 à 377 acides aminés. Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires. La distribution de ces récepteurs est très répandue, on peut en signaler la présence entre autre au niveau du cœur, des tissus vasculaires, immuns et nerveux. Cependant, très peu est connu concernant leurs rôles physiologiques (RALEVIC et BURNSTOCK, 1998) alors la liste ci-dessous pourrait en fait s'avérer plus courte (tableau 3). La majorité des récepteurs P2Y agissent via une protéine G couplée à l'activation de la PLC ce qui conduit à la formation d'IP₃ et à la mobilisation du calcium intracellulaire contenu dans le réticulum endoplasmique. En effet, l'activation du récepteur P2Y provoque l'hydrolyse du PIP₂ en IP₃ et diacylglycérol (figure 6) (DUBYAK et EL-MOATASSIM, 1993). Ceci peut entraîner la stimulation de diverses voies de signalisation incluant la PKC, PLA₂, canaux potassiques Ca²⁺-dépendant, NOS conduisant à la formation d'oxyde nitrique et la stimulation du EDHF (RALEVIC et BURNSTOCK, 1998; HASSÉSIAN et BURNSTOCK, 1995). Il a été démontré que la production de prostacycline induite par l'activation des récepteurs P2Y endothéliaux, nécessite la génération de la protéine kinase C (PKC) suivi d'une phosphorylation rapide d'une tyrosine de la MAPK (mitogen-activated protein kinase) (BOWDEN et al, 1995; PATEL et al, 1996b).

Tableau 3 Classification des purinocepteurs de type P2Y (tiré de KUNAPULI et DANIEL, 1998)

Sous-types	Agonistes	Mécanismes
P2Y ₁	2-MeSATP, ATP, ADP, UTP, 2-MeSADP, 2-CI-ATP	PLCβ/ IP ₃ / Ca ²⁺
P2Y ₂	ATP, ADP, UTP, UDP, 2-MeSATP	PLCβ/ IP ₃ / Ca ²⁺
P2Y ₃	ATP, ADP, UTP, UDP	PLCβ/ IP ₃ / Ca ²⁺
P2Y ₄	ATP, UTP, ITP, AP ₄ A	PLCβ/ IP ₃ / Ca ²⁺
P2Y ₅	ATP, ADP, UTP, UDP, 2-MeSATP, αβ-MeATP	PLCβ/ IP ₃ / Ca ²⁺
P2Y ₆	ATP, ADP, UTP, UDP, 2-MeSATP	PLCβ/ IP ₃ / Ca ²⁺
P2Y ₇	Leukotriène B ₄	
P2Y ₈	ATP, UTP, ITP, CTP, GTP	PLC/ IP ₃ / Ca ²⁺
P2Y ₉	Non déterminé	Pas PLC, pas AC
P2Y ₁₀	Non déterminé	Non déterminé
P2Y ₁₁	ATP, 2-MeSATP, ADP	PLCβ/ IP ₃ / Ca ²⁺ et AC

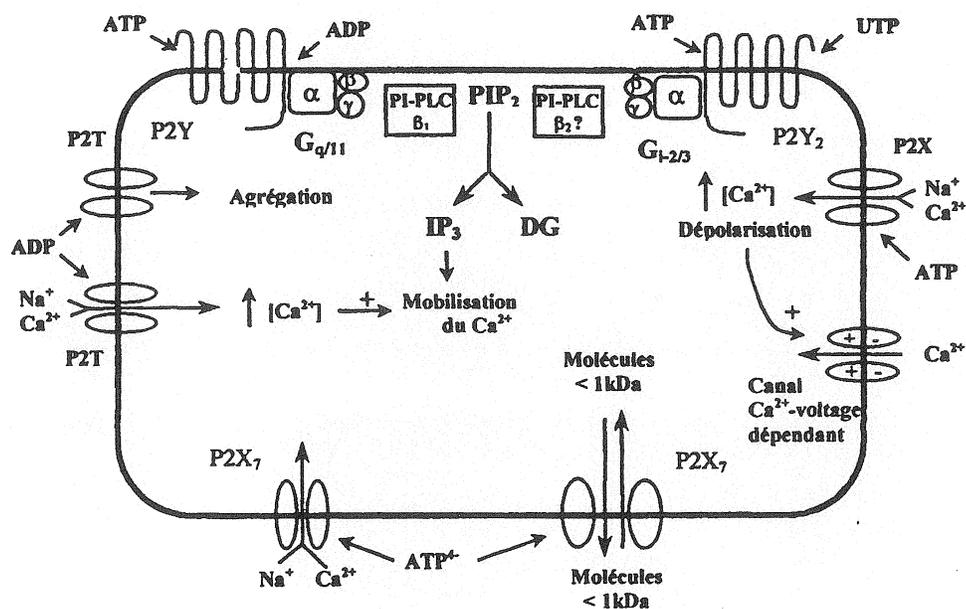


Figure 6 Signalisation intracellulaire des différents récepteurs purinergiques de type P2 (tiré de DUBYAK et EL-MOATASSIM, 1993)

L'activation des purinocepteurs par les nucléotides et les nucléosides entraînent diverses fonctions physiologiques. Cette activité se reflète au sien de multiples systèmes. Nous traiterons maintenant du rôle des nucléotides extracellulaires spécifiquement au niveau du système cardiovasculaire.

1.2.3 Rôles physiologiques des nucléotides extracellulaires dans le système cardiovasculaire

C'est au début des années 60 que l'ADP a été reconnu comme un agent activateur des plaquettes, conduisant à la formation d'agrégats (GAARDER et al, 1961). L'exposition des plaquettes à l'ADP entraîne une augmentation intracellulaire de calcium, un influx calcique rapide, l'activation d'une phospholipase C ainsi qu'une inhibition de l'adénylate cyclase (GACHET et al, 1997; HOURANI et al, 1994; MILLS, 1996). La croyance initiale était que ces phénomènes impliquaient l'activation d'un seul récepteur, désigné P2T (récepteur P2 sur les thrombocytes). Maintenant, on propose qu'il y aurait trois récepteurs plaquettaires essentiels à l'induction des phénomènes d'activation et d'agrégation des plaquettes. L'augmentation de calcium intracellulaire, l'activation de la phospholipase C et le changement de forme des plaquettes sont principalement dû à l'activation du récepteur P2Y₁. Le récepteur P2X₁ serait responsable de l'influx calcique rapide. L'inhibition de l'adénylate cyclase semblerait être induite par l'activation de récepteur encore mal défini mais identifié comme étant un P2T_{AC} (KUNAPULI et EL-MOATASSIM, 1998). L'activation et l'agrégation des plaquettes par l'ADP serait donc la résultante de l'activation de trois purinocepteurs.

Plusieurs purinocepteurs ont été identifiés sur les leucocytes mais leurs rôles n'ont pas encore été bien définis. Par contre, il est maintenant accepté que les nucléotides extracellulaires influencent la réponse immunitaire et le processus inflammatoire. L'ATP et l'ADP peuvent agir comme agent chimiotactiques pour les

monocytes et les neutrophiles et stimuler leurs propriétés adhésives au site infecté ou inflammé (KUNAPULI et DANIEL, 1998). Il est également prouvé que l'ATP et l'ADP stimulent l'activité phagocytaire et la dégranulation des neutrophiles et des monocytes (SAKAMOTO et FIRKIN, 1984; COCKROFT et STUTCHFIELD, 1989). De plus, l'ATP inhibe l'effet cytotoxique des macrophages et des cellules NK mais il est aussi un effecteur de la lyse cellulaire induite par les lymphocytes T cytotoxiques (BLANCHARD et al, 1991; SCHMIDT et al, 1984; BLANCHARD et al, 1995).

Au niveau de l'endothélium, l'ATP et l'ADP induisent une vasodilatation suite à l'activation des purinocepteurs de type P2Y (BOARDER et HOURANI, 1998). L'on croit que cette relaxation est due à la production de PGI₂ et de NO qui sont des vasodilatateurs et des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire. La production de prostacycline provient de l'hydrolyse de l'acide arachidonique par la phospholipase A₂ comme expliqué précédemment. Le NO est synthétisé par l'activation de l'oxyde nitrique synthase constitutive qui est dépendante de la Ca²⁺-calmoduline (BUSSE et MULSH, 1990). Or, la relâche des nucléotides extracellulaires lors d'une blessure vasculaire contribue à la fonction endothéliale par la production de NO et de PGI₂ (KUNAPULI et DANIEL, 1998).

Au niveau du muscle lisse vasculaire, l'ATP induit généralement une vasoconstriction via un récepteur de type P2X₁ (BOARDER et HOURANI, 1998). Le P2X₁ est le seul sous-type de la famille des récepteurs P2X à être présent sur les cellules musculaires lisses. MIYAGI et al (1996) ont démontré la présence d'un récepteur P2Y₂

qui contribue à une réponse contractile du muscle lisse vasculaire après une stimulation à l'UTP. L'ATP extracellulaire en présence de cellules musculaires lisses vasculaires en culture, est un mitogène et stimule un certain nombre de processus tels que la synthèse de l'ADN, la synthèse de protéines et augmente le nombre de cellules (ERLINGE, 1998).

Dans des conditions où l'endothélium est endommagé, l'ATP, l'ADP et l'UTP libérés par les plaquettes activées peuvent agir sur le muscle lisse vasculaire en induisant une vasoconstriction. De cette façon, les risques d'hémorragie sont réduits (KUNAPULI et DANIEL, 1998).

L'ATP extracellulaire influence également les fonctions cardiaques de manière indirecte c'est-à-dire via les vaisseaux sanguins et les nerfs et de façon directe via les purinocepteurs des cardiomyocytes (KUNAPULI et DANIEL, 1998). L'ATP régule le tonus vasculaire coronarien par l'activation de leurs récepteurs P2X ce qui provoque une vasoconstriction et par l'activation de leurs récepteurs P2Y qui induisent une vasodilatation (BURNSTOCK, 1989). De plus, il a été démontré que l'ATP a des effets sur les fonctions autonomes du cœur (ALLEN et BURNSTOCK, 1990; RUBINO et al, 1992). L'administration d'ATP peut induire un effet chronotrope négatif en agissant au niveau des nœuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire (BELHASSAN et PELLEG, 1984). De plus, l'ATP peut induire un effet dromotrope négatif en bloquant la conductance électrique au niveau du nœud auriculo-ventriculaire (BELHASSAN et PELLEG, 1984). De façon plus précise, l'ATP fait diminuer le potentiel d'action de cette région nodale. En général, l'activation des récepteurs P2X des cardiomyocytes amène un effet inotrope négatif tandis que l'activation des récepteurs P2Y entraîne une

action inotrope positive (SÉVIGNY et BEAUDOIN, 1994; DANZIGER et al, 1988; DEYOUNG et SCARPA, 1989). En résumé, au niveau cardiaque l'activation des récepteurs P2X entraîne une augmentation de la pression sanguine alors que l'activation des récepteurs P2Y cause une baisse de pression.

En ce qui concerne le CTP extracellulaire, très peu de fonctions lui sont connues. On rapporte tout de même dans la littérature que le CTP a la capacité d'induire la libération de TxA_2 par des cellules gliales en culture (LANGLEY et PEARCE, 1998). Ce groupe suggère que les cellules gliales sont la cibles des pyrimidines extracellulaires et que leur habileté à stimuler la libération d'écosanoides de ces cellules pourrait jouer un rôle important dans la réponse cérébrale face aux lésions. Il semblerait que le CTP, tout comme l'ATP mais de façon moins importante, augmente le calcium intracellulaire et la production de prostacycline au niveau des cellules endothéliales d'aorte de bœuf (KITAZONO et al, 1992). Le groupe de TRISCHITTA et al (1984) ont quant à eux fait la preuve que le CTP et autres nucléosides triphosphates inhibent la liaison de l'insuline à son récepteur au niveau du foie de rat et des membranes placentales humaines.

Force est de constater que la voie CTPergique a été jusqu'à présent peu étudiée. En fait, aucun récepteur pour le CTP n'a été identifié. Cependant d'après les données présentées ci-haut, tout porte à croire à l'existence de tels pyrimidinocepteurs. Il serait donc envisageable que le CTP possède d'importantes propriétés physiologiques notamment au niveau du système cardiovasculaire.

1.2.4 Les ectonucléotidases

Comme nous venons d'en faire la démonstration, les nucléotides extracellulaires provoquent une foule d'activités physiologiques via leurs récepteurs. Or, la concentration des nucléotides en circulation doit essentiellement être contrôlée. En effet, le temps de demi-vie d'un nucléotide est très court dû en partie à la présence d'ectonucléotidases à la surface des cellules endothéliales. Parmi ces ectonucléotidases, on retrouve la 5'nucléotidase qui convertit l'AMP en adénosine par l'hydrolyse d'un groupement phosphate. Il existe également la ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) qui est responsable de l'hydrolyse séquentielle des groupements phosphates γ et β des trinucleotides pour former le dérivé monophosphate correspondant (figure7).

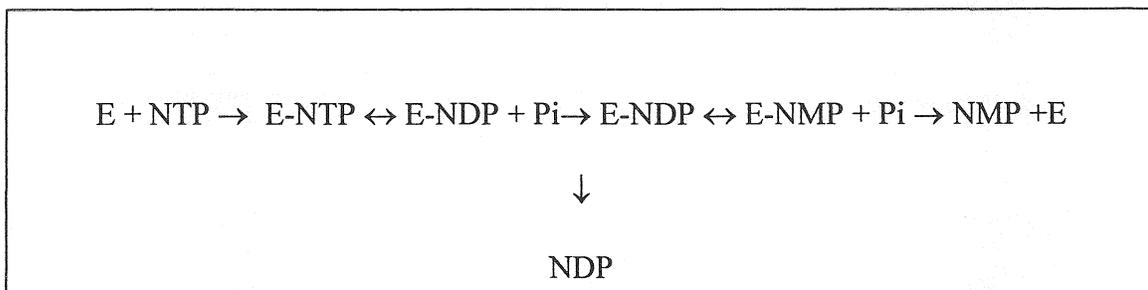


Figure 7 Mécanisme d'hydrolyse séquentiel d'un nucléotide triphosphate (NTP) catalysé par la nucléoside triphosphate diphosphohydrolase (E) (tiré de KOMOSZYNSKI et WOJTCZAK, 1995).

1.2.4.1 La NTPDase

Il existe trois isoformes de cet enzymes chez le mammifère (SÉVIGNY et al, 1997 b) qui se distinguent par leur localisation et leur poids moléculaire. Au niveau du système cardiaque, la NTPDase a été identifiée à la surface des cellules musculaires lisses (SÉVIGNY et al, 1997 a), des cellules endothéliales (SÉVIGNY et al, 1997 a), des cellules cardiaques (BEAUDOIN et al, 1997), des lymphocytes activés (BENREZZAK et al, 1999), des plaquettes, les cellules natural killer activées et certains monocytes et macrophages (KOZIAK et al, 1999). La localisation et la vaste distribution de la NTPDase fait de cette enzyme un élément majeur impliqué dans les contrôles du rythme cardiaque, du tonus vasculaire, de l'hémostase sanguine et de la réponse inflammatoire. En bref, la NTPDase joue un rôle primordial en contrôlant des fonctions où les nucléotides extracellulaires modulent une action physiologique. L'une des actions les plus importantes de la NTPDase est de contrôler l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. Les propriétés anti-agrégeantes de la NTPDase ne se limitent pas à diminuer les concentrations d'ADP mais aussi en augmentant la concentration d'AMP qui inhibe l'agrégation plaquettaire (MARCUS et SAFIER, 1993).

En bref, La NTPDase est une enzyme très efficace et très répandue ayant un rôle manifeste au niveau physiologique. En effet, grâce à son site actif en contact avec la lumière des vaisseaux, cette ecto-enzyme est en mesure de réguler les taux des nucléotides extracellulaires circulants (SÉVIGNY et al, 2000).

1.2.4.2 Les inhibiteurs de la NTPDase

Depuis un bon nombre d'années, des équipes de recherche ont tenté de contrôler la signalisation purinergique. Pour ce faire, elles ont développé des agonistes et des antagonistes aux purinocepteurs ou encore elles ont tenté d'empêcher la dégradation des ligands naturels des purinocepteurs en inhibant les ectonucléotidases (NTPDase) responsables de l'hydrolyse rapides des nucléotides extracellulaires (PICHER et al, 1996; WITTENBURG et al, 1996). Il existe également des inhibiteurs non spécifiques de la NTPDase et qui ne sont pas associés à la signalisation purinergique (CÔTÉ et al, 1992). De toute évidence, il y a une multitude d'inhibiteurs disponibles mais ceux-ci interfèrent avec les purinocepteurs ou il sont non-spécifiques à la NTPDase. Un inhibiteur parfait devrait résister à l'hydrolyse de la NTPDase, avoir peu ou pas d'interaction avec les purinocepteurs P2 et avoir une affinité apparente (K_i) similaire et/ou supérieure à celle obtenue pour l'ATP (K_m).

Nous avons employé un de ces inhibiteur, l'acide 1-hydroxynaphthalene-3,6-disulfonique (BGO 136) (figure 8). Cette molécule inhibe la NTPDase de façon mixte et possède un K_i entre 300 et 400 μ M. Il semblerait que le BGO 136 interagisse avec le purinocepteur P2Y₂. L'inhibition de la 5' nucléotidase par le BGO 136 fut aussi démontrée (GENDRON et al, 2000).

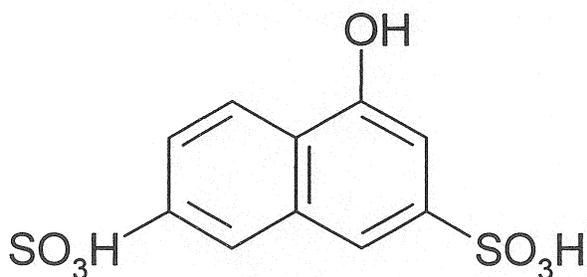


Figure 8 Structure chimique du BGO 136 (tirée de GENDRON et al, 2000)

1.2.5 Considérations physiopathologiques

Étant donné les multiples rôles des nucléotides extracellulaires et de la NTPDase, il n'est pas surprenant de constater que leurs fonctions peuvent être altérées en situations physiopathologiques. Parmi ces conditions, il a été démontré qu'une insuffisance cardiaque entraîne une augmentation de la libération d'ATP par les fibres nerveuses et une régulation à la baisse du purinocepteur P2X₁ au niveau des artères de résistances. Ceci a été prouvé par une diminution de la production d'ARNm de ce purinocepteur (MALMSJÖ et al, 1999). On peut également associer à l'ATP un rôle dans la nociception et à l'induction de la douleur. Ces phénomènes impliqueraient l'activation des purinocepteurs P2X₃ car ils sont presque exclusivement exprimés au niveau des neurones sensitifs de la nociception (DING et al, 2000). Il semble que l'ATP serait un

médiateur pro-inflammatoire dans le cas de la glomérulonéphrite et que cette action pourrait être potentiée par des hormones de croissance (SCHULZE-LOHOFF et al, 1996). De plus le groupe de GUTIERREZ et al (2000) démontre que l'aggravation d'un cas de glomérulonéphrite pourrait être dû à une désensibilisation réversible des récepteurs purinergiques P2Y₂. Ce groupe suggère également que cette situation se produit dans le cas de l'hyperfiltration glomérulaire observée chez les diabétiques. Il mentionne aussi que l'ATP induit une contraction des cellules mésangiales glomérulaires et que cette contraction est importante pour la régulation de la filtration glomérulaire. Il y a aussi eu démonstration que la NTPDase peut perdre ces effets antithrombotiques lorsque les cellules endothéliales sont activées (ROBSON et al, 1997). Cette équipe spécule que cette perte résulte en une diminution de la capacité à dégrader l'ADP pouvant jouer un rôle dans l'activation plaquettaire non isolée et dans l'inflammation vasculaire observée dans les processus de reperfusion, le rejet de xélogreffe et autres formes de blessures vasculaires. L'ATP, la noradrénaline et le neuropeptide Y (NPY) sont des co-transmetteurs importants dans le système nerveux sympathique qui jouent un rôle central dans le contrôle cardiovasculaire. Or, il semblerait que dans le cas de l'hypertension où l'altération de la réponse vasculaire y est associée, la réactivité vasculaire au NPY, à la NA et à l'ATP reste intacte (NILSSON et al, 2000). En situation physiopathologique, l'ATP peut aussi être bénéfique, comme c'est le cas dans le cancer du poumon. En effet l'ATP inhibe la perte de poids et de tonus musculaire observée chez les patients atteints de cette maladie (AGTERESCH et al, 2000). Ce phénomène fut aussi démontré chez les souris ayant un cancer du colon (RAPAPORT et FONTAINE, 1989). De plus des études précliniques ont faites la preuve que l'administration d'ATP potentie les effets antitumoraux cytotostatiques

(MAYMON et al, 1994) et de la radiothérapie (ESTRELA et al, 1995) et pourrait aussi avoir des effets protecteurs sur les tissus endommagés par la radiation (SENAGORE et al, 1992).

1.3 BUTS DE L'ÉTUDE

On retrouve dans la littérature plusieurs désaccords concernant l'effet relaxant de l'ATP. Certains groupes prétendent que cet effet est induit par l'activation des récepteurs P2Y endothéliaux ce qui entraîne la relâche d'oxyde nitrique et de prostacycline (RALEVIC et al, 1996 et RUBINO et al, 1999). Contrairement à eux, d'autres équipes de recherche affirment que la vasodilatation induite par l'ATP ne dépend pas de l'endothélium (KATO et al, 1999, GARCIA-VELASCO et al, 1995). Nous nous proposons donc de déterminer les effets pharmacologiques des nucléotides extracellulaires au niveau des circuits mésentériques pré et postcapillaires de cobaye. De plus, nous définirons si ces effets sont dépendants de l'endothélium. Pour répondre à ces objectifs, nous étudierons les effets pharmacologiques dans un lit vasculaire complexe. Une telle préparation nous fournira des renseignements sur les propriétés vasoactives des nucléotides extracellulaires et nous permettra de comparer les réponses des vascularisations artérielles et veineuses.

Il est également connu que le taux de nucléotides extracellulaires circulant est contrôlé par des enzymes très répandues que l'on nomme les NTPDase (SÉVIGNY et al,

2000). Or, dans la dernière partie de notre étude, nous tenterons de démontrer la présence et la fonctionnalité de la NTPDase au niveau de la vascularisation méésentérique artérielle et veineuse. Pour ce faire, nous mesurerons les taux d'ATP et de ces métabolites contenus dans le perfusat de préparations méésentériques et ce grâce à la mise au point d'une méthode analytique par HPLC. Ces résultats nous fourniront des informations supplémentaires quant à la régulation des concentrations de purines circulantes par la NTPDase au niveau de l'artère et de la veine méésentérique de cobaye.

MATERIEL ET MÉTHODE

2.1 ANIMAUX UTILISÉS

Les tissus investigués durant notre étude proviennent de cobayes Dunkin Hartley de 250-350 g et de sexe indifférent que l'on achète à la ferme d'élevage Charles River, Canada Inc., à St-Constant, Québec.

2.2 PRÉLÈVEMENT DU LIT MÉSENTÉRIQUE DE COBAYE

La préparation du tissu a été faite selon la méthode démontré par BERTHIAUME et al (1995) qui elle, fut inspirée des techniques mises au point par MCGREGOR (1965) et WARNER (1990). Suite au sacrifice de l'animal, l'abdomen fut ouvert et les branches cholique et iléocholique de l'artère mésentérique supérieure ont été ligaturées. Le vaisseau d'intérêt (artère mésentérique supérieure ou veine mésentérique) fut dégagé de tous tissus conjonctifs et a ensuite été canulé avec une canule en plastique de type Portex 3FG (Hyle, Kewt, Angleterre). La canule insérée fut par la suite attachée au vaisseau. Le tissu doit alors être perfusé avec une solution de Krebs héparinée (100 unités / ml) via le vaisseau canulé à un débit de 2 ml/min. L'intestin a été dissocié du mésentère en coupant près de la bordure intestinale, en partant du début du duodénum jusqu'au colon descendant.

2.3 PERFUSION DU LIT MÉSENTÉRIQUE

Une fois isolé, le lit méésentérique a été placé sur un plat de pétri et branché à un système de perfusion (figure 10). Le tissu est perfusé par une solution de Krebs oxygénée (95% O₂, 5% CO₂) et maintenue à 37°C. De plus, cette solution contient de l'indométhacine (5µM) afin d'inhiber la synthèse de prostanoides (FERREIRA et al, 1971). La composition du Krebs était la suivante (concentration en mM) : NaCl : 117,5, KCl 4,7, KH₂PO₄ : 1,2, MgSO₄·7H₂O : 1,2, CaCl₂·6H₂O : 2,5, NaHCO₃ : 25 et glucose : 5,5.

Cette solution physiologique, a été perfusée à l'aide d'une pompe à perfusion Cole-Parmer (modèle 7619-50). Ce système de perfusion est couplé à un transducteur de pression Statham (modèle P-23A) qui permettait de mesurer les modifications de pression de perfusion, exprimées en mmHg. Ces variations de pression induites par une contraction ou une vasodilatation se traduisaient par un changement de la résistance vasculaire. Ces mesures ont été enregistrées sur un physiographe (Grass, modèle 79).

Suivant son installation à ce système, le tissu est perfusé (via l'artère ou la veine) à un débit de 2 ml/min pour une période d'équilibre de 1 heure. Au moment où l'expérience débutait le débit de perfusion a été augmenté à 6 ml/min.

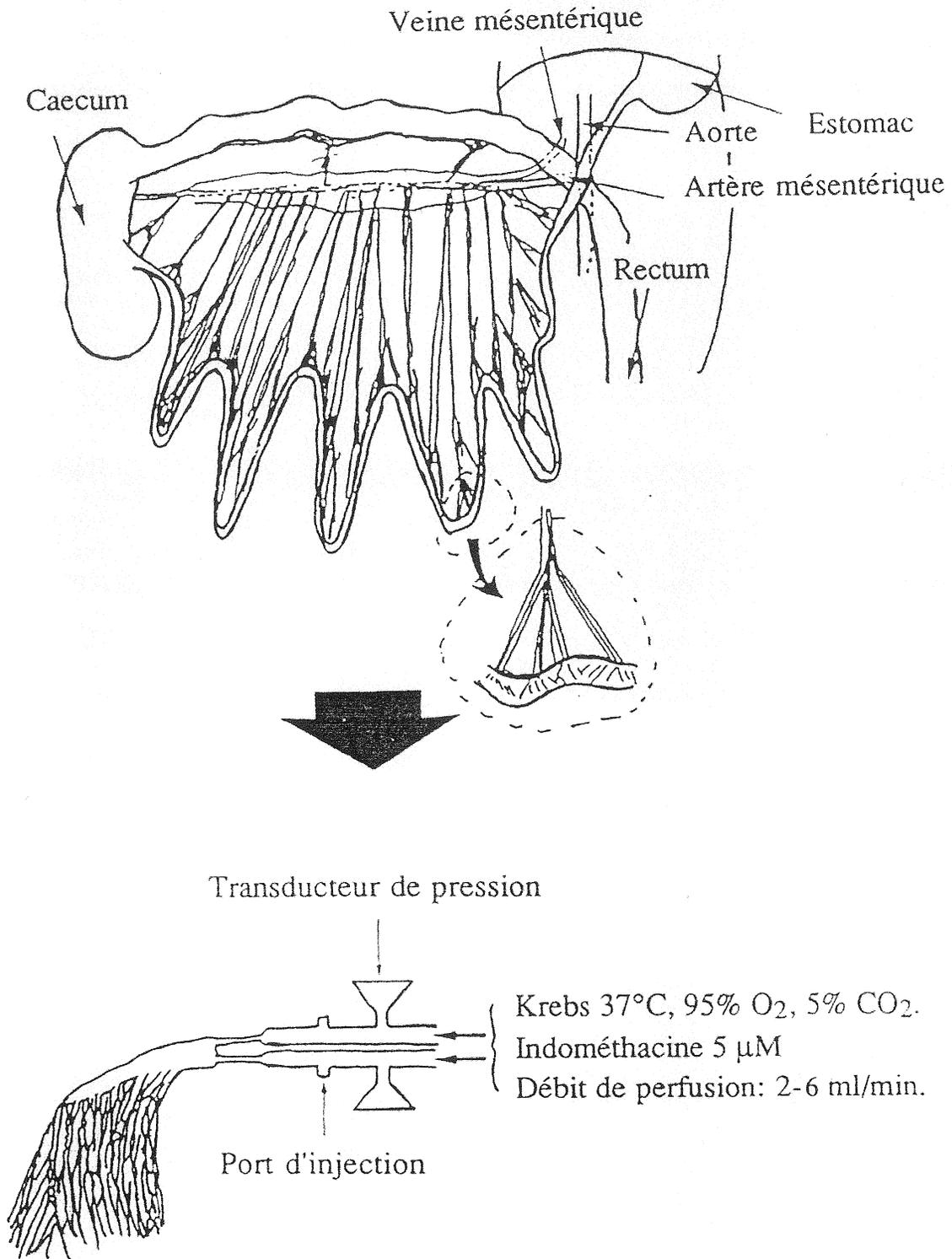


Figure 9 Modèle de perfusion du lit mésentérique (tirée du mémoire de CLAING, 1992)

2.4 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

2.4.1 Évaluation de l'activité biologique des nucléotides

Les expériences préliminaires des effets des purines (ATP : 0.01-1000 pmol, ADP : 0.01-1000 pmol, AMP : 0.01-1000 pmol), d'un analogue non hydrolysable de l'ATP (β,δ -MeATP : 0.01-1000 pmol) ont été effectuées sur la préparation vasculaire à l'étude. Pour étudier l'effet de ces molécules, nous devons précontracter le tissu à l'aide de la NA (200 μ M) du côté artériel et au U-46619 (4,2 μ M) du côté veineux.

2.4.1.1 Rôle modulateur de la couche endothéliale dans l'effet relaxant des nucléotides

2.4.1.1.1 Traitement au CHAPS

L'emploi de ce détergent permet d'éliminer la couche de cellules endothéliales (HJELMELAND,1980). Un prétraitement au CHAPS (2 X 20mM, 45 secondes avec un intervalle de 30 minutes) crée une augmentation de la pression de perfusion suivie d'un retour à la pression de base après un certain laps de temps et il se produit parfois de l'oedème.

2.4.1.1.2 Traitement au L-NAME

Le L-NAME est un inhibiteur non sélectif de l'enzyme responsable de la formation de l'oxyde nitrique (REES, 1990). Nous l'avons donc utilisé afin de compétitionner avec l'oxyde nitrique synthase. Le L-NAME fut infusé pendant 30 minutes à une concentration de 200 μ M. Cette série d'expériences a été réalisées seulement du côté pré-capillaire.

2.4.1.1.3 Réponse de la vascularisation mésentérique au NK-1 et au NaNP

Le [Sar⁹, Met(O₂)¹¹]SP est un agoniste sélectif des récepteurs de type NK-1 (REGOLI et al, 1989). L'effet relaxant de cet agoniste au niveau de l'artère mésentérique supérieure de cobaye fut démontré comme étant endothélium-dépendant (BERTHIAUME et al, 1995). Nous avons donc utilisé le NK-1 (100 pmol) pour vérifier l'intégrité de l'endothélium et ainsi comparer les effets relaxants des nucléotides à celui du NK-1. Nous avons employé au niveau postcapillaire la BK (100 pmol) pour les même fins. De plus, nous avons étudié l'effet relaxant du nitroprussiate de sodium pour s'assurer de l'intégrité du tissu.

2.4.2 Évaluation de l'activité catalytique de la NTPDase

Cette étude a été réalisée sur des préparations mésentériques artérielles et veineuses non précontractées. Suivant la période d'équilibre, une infusion d'ATP a été effectuée. Des collectes de perfusat ont été recueillis et analysés par HPLC.

2.4.2.1 Collecte des échantillons biologiques

Les collectes sont d'une durée d'une minute chacune et elles ont été prises à différents temps de l'infusion d'ATP. La collecte # 1 représente les collectes prises pendant une minute suite à la première minute d'infusion d'ATP; la collecte # 2 suite à la 2^e minute; la collecte # 3 suite à la 4^e minute; la collecte # 4 suite à la 6^e minute; la collecte # 5 suite à la 7^e minute; les collectes # 6 et 7 représentent les collectes prises suivant l'arrêt de l'infusion d'ATP, suite aux 1^{ère} et 2^e minutes

2.4.2.1.1 Infusion d'ATP

À partir d'une préparation de lit mésentérique non précontractée, avec et sans endothélium, nous avons infusé de l'ATP (1×10^{-4} M, 7 minutes). Des échantillons de perfusat (6 ml) ont été recueillis avant, pendant et suivant l'infusion d'ATP.

2.4.2.1.2 Traitement au BGO136

Le BGO 136 est un inhibiteur mixte non-compétitif de la NTPDase (GENDRON, 2000). Pour contrecarrer l'activité catalytique de cette enzyme, nous avons prétraité les circuits vasculaires mésentériques (artériel et veineux) avec le BGO 136 (1mM et 10mM, 20minutes) suivi d'une infusion d'ATP (100 μ M). Des collectes de perfusats ont également été faites aux mêmes périodes.

2.4.2.2 Analyse biochimique des échantillons par HPLC

Les analyses ont été effectuées avec un HPLC de marque Waters. Le système est composé d'un détecteur d'absorbances modèle 441, de pompes de modèles 501 et 6000 et d'un contrôleur automatique de gradient. Les chromatogrammes ont été enregistrés par un traceur (BBC Goerz Metrawatt, Servigor 120). Pour réaliser une séparation de l'ATP et de ces métabolites (ADP et AMP), nous avons employé une colonne de type CSC- Nucleosil (100A / ODS, 5 μ m et 15x 0,46 cm) provenant de chez Chromatography Sciences Company Inc. Cette méthode a été inspirée des travaux effectués par TEKKANAT et al, (1988).

Le solvant utilisé était une combinaison d'une solution de KH_2PO_4 (60 mM) et 15% d'acétonitrile. Le pH de ce mélange était ajusté à 7 avec de l'hydroxyde de tétrabutylammonium. La solution est ensuite dégazée. L'élution des nucléotides a été faite selon un mode isocratique à un débit de 1mL / min. La détection de ces molécules a été réalisée à une longueur d'onde de 214 nm. Le volume d'injection fut de 25 μ L. La

quantité d'ATP, d'ADP et d'AMP contenue dans les échantillons a été déterminée à partir de courbes standard de quantités connues de ces mêmes nucléotides.

2.5 COMPOSÉS PHARMACOLOGIQUES UTILISÉS

Tous les agents employés dans cette étude, ont été dissous dans de la saline (0,9%) et conservés à -20°C . Les substances utilisées au cours d'une expérience, ont été diluées à partir des solutions mères. Par contre l'indométhacine a été fraîchement préparée au début de chaque expérience en la diluant dans du Trizma-base (0.2 M, pH 7,4) jusqu'à une concentration finale de 10 mg/mL. En ce qui concerne la noradrénaline, nous devons ajouter de l'acide ascorbique à la solution pour éviter son oxydation.

2.6 PARAMÈTRES PHARMACOLOGIQUES

Pour évaluer l'activité biologique des différents agents vasoactifs, nous avons quantifié l'effet presseur en mesurant l'augmentation de la pression de perfusion (mmHg) lorsque le lit vasculaire était au tonus de base. De plus, nous avons défini l'effet vasorelaxant des composés à l'étude en évaluant leurs pourcentages de relaxation par rapport à l'augmentation de pression induite par la noradrénaline du côté artériel et par l'U46619 du côté veineux.

2.7 CALCUL ET ÉVALUATION STATISTIQUE DES DONNÉES

Tous les résultats furent exprimés en terme de moyenne et d'écart à la moyenne selon un nombre n d'expérience. L'épreuve statistique t de Student a été employé afin de déterminer la valeur significative des différences entre les moyennes pour des données non pairées. Les valeurs de probabilités furent considérées significatives lorsque (p) était inférieur à 0,05.

Tableau 4 Liste des composés utilisés

Abréviation	Nom pharmacologique	Source
ADP	Adénosine 5'-diphosphate	Sigma Chemical
AMP	Adénosine 5'-monophosphate	Sigma Chemical
ATP	Adénosine 5'-triphosphate	Sigma Chemical
BGO 136	Acide 1-hydroxynaphtalène-3,6-disulfonique	Sigma Chemical
BK	Bradykinine	Sigma Chemical
CHAPS	3-[3-(cholamidopropyl) diméthylammoniuo]-1-propanesulfonate	Sigma Chemical
CH ₃ CN	Acétonitrile	Fisher
[CH ₃ (CH ₂) ₃] ₄ NOH	Hydroxyde de tetrabutylammonium	Aldrich
Héparine	Héparine sulfate	Sigma Chemical
indocid	Indométhacine	Sigma Chemical
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium	Fisher
L-NAME	NG-nitro-L-arginine méthyl ester	Sigma Chemical
β,δ-MeATP	Adénosine 5'(β,δ-méthylène)-triphosphate	Sigma Chemical
NA	Noradrénaline	Sigma Chemical
NaNP	Nitroprussiate de sodium	Aldrich
NK-1	[Sar ⁹ ,Met(O ₂) ¹¹]SP	Synthétisé par Dr. Neugebauer
Trizma base	Tris[hydroxyméthyl]amino methane	Sigma Chemical
U 46619	9,11-dideoxy-9α,11αmethanoepoxy Prostaglandin F2α	Cayman Chemical
Vitamine C	Acide ascorbique	Sigma Chemical

RÉSULTATS

3.1 EFFETS DES NUCLÉOTIDES ET D'UN ANALOGUE DE L'ATP SUR LE TONUS VASCULAIRE DES ARTÈRES ET DES VEINES MÉSENTÉRIQUES DE COBAYE

Nous avons tout d'abord voulu vérifier l'action des nucléotides et du β , δ -MeATP sur des préparations de lit mésentérique perfusées. La pression de perfusion basale des côtés artériels et veineux de la vascularisation mésentérique est de $5,8 \pm 0,4$ mmHg (n= 35) et de $1,5 \pm 0,1$ mmHg (n= 30), respectivement, lorsque le débit de perfusion était de 2ml/min. Après la période d'équilibre, ce débit était augmenté à 6 ml/min. Ceci élevait la pression de perfusion à $10,9 \pm 0,5$ mmHg (n= 30) du côté artériel et à $5,6 \pm 0,2$ mmHg (n= 30) au niveau veineux. L'infusion de noradrénaline au niveau précapillaire (200 μ M), haussait la pression de perfusion de $30,23 \pm 1,1$ mmHg (n = 30) tandis qu'au niveau postcapillaire l'infusion de U46619 (4,2 μ M) induisait une augmentation de $2,3 \pm 0,5$ mmHg (n=23).

3.1.1 Étude des effets vasoactifs de l'ATP, l'ADP et de l'AMP dans le lit mésentérique de cobaye

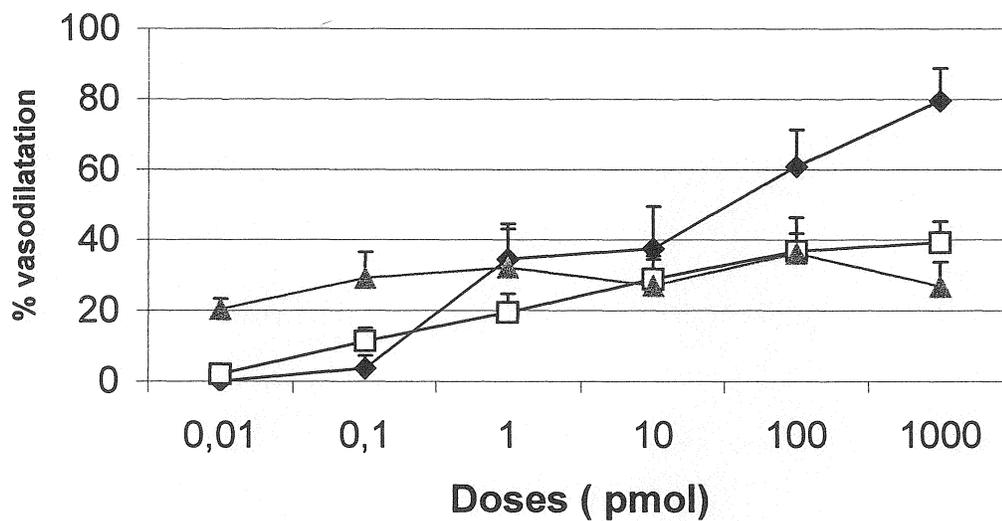
Par cette série d'expériences, nous avons voulu comparer les effets de l'ATP, l'ADP et l'AMP du côté artériel à ceux du côté veineux. Les figures 10 A et B

démontrent l'activité vasoactive de l'ATP et de ces métabolites au niveau de la vascularisation artérielle et veineuse précontractées à la noradrénaline (200 μ M) et à l'U46619 (4,2 μ M) respectivement. Au niveau artériel (figure 10A), nous remarquons que l'ATP et l'ADP ont un effet relaxant dépendant de la dose (0,01 à 1000 pmol). Alors que l'AMP induit une vasodilatation moindre et qui n'est pas dose-dépendant. Du côté veineux (figure 10B), on peut constater que l'effet vasodilatateur de ces trois nucléotides est beaucoup moins important que du côté artériel voire presque nul. De plus, les figures 11 A, B et C démontrent quand même la fonctionnalité de ces tissus veineux. Or, l'effet relaxant induit par ces purines semble plus important au niveau précapillaire. Étant donné ces résultats, les 3 prochaines étapes de notre étude porteront uniquement sur les effets au niveau artériel.

3.1.2 Détermination de la participation de l'endothélium et du NO dans l'effet relaxant de l'ATP, l'ADP, l'AMP et du CTP au niveau de l'artère mésentérique de cobaye

Dans le but d'élucider la contribution de l'endothélium et de l'oxyde nitrique dans la réponse artérielle aux différents nucléotides, nous avons tout d'abord éliminé la couche de cellules endothéliales et dans une autre série d'expériences, nous avons bloqué le mécanisme par lequel le NO produit une relaxation en infusant du L-NAME. Le NK-1, le nitroprussiate de sodium ainsi que l'ATP, ses produits d'hydrolyse et le CTP causent une vasodilatation de la vascularisation mésentérique artérielle précontractée à la noradrénaline.

A)



B)

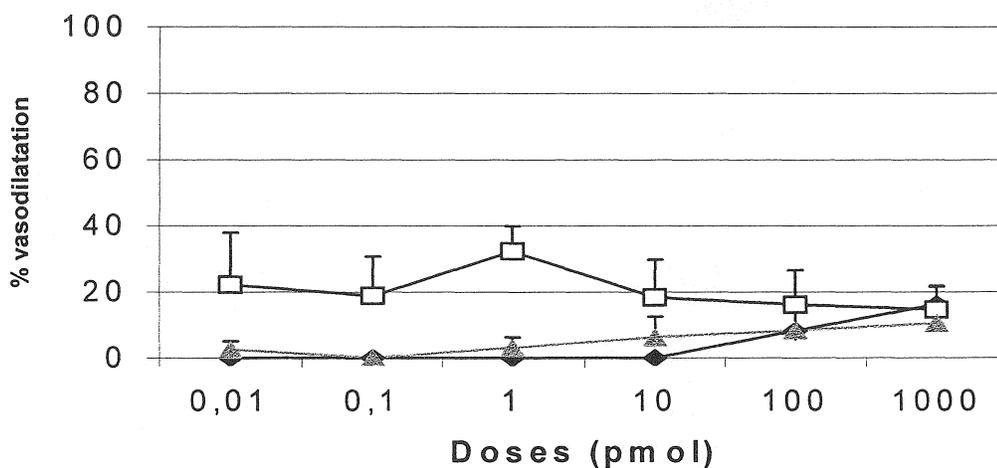
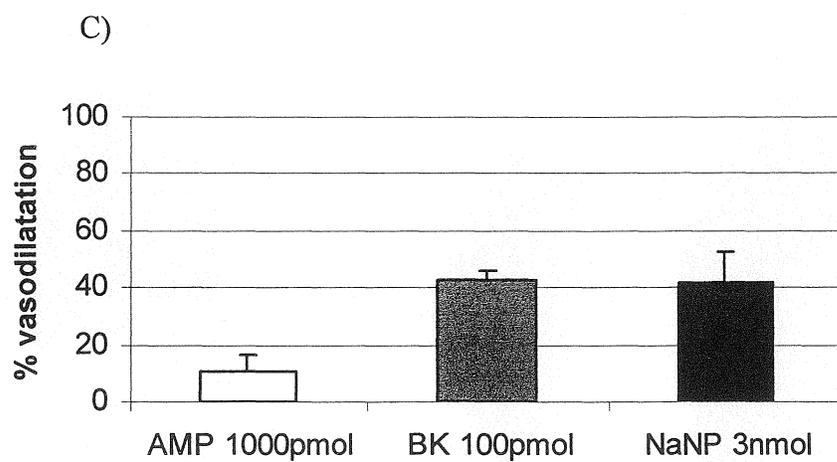
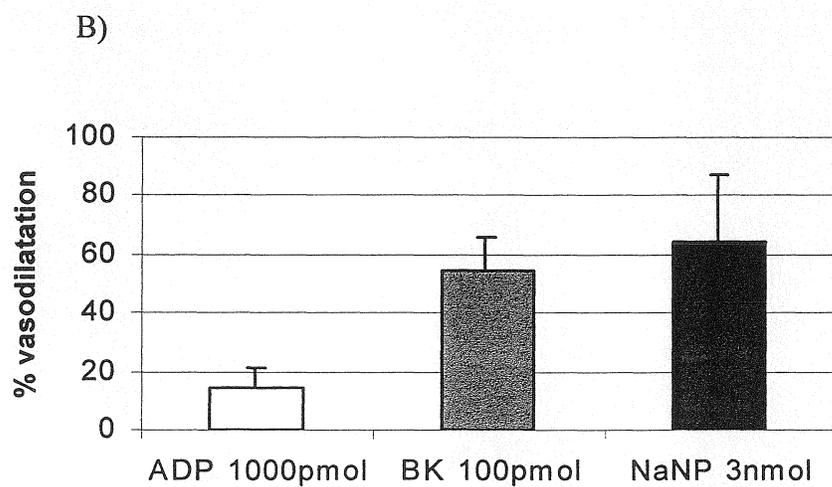
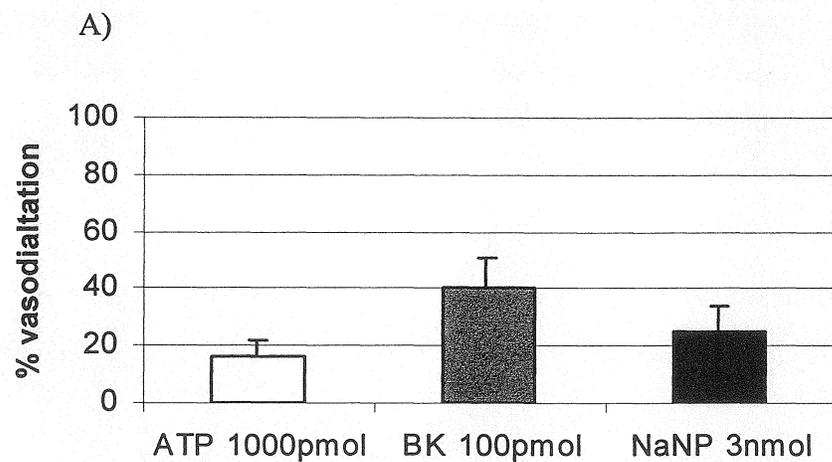


Figure 10 : Effet relaxant de l'ATP (◆), de l'ADP (□) et de l'AMP (▲) au niveau de la vascularisation mésentérique (A) artérielle et (B) veineuse de cobaye.

Chaque point indique la moyenne et les barres verticales, l'écart-type à la moyenne de 4 à 11 expériences.

Figure 11 : Démonstration de la réactivité postcapillaire à l'ATP (A), l'ADP (B), l'AMP (C), la BK et au NaNP sur des préparations précontractées au U46619 (4,2 μ M). Chaque point indique la moyenne et les barres verticales, l'écart-type à la moyenne de 4 à 7 expériences.



Afin d'évaluer la participation de l'endothélium dans cet effet relaxant, nous avons traité le tissu au CHAPS (2 x 20mM, 45 sec.) À l'exception du nitroprussiate de sodium, l'effet relaxant des autres agents est aboli dans les circuits prétraités au CHAPS (figures 12 A et B, 13 A et B, 14 A et B et 16 A et B). Nous avons également voulu vérifier si cette vasodilatation nécessitait l'implication du NO. Pour ce faire, nous avons traité le lit mésentérique au L-NAME (200 μ M). Cet inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase, réduit significativement l'effet relaxant du NK-1, de l'ATP, de ses métabolites et du CTP mais n'affecte pas la réponse au nitroprussiate de sodium (figures 12 A et B, 13 A et B, 14 A et B et 16 A et B). Les effets du CTP sont comparés à ceux de l'ATP tel qu'illustré à la figure 15. L'effet vasodilatateur de ces nucléotides semble donc être dépendant de l'endothélium au niveau de la vascularisation mésentérique artérielle.

3.1.3 Effet d'un analogue non hydrolysable de l'ATP

Étant donné que l'ATP est un composé qui est rapidement hydrolysé en produits déphosphorylés, nous souhaitons évaluer seulement la participation de l'ATP dans l'effet relaxant induit par cette purine. Or, nous avons utilisé un analogue non hydrolysable de l'ATP, le β , δ -MeATP pour comparer son effet à celui de l'ATP. À la figure 17, on constate que l'effet du β , δ -MeATP est plus efficace à faible dose que l'ATP. Cependant contrairement à l'ATP, l'effet maximal du β , δ -MeATP est atteint rapidement et entraîne la formation d'un plateau. L'ATP nous apparaît donc un vasodilatateur plus puissant que son analogue non hydrolysable.

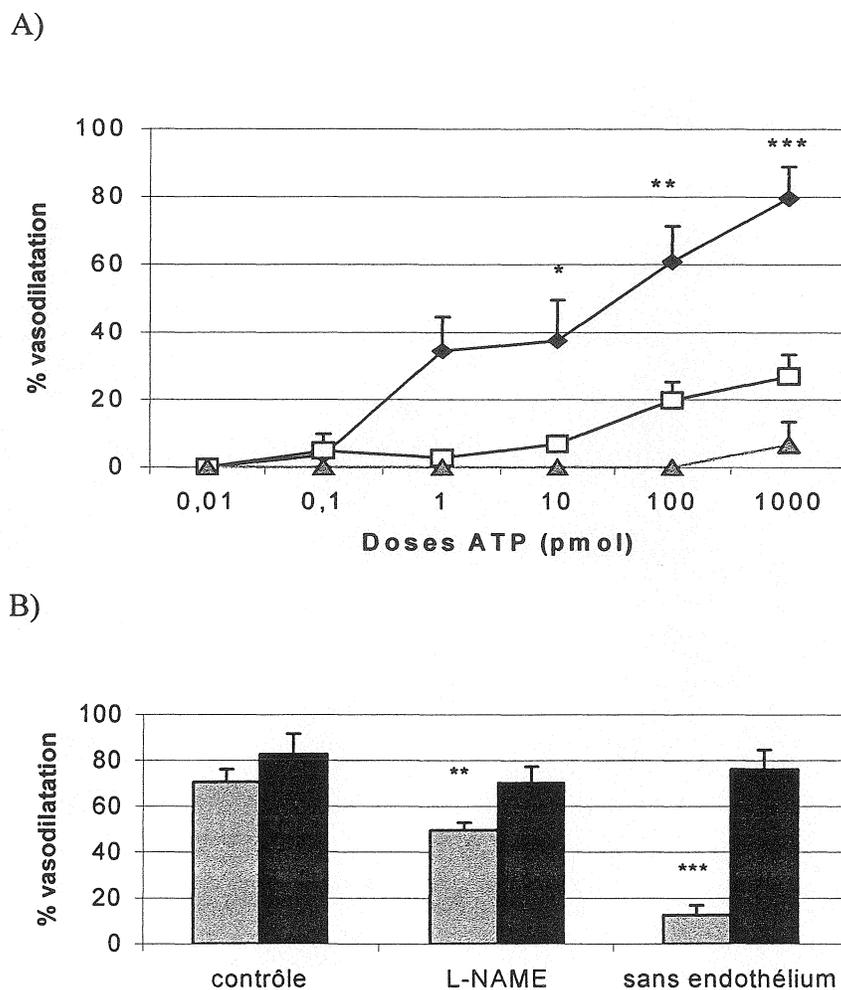


Figure 12 : A) Courbes dose-réponse de l'ATP au niveau précapillaire en absence (◆) ou en présence d'un prétraitement au L-NAME (200 μ M, 30 min.) (□) ou au CHAPS (20mM, 2x 45 sec.) (▲). B) Effet de l'agoniste NK-1 (100 pmol) (▨) et du NaNP (3nmol) (■) avec et sans traitement au L-NAME ou au CHAPS. Chaque point et colonne indique la moyenne et les barres verticales, l'écart-type à la moyenne de 4 à 10 expériences. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

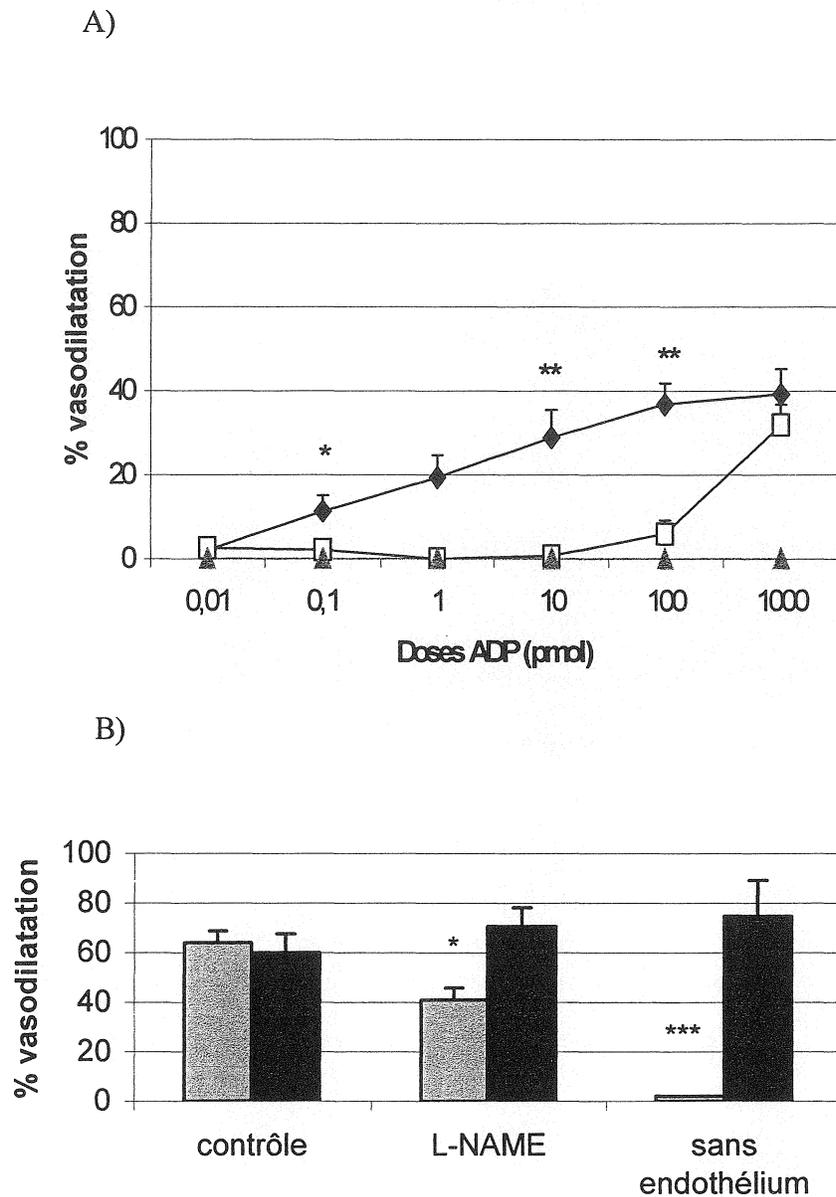


Figure 13 : A) Courbes dose-réponse de l'ADP au niveau précapillaire en absence (◆) ou en présence d'un prétraitement au L-NAME (200 μ M, 30 min.) (□) ou au CHAPS (20mM, 2x 45 sec.) (▲). B) Effet de l'agoniste NK-1 (100pmol) (▨) et du NaNP (3nmol) (■) avec et sans traitement au L-NAME ou au CHAPS. Chaque point et colonne indique la moyenne et les barres verticales, l'écart-type à la moyenne de 4 à 6 expériences. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

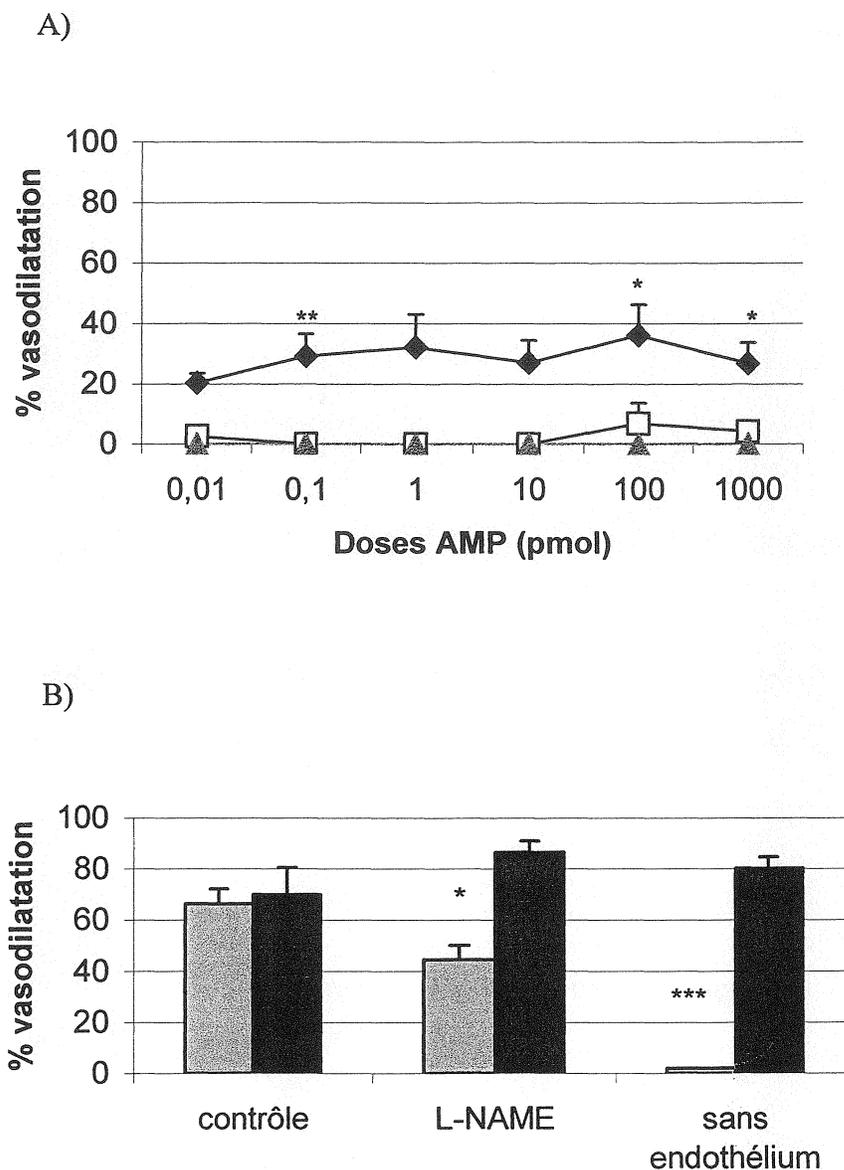


Figure 14 : A) Courbes dose-réponse de l'AMP au niveau précapillaire en absence (◆) ou en présence d'un prétraitement au L-NAME (200 μ M, 30 min.) (□) ou au CHAPS (20mM, 2x 45 sec.) (▲). B) Effet de l'agoniste NK-1 (100pmol) (▨) et du NaNP (3nmol) (■) avec et sans traitement au L-NAME ou au CHAPS. Chaque point et colonne indique moyenne et les barres verticales, l'écart-type à la moyenne de 4 à 6 expériences. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

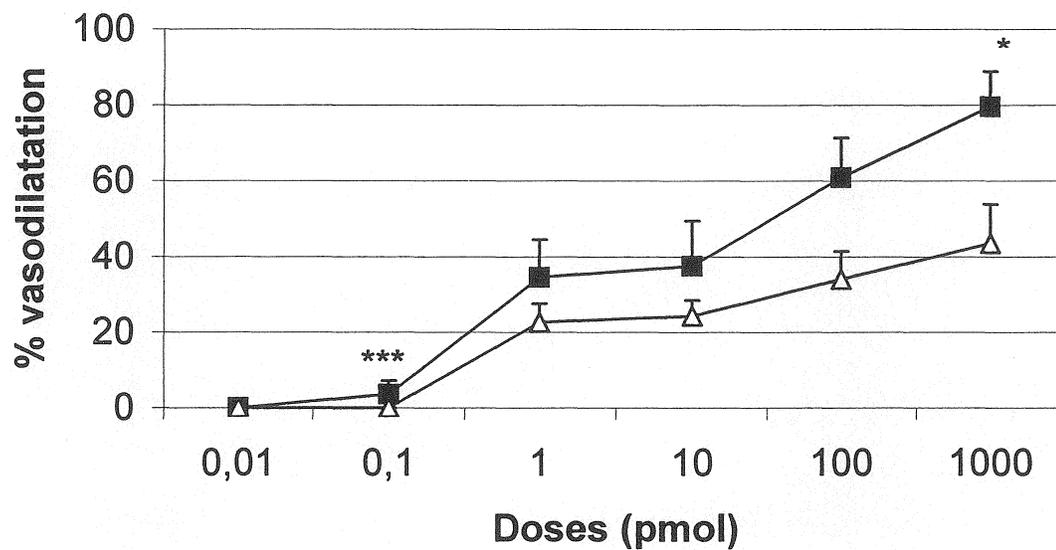


Figure 15 : Courbes comparatives entre l'ATP (■) et le CTP (Δ) au niveau de l'artère mésentérique de cobaye. Chaque point indique la moyenne et les barres verticales, l'écart-type à la moyenne de 4 à 10 expériences. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

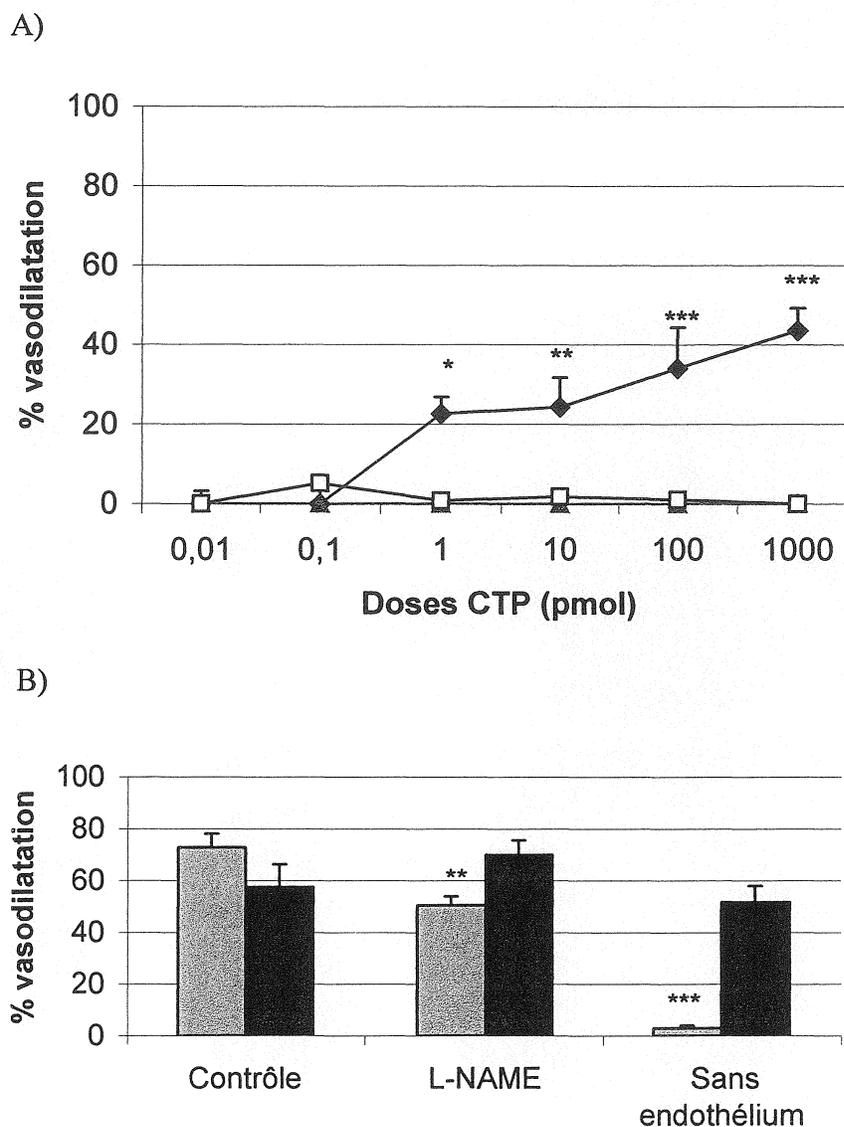


Figure 16 : A) Courbes dose-réponse du CTP au niveau précapillaire en absence (◆) ou en présence d'un prétraitement au L-NAME (200µM, 30 min.) (□) ou au CHAPS (20mM, 2x 45 sec.) (▲). B) Effet de l'agoniste NK-1 (100pmol) (▨) et du NaNP (3nmol) (■) avec et sans traitement au L-NAME ou au CHAPS. Chaque point et colonne indique la moyenne et les barres verticales, l'écart-type à la moyenne de 4 à 8 expériences. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

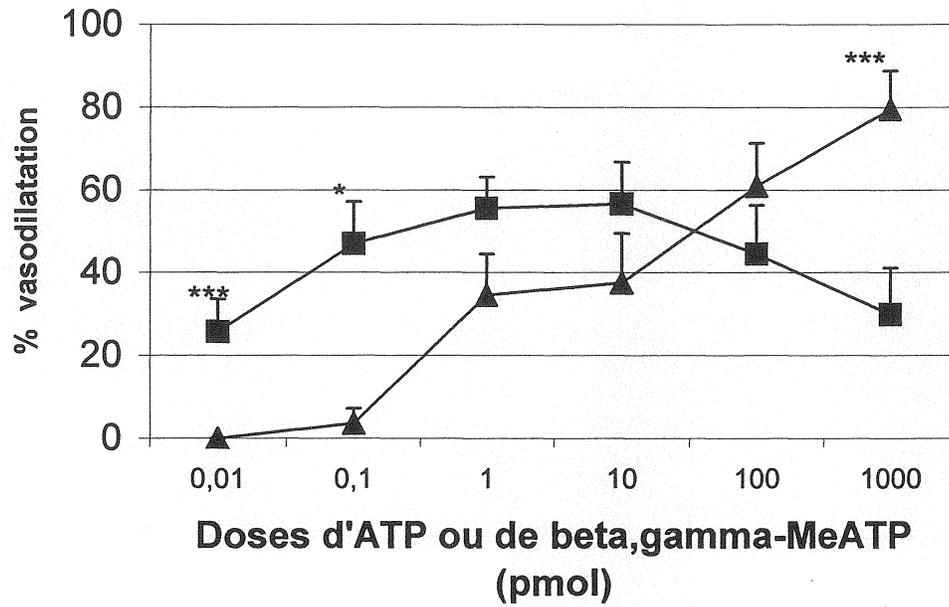


Figure 17 : Courbes comparatives entre l'ATP (▲) et le β , γ -MeATP (■) au niveau de la vascularisation artérielle. Chaque point indique la moyenne et les barres verticales, l'écart-type à la moyenne de 8 à 12 expériences. * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

3.2 CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE L'ACTIVITÉ DE LA NUCLÉOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE

Cette série d'expériences avait pour objectif de démontrer la présence d'une NTPDase fonctionnelle au niveau du lit mésentérique de cobaye. À partir d'une préparation de lit mésentérique non précontractée, nous avons infusé de l'ATP (100 μ M, 7 minutes). Des échantillons de perfusat (6ml) ont été recueillis avant, pendant et suivant l'infusion d'ATP. Ces échantillons ont été filtrés sur HPLC pour déterminer la quantité d'ATP, d'ADP et d'AMP contenue dans le perfusat, démontrant ainsi l'activité catalytique de la NTPDase. Il est à noter qu'aucune quantité de ces purines n'a été détectée au niveau basal. Ces expériences furent exécutées au niveau pré et postcapillaire.

3.2.1 Contribution de l'endothélium dans l'activité hydrolytique de la NTPDase au niveau du lit mésentérique de cobaye

Ces expériences avaient pour but d'évaluer le rôle de l'endothélium dans l'activité catalytique de la NTPDase dans les circuits mésentériques pré et postcapillaires. La figure 19 A démontre la quantité (pmol / 25 μ L) d'ATP au niveau de l'artère mésentérique de cobaye avec et sans endothélium. On peut également constater que la quantité maximale d'ATP est réduite en absence d'endothélium soit de $1484,9 \pm$

39,2 pmol / 25 μ L à 1025.7 \pm 86.9 pmol / 25 μ L, (n = 6). En ce qui concerne la quantité d'ADP au niveau précapillaire (figure 19 B, n = 6), le manque d'endothélium n'affecte pas l'hydrolyse de l'ATP en ADP. À l'opposé la quantité d'AMP, obtenue par l'hydrolyse séquentielle de l'ATP en ADP et en AMP en absence d'endothélium, est significativement réduite par rapport au contrôle (figure 19 C, n = 6). Du côté veineux, la quantité d'ATP n'est pas vraiment affectée par la déficience en endothélium (figure 20 A, n = 6). Par contre, la quantité d'ADP en absence d'endothélium est significativement plus importante qu'avec un endothélium intact. (figure 20 B, n = 6). Ceci est également très différent par rapport au côté artériel, où la quantité d'ADP n'était pas affectée par l'absence de la couche de cellules endothéliales. La quantité d'AMP en absence d'endothélium est quant à elle diminuée de façon significative par rapport au contrôle (figure 20 C, n = 6) tout comme du côté précapillaire.

3.2.2 Inhibition de la NTPDase par un prétraitement au BGO 136

À partir d'une préparation de lit mésentérique non précontractée, nous avons prétraité le mésentère avec le BGO 136 (1mM et 10 mM, 20minutes) suivi d'une infusion d'ATP (100 μ M). Cette série d'expériences a été faite dans le but d'évaluer la capacité de cet inhibiteur, à contrecarrer l'action de la NTPDase sur l'ATP. Des collectes de perfusats ont également eu lieu et ont été analysés par HPLC pour en déterminer la teneur en ATP et en ses métabolites.

Figure 18 : Concentration (pmol / 25 μ L) d'ATP (A), d'ADP (B) et d'AMP mesuré par HPLC, au niveau de l'artère mésentérique de cobaye en présence (■) ou en absence (□) d'endothélium. La collecte b est le niveau basal de ces purines avant l'infusion d'ATP. La collecte # 1 représente les collectes prises pendant une minute suite à la première minute d'infusion d'ATP; la collecte # 2 suite à la 2^e minute; la collecte # 3 suite à la 4^e minute; la collecte # 4 suite à la 6^e minute; la collecte # 5 suite à la 7^e minute; les collectes # 6 et 7 représentent les collectes prises suivant l'arrêt de l'infusion d'ATP, suite aux 1^{ère} et 2^e minutes. Chaque colonne indique la moyenne et les barres verticale, l'écart-type à la moyenne de 6 expériences. *p < 0,05, **p<0,01, ***p<0,001

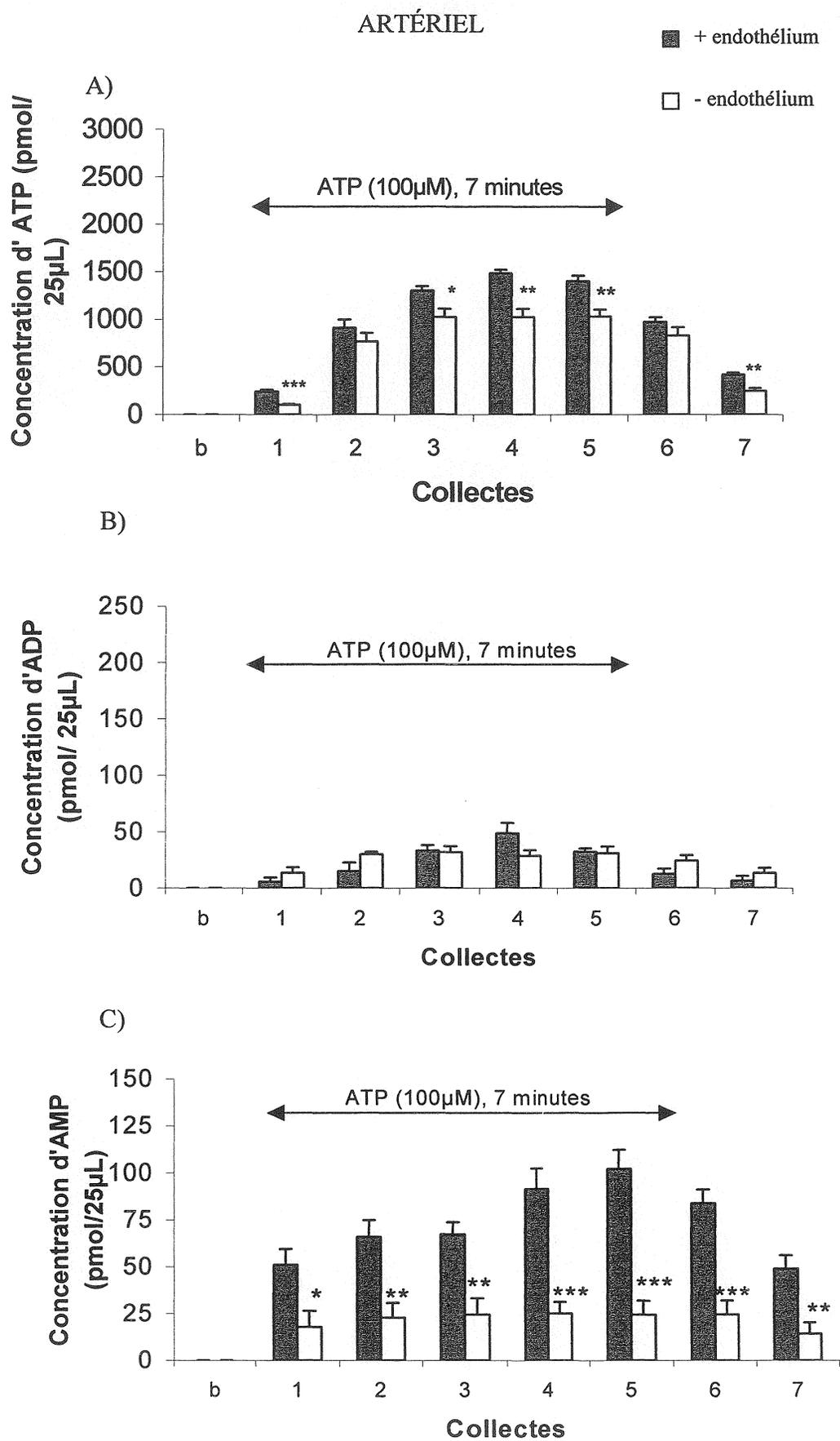
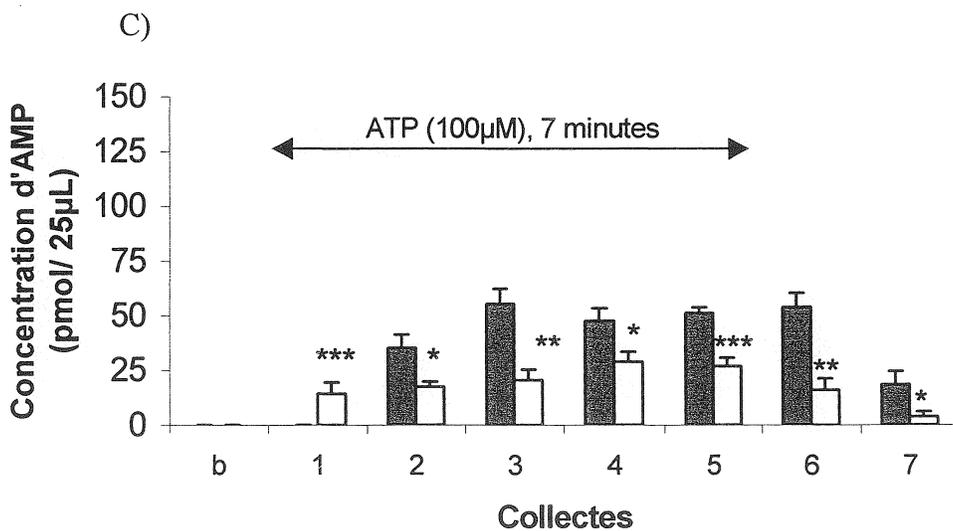
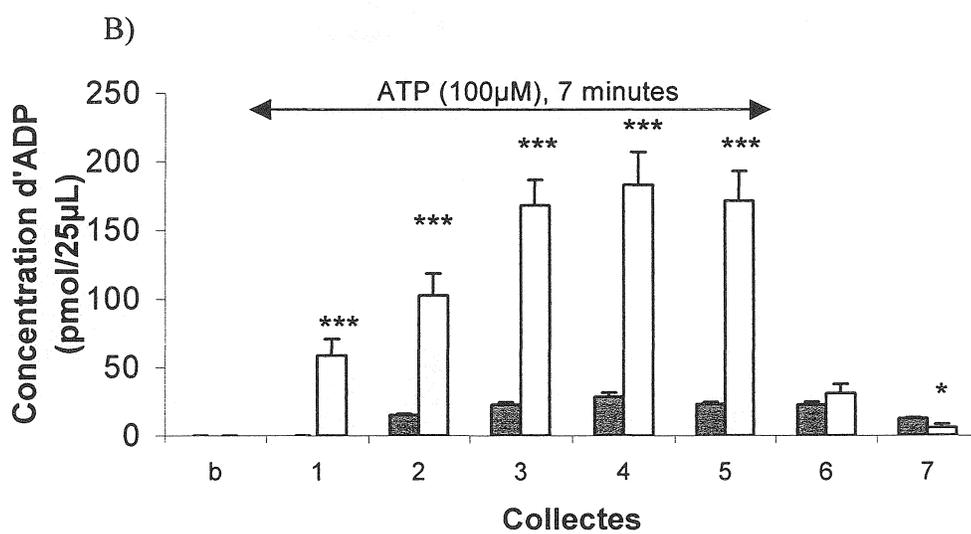
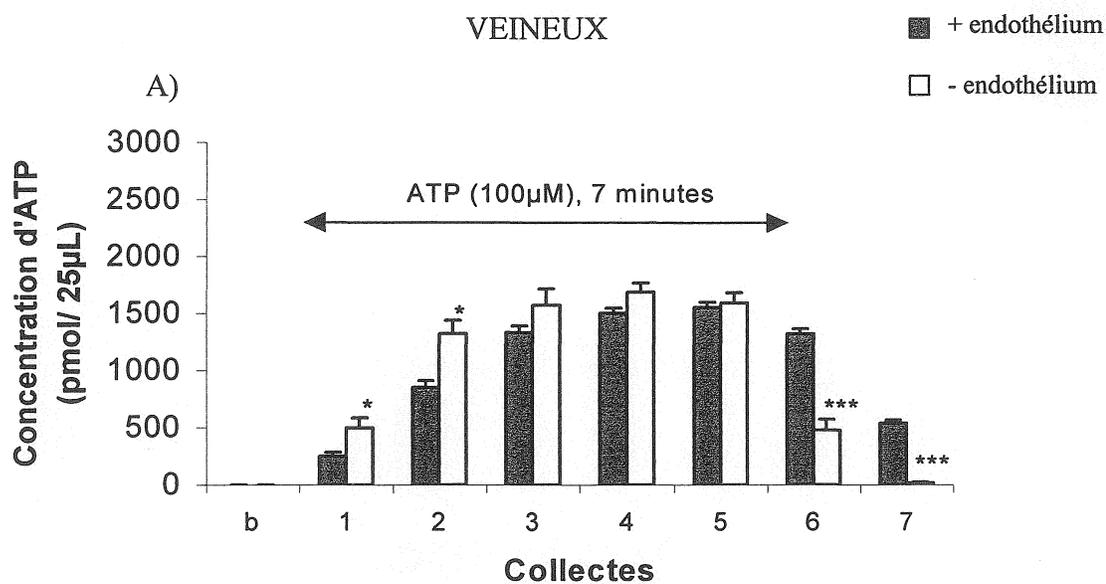


Figure 19 : Concentration (pmol / 25 μ L) d'ATP (A), d'ADP (B) et d'AMP mesuré par HPLC, au niveau de la veine mésentérique de cobaye en présence (■) ou en absence (□) d'endothélium, déterminée par HPLC. Les collectes ont été prises tel qu'expliqué à la page 60. Chaque colonne indique la moyenne et les barres verticale, l'écart-type à la moyenne de 6 expériences. *p < 0,05, **p<0,01, *p<0,001**



3.2.2.1 Prétraitement au BGO 136 1mM

Nous avons procédé à ces expériences dans le but d'évaluer l'efficacité du BGO 136 (1mM) à inhiber la NTPDase. Au niveau artériel, la quantité d'ATP obtenue après un prétraitement au BGO 136 (1mM) n'a pas été influencée par rapport au contrôle (figure 21 A, n =6). Il en est de même pour la quantité d'ADP (figure 21 B, n = 6). C'est seulement au niveau de la quantité d'AMP que le prétraitement semble avoir eu un peu d'effet, c'est-à-dire que l'on observe une réduction de la proportion d'AMP en présence de BGO 136 par rapport au contrôle (figure 21 C, n = 6). Au niveau veineux, ce prétraitement au BGO 136 1mM n'a pas vraiment modifié les quantités d'ATP et de ses métabolites (figures 22 A, B et C, n = 6 chacun). Étant donné ces résultats, nous constatons que l'enzyme demeure capable de dégrader l'ATP en ADP et en AMP lorsque prétraité au BGO 136 à une concentration 1mM. Nous avons donc opté de reprendre ces mêmes expériences mais en haussant la concentration de BGO 136 de dix fois.

3.2.2.2 Prétraitement au BGO 136 10mM

Avec ce groupe d'expériences nous souhaitons démontrer l'inhibition de la NTPDase par l'emploi du BGO 136 10mM. Au niveau précapillaire, on constate qu'il y a une augmentation significative de la quantité d'ATP lors du prétraitement au BGO 136 par rapport au contrôle (figure 23 A, n = 6). Ce même phénomène est observable pour la teneur en ADP (figure 23 B, n = 6). Cependant, la quantité d'AMP est quant à elle significativement réduite en présence de BGO 136 10mM comparativement au contrôle

(figure 23 C, n = 6). De plus, on constate que ce prétraitement à le même effet au niveau postcapillaire. Les quantités d'ATP et d'ADP sont significativement plus importante en présence de BGO 136 10mM comparativement au contrôle (figures 24 A et 24 B n = 6 chacun). Ainsi, la quantité d'AMP est diminuée de manière significative en présence du BGO 136 (figure 24 C, n= 6). Or, c'est résultats on fait la preuve que le BGO 136 à une concentration de 10mM est en mesure de contrecarrer l'activité catalytique de la NTPDase.

Figure 20 : Concentration (pmol / 25 μ L) d'ATP (A), d'ADP (B) et d'AMP mesuré par HPLC au niveau de la vascularisation précapillaire en absence (■) ou en présence (□) d'un prétraitement au BGO 136 (1 mM, 20 minutes). Les collectes ont été prises tel qu'expliqué à la page 60. Chaque colonne indique la moyenne et les barres verticale, l'écart-type à la moyenne de 6 expériences. *p < 0,05, *p<0,001**

ARTÉRIEL

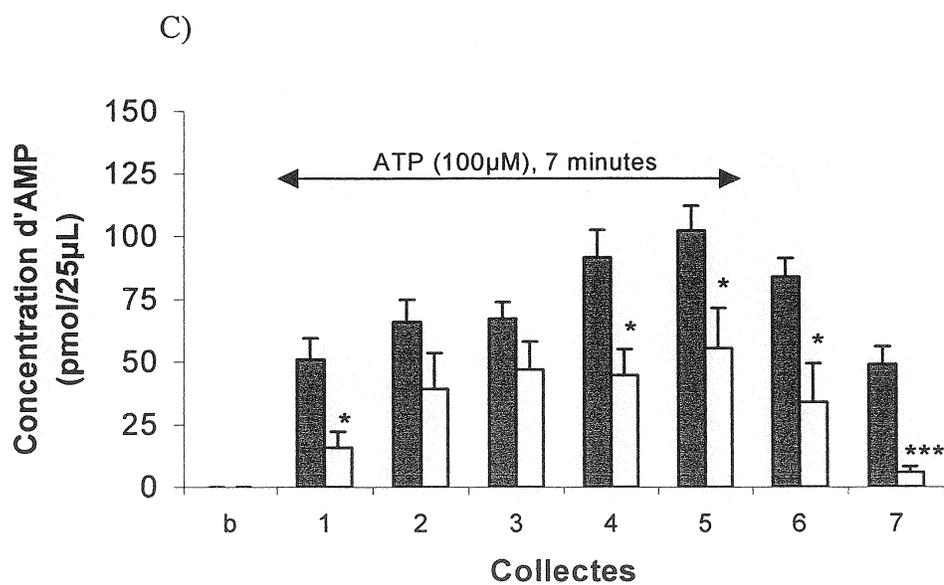
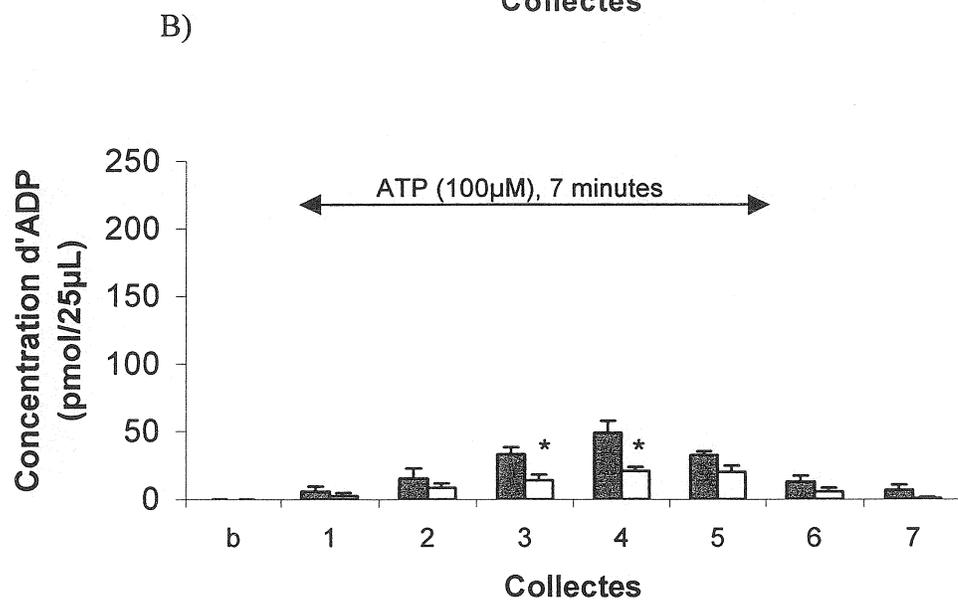
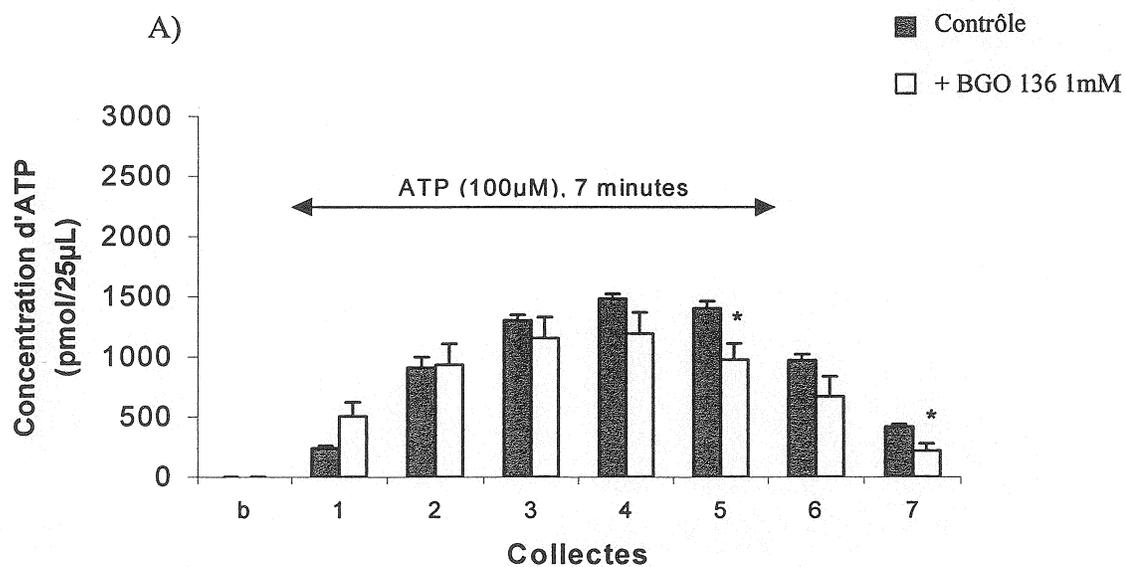


Figure 21 : Concentration (pmol / 25 μ L) d'ATP (A), d'ADP (B) et d'AMP mesuré par HPLC, au niveau de la vascularisation postcapillaire en absence (■) ou en présence (□) d'un prétraitement au BGO 136 (1 mM, 20 minutes). Les collectes ont été prises tel qu'expliqué à la page 60. Chaque colonne indique la moyenne et les barres verticale, l'écart-type à la moyenne de 6 expériences. *p < 0,05, ***p<0,001

VEINEUX

■ Contrôle

□ + BGO 136 1mM

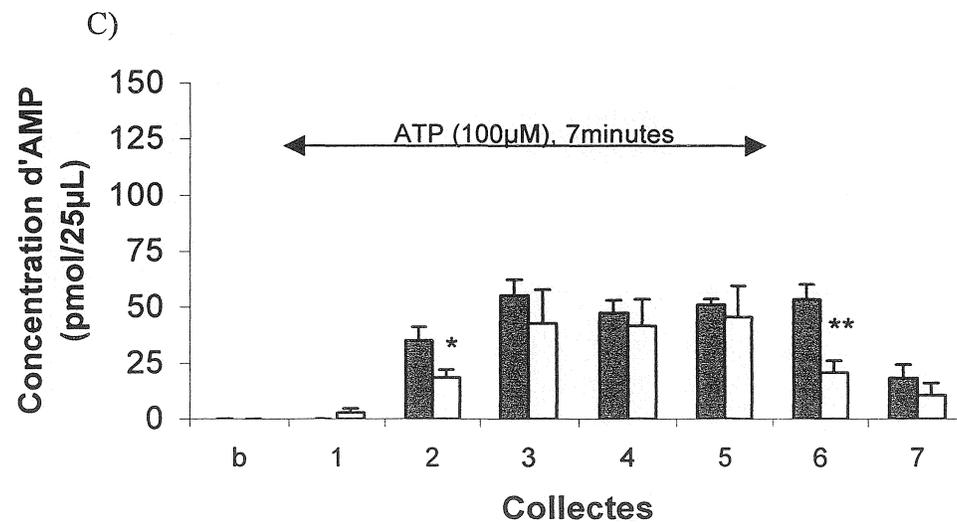
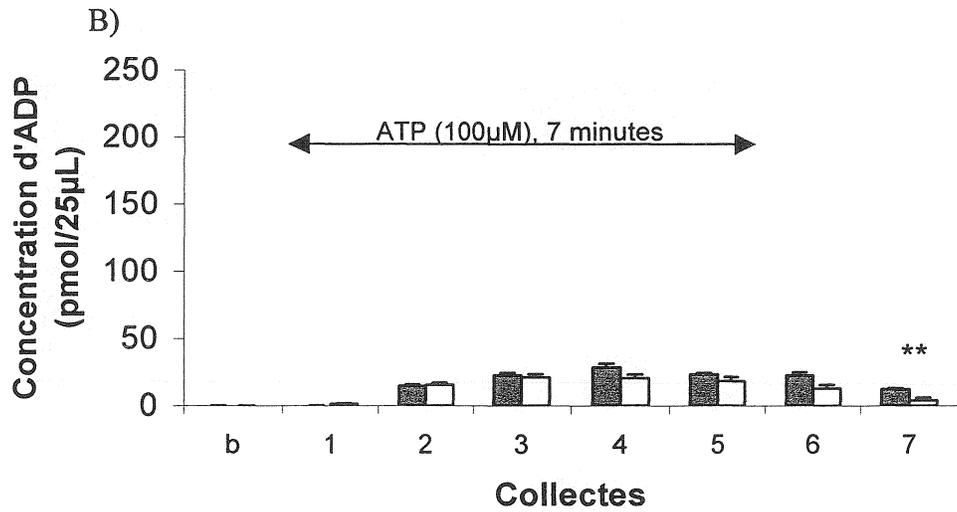
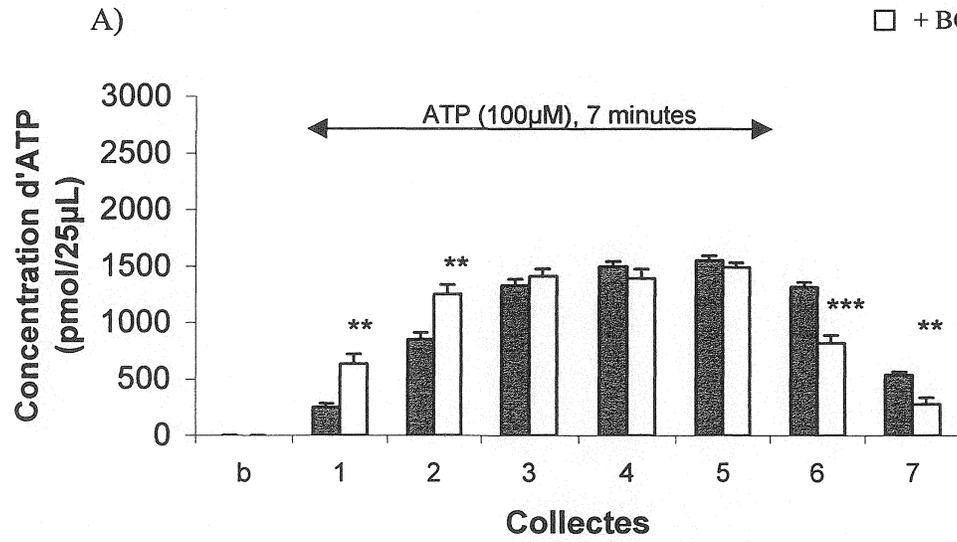


Figure 22 : Concentration (pmol / 25 μ L) d'ATP (A), d'ADP (B) et d'AMP mesuré par HPLC, au niveau de la vascularisation précapillaire en absence (■) ou en présence (□) d'un prétraitement au BGO 136 (10 mM, 20 minutes). Les collectes ont été prises tel qu'expliqué à la page 60. Chaque colonne indique la moyenne et les barres verticale, l'écart-type à la moyenne de 6 expériences. *p < 0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

ARTÉRIEL

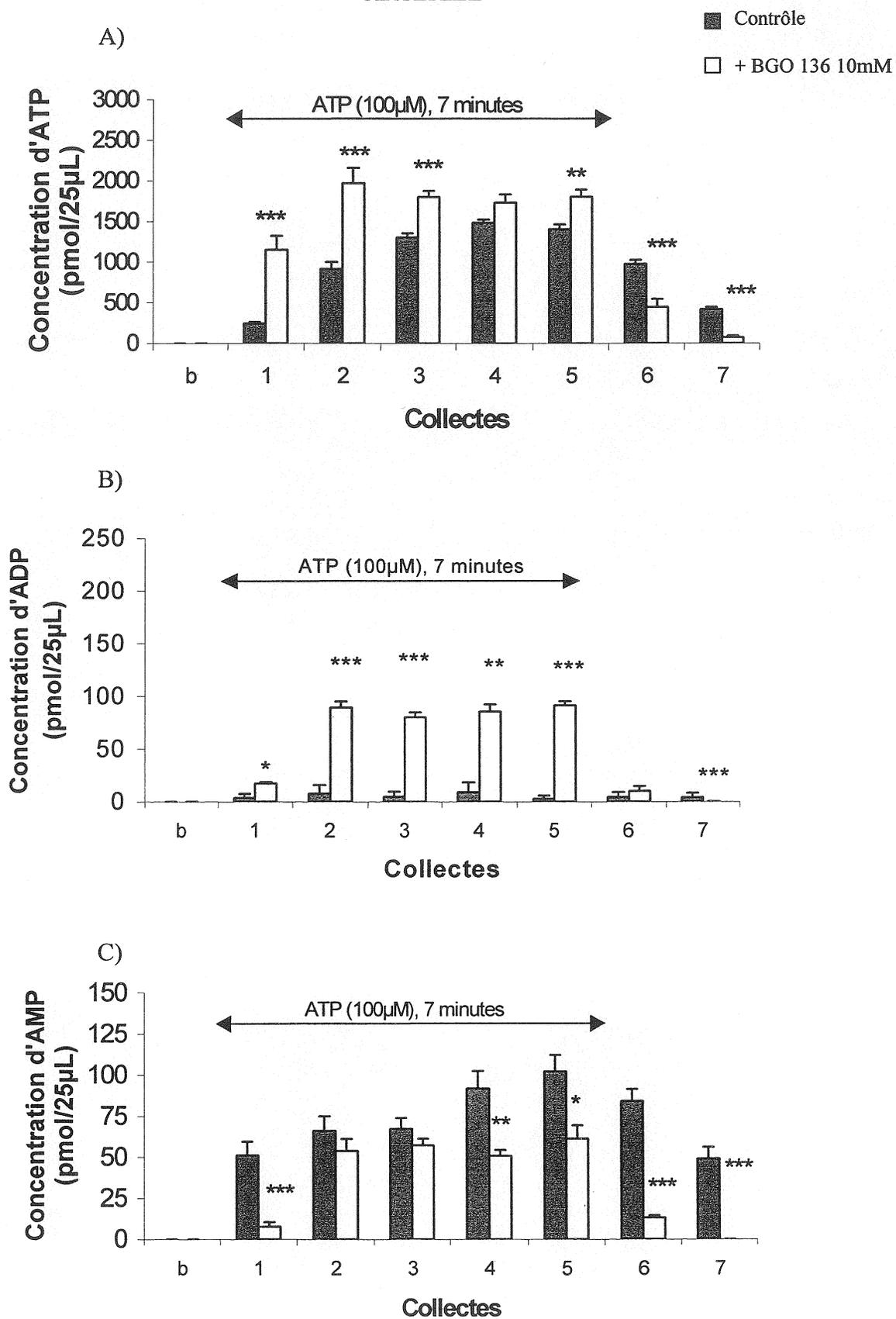
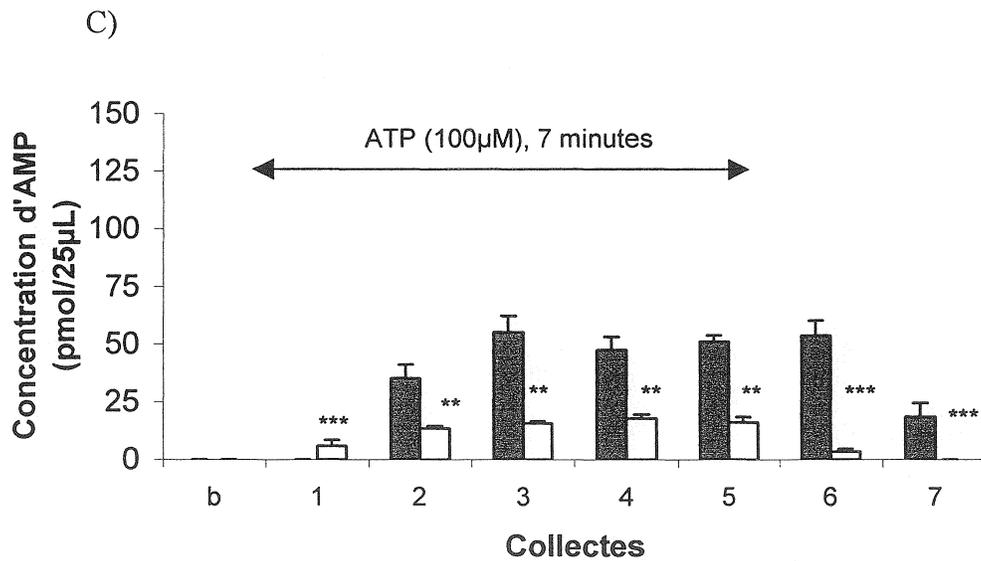
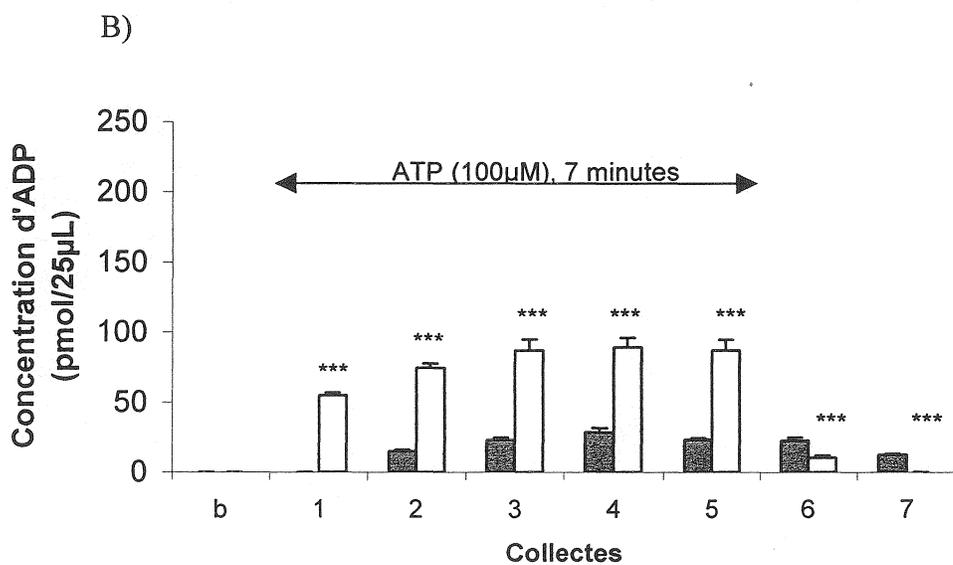
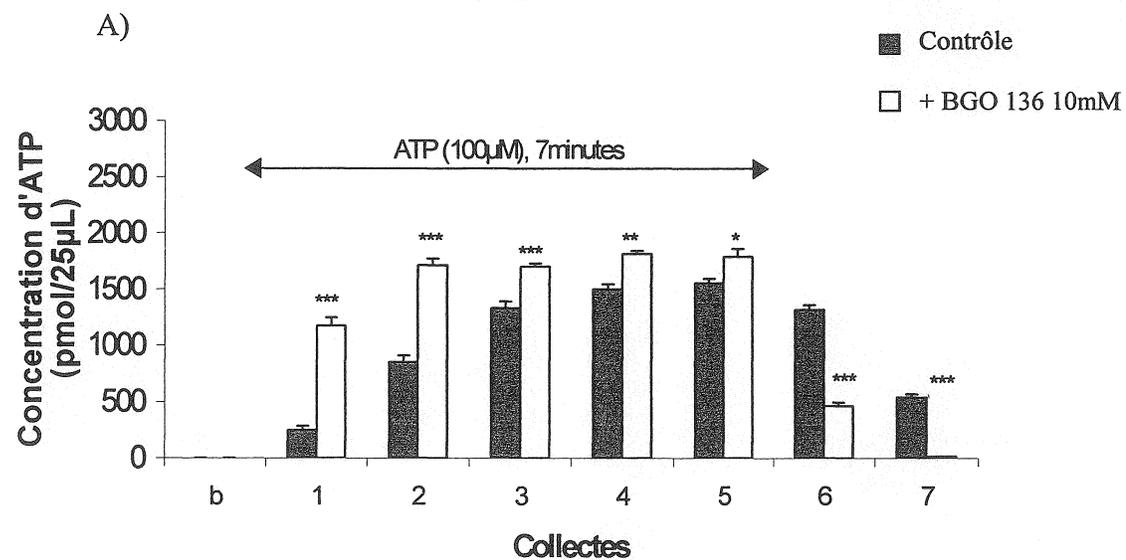


Figure 23 : Concentration (pmol / 25 μ L) d'ATP (A), d'ADP (B) et d'AMP mesuré par HPLC, au niveau de la vascularisation postcapillaire en absence (■) ou en présence (□) d'un prétraitement au BGO 136 (10 mM, 20 minutes). Les collectes ont été prises tel qu'expliqué à la page 60. Chaque colonne indique la moyenne et les barres verticale, l'écart-type à la moyenne de 6 expériences. *p < 0,05, ** p<0,01, *p<0,001**

VEINEUX



DISCUSSION

La présente étude a permis d'identifier un rôle significatif de l'endothélium dans les effets vasodilatateurs des nucléotides extracellulaires. De plus, l'endothélium et la NTPDase jouent un rôle qualitativement différent au niveau pré et postcapillaire en ce qui concerne le métabolisme de l'ATP tel que résumé au tableau 5.

Nous avons tout d'abord comparé l'effet de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP au niveau artériel et veineux. Nous avons observé un effet relaxant sur les deux types de préparations. Cependant au niveau veineux, l'action vasodilatatrice de l'ATP et de ses métabolites fut très faible comparativement au niveau artériel où l'on observe un effet relaxant dose-dépendant (du moins pour l'ATP et l'ADP). L'on croit que ceci pourrait s'expliquer par la différence de structure de ces vaisseaux, c'est-à-dire qu'il y a beaucoup moins de fibre musculaire lisse entourant les vaisseaux veineux qu'artériels ou encore par une dissimilitude de la distribution des purinocepteurs. Étant donné ces résultats, nous nous sommes seulement intéressés aux effets artériels de ces purines en ce qui concerne la partie caractérisation pharmacologique de cette étude.

Il existe plusieurs contradictions dans la littérature en rapport à l'effet relaxant de l'ATP. Certains prétendent que cet effet est indépendant de l'endothélium (KATO et

	PRÉCAPILLAIRE			POSTCAPILLAIRE		
	Avec endothélium	Avec BGO 136 10mM	Sans endothélium	Avec endothélium	Avec BGO 136 10mM	Sans endothélium
ATP	↑↑	↑↑↑↑	↑↑	↑↑	↑↑↑↑	↑↑
ADP	↑↑	↑↑↑↑	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑↑
AMP	↑↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑	↑↑↑

Tableau 5 Résumé qualitatif des quantités de nucléotides déterminées par HPLC suite à l'infusion d'ATP (100 μ M) dans la vascularisation mésentérique pré et postcapillaire de cobaye

↑ : Niveau faible de purines

↑↑ : Niveau moyen de purines

↑↑↑ : Niveau élevé de purines

↑↑↑↑ : Niveau très élevé de purines

al, 1999; GARCIA-VELASCO et al, 1995) alors que d'autres disent le contraire (RALEVIC et al, 1996; RUBINO et al, 1999). Or, nous nous sommes penchés sur la question. Premièrement, nous avons inhibé la cyclooxygénase, enzyme responsable de la formation des prostanoides, à l'aide de l'indométhacine et inhibé la production de NO en traitant la préparation artérielle mésentérique au L-NAME. Ceci a réduit d'environ 50 % les capacités vasodilatatrices de l'ATP sur la préparation artérielle. Ces résultats confirment également que l'activation des récepteurs P2Y par l'ATP induit la relâche d'oxyde nitrique et de prostacycline dans notre modèle expérimental. En ce qui concerne l'ADP, l'effet relaxant est moins important que dans le cas de l'ATP. Alors suite au traitement au L-NAME, on remarque que l'inhibition de la vasorelaxation est quasi complète à l'exception de la dose la plus forte (1000 pmol). Les effets de l'AMP sont moins importants que ceux de l'ATP et ne sont pas tout à fait dépendants de la dose. Tout comme l'ADP, l'action vasodilatatrice de l'AMP est significativement réduite par un traitement au L-NAME. Ces observations pourraient s'expliquer par le fait que ces deux purines sont plus rapidement métabolisées en adénosine que l'ATP, ce qui diminue leur temps d'action. De plus, il semblerait que la relaxation induite par l'ADP et l'AMP est en partie dépendante de la libération d'oxyde nitrique par l'endothélium vasculaire.

Concernant le CTP, nous avons aussi observé un effet relaxant dose-dépendant bien que moins important que celui induit par l'ATP. Par contre, cet effet devient négligeable lors d'un traitement au L-NAME, tout comme l'ADP et l'AMP. Il est à noter qu'aucun pyrimidinocepteur au CTP n'a été identifié jusqu'à maintenant. Or, l'action vasorelaxante que nous avons démontré suggère la présence d'un tel récepteur

au niveau de l'endothélium dans notre système. Il serait également plausible que le CTP puisse exercer son action via l'activation d'un purinocepteur sensible au L-NAME.

Dans chacun des cas, l'action vasorelaxante de ces trois purines et du CTP a été abolie par l'élimination de la couche de cellules endothéliales. Ce phénomène est également observé au niveau de l'artère mésentérique de hamster (RAVELIC et al, 1996). Nous pouvons donc affirmer qu'au niveau de l'artère mésentérique de cobaye, l'ATP, l'ADP et l'AMP ont un effet vasodilatateur endothélium dépendant. Cependant, nous ne pouvons pas identifier le facteur responsable de la relaxation induite par l'ATP. On peut seulement suggérer que la PGI₂ et le NO contribuent partiellement à cette relaxation. Ceci suggère l'implication de l'EDHF comme proposé par le groupe de MALMSJO et al (2000) au niveau de l'artère mésentérique de rat. Nous suggérons donc que l'effet relaxant de l'ATP en présence d'endothélium serait régi par la libération de l'oxyde nitrique, de la prostacycline et de l'EDHF suite à l'activation des purinocepteurs P2Y retrouvés au niveau des cellules endothéliales.

Étant donné ces derniers résultats, nous avons voulu tester l'effet d'un analogue non hydrolysable de l'ATP, le β,δ -MeATP. En comparant ses effets à ceux de l'ATP, nous avons constaté une atteinte rapide de l'effet maximal suivie d'une diminution de la relaxation induite par l'analogue. En effet, ce plateau est obtenu aux doses de 1 pmol et de 10 pmol, tandis qu'à 1000 pmol l'ATP n'a pas encore atteint son effet maximum. La

coexistence de plusieurs sous-types P2Y au niveau de l'endothélium mésentérique fut démontré (BOARDER et HOURANI, 1998). Il serait donc possible que le β,δ -MeATP et l'ATP agissent sur des purinocepteurs différents, ce qui pourrait expliquer de tels résultats. Une autre possibilité serait que la vasodilatation induite par le β,δ -MeATP soit médiée par l'activation des purinocepteurs de type P1, étant donné la lente dégradation du β,δ -MeATP en adénosine. Ceci a également été observé chez le rat (DELBRO et BURNSTOCK, 1987). De plus, comme le β,δ -MeATP est lentement dégradé, il serait possible que ceci entraîne une désensibilisation des purinocepteurs. Cela pourrait expliquer la diminution de la réponse aux doses plus élevées. La vasodilatation semblerait donc plus importante lorsque l'ATP, à plus fortes doses, peut être rapidement convertit en ADP et en AMP.

Il est à mentionner que l'efficacité de chaque traitement au CHAPS ou au L-NAME fut évalué par des contrôles internes. En effet, nous avons utilisé le $[\text{Sar}^9(\text{MetO}_2)^{11}]$ SP et la bradykinine pour vérifier l'inhibition de la relaxation NO-dépendante et endothélium-dépendante. Le nitroprussiate de sodium a quant à lui été employé pour s'assurer de l'intégrité des tissus et ainsi évaluer les propriétés vasodilatatrices qui ne dépendent pas de l'endothélium.

L'effet de l'ATP a aussi été étudié chez l'animal anesthésié. Chez le rat, de telles études ont démontré que l'ATP, l'adénosine et le β,δ -MeATP induisent un effet hypotenseur (DELBRO et BURNSTOCK, 1987). Les diadénosines polyphosphates

provoquent également une baisse de la pression artérielle chez le rat anesthésié (KHATTAB et al, 1998). Le groupe de KIEN, et al (1987) ont prouvé par des études *in vivo* chez le chien que l'ATP induit une diminution de la pression artérielle systémique. Chez le cobaye, ces effets n'ont pas encore été démontré. Par contre, des résultats préliminaires établis par nos collaborateurs, semblent indiquer que l'ATP et l'adénosine induiraient une baisse de la pression artérielle moyenne chez le cobaye anesthésié. Cependant, nous retrouvons dans la littérature que l'ATP administré aux cobayes anesthésiés, produit une bronchodilatation dose-dépendante (VENUGOPALAN et al, 1986). Toujours au niveau pulmonaire, il fut constaté que l'ATP exogène serait impliqué dans le transport mucociliaire (SAANO et al, 1992). En effet, ce groupe a démontré qu'une infusion intraveineuse d'ATP (1mg/kg), chez le cobaye anesthésié, augmente de 29% la fréquence des battements ciliaires. Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés aux effets de l'ATP au niveau de la cochlée chez le cobaye. Parmi ceux-ci, le groupe de MUNOZ et al (1999) ont fait la preuve que l'ATP et l'adénosine augmentent le flux sanguin cochléaire. Cette équipe soutient donc que l'ATP et ces métabolites jouent un rôle modulateur sur le flux sanguin cochléaire qui serait possiblement médié par les purinocepteurs P1 et P2.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons mis au point une méthode analytique par HPLC nous permettant de quantifier les taux d'ATP, d'ADP et d'AMP contenus dans les échantillons de perfusats. Afin de développer une telle technique, nous nous sommes inspirés des travaux fait par l'équipe de TEKKANAT et al (1988). Cette méthode a donc l'avantage de quantifier ces trois purines à la fois comparativement à une méthode de chimioluminescence tel que la technique de luciférine-luciférase,

employée pour le dosage simple de l'ATP. C'est donc par l'élaboration de ce nouveau procédé et l'application des méthodes habituelles de séparation de produits par HPLC, que nous avons pu cerner la présence de la nucléoside triphosphate diphosphohydrolase et d'évaluer son activité au niveau de l'artère et de la veine mésentérique de cobaye.

Nous avons tout d'abord voulu vérifier si la présence d'endothélium influence ou non l'activité catalytique de la NTPDase. Nous avons clairement démontré la présence d'une NTPDase capable de métaboliser l'ATP en ses dérivés di et mono phosphorylés, au niveau pré et postcapillaire en présence d'endothélium. En absence d'endothélium, on remarque une diminution significative de la quantité d'AMP au niveau de la vascularisation artérielle. Ceci pourrait s'expliquer par une augmentation d'activité de la 5'-nucléotidase qui convertit l'AMP en adénosine. Ceci fait la démonstration du rôle cytoprotecteur de la 5'-nucléotidase qui semble d'autant plus important en absence d'endothélium. Au niveau de la veine mésentérique de cobaye, nous avons décelé l'existence d'une NTPDase au niveau du muscle lisse vasculaire ayant une forte activité ATPasique. Comme mentionné précédemment, il existe trois isoformes de la NTPDase qui sont probablement le résultats de modifications post-transcriptionnelles et/ou d'épissages alternatifs (SÉVIGNY et al, 1997 b). Or, des mutations ou des délétions d'acides aminés dans les régions conservées de ces isoformes, amènent une perte et/ou une modification de l'activité de la NTPDase (GRINTHAL et GUDOTTI, 2000). Ceci serait une explication plausible du résultat obtenu au niveau de la veine mésentérique dénudée de son endothélium. La diminution significative de la quantité d'AMP, dans ce cas-ci, semblerait être la résultante du faible taux d'activité ADPasique. À l'aide de

techniques biochimiques et immunologiques, ces dernières hypothèses pourraient être vérifiées.

Afin de déterminer la présence de la NTPDase, nous avons utilisé le BGO 136, un inhibiteur mixte de cette enzyme. Nous avons débuté cette étude en employant une concentration de 1mM de BGO 136. Nous nous sommes aperçus que cette concentration n'affectait pas la NTPDase de façon efficace. C'est pourquoi nous avons augmenté la concentration de BGO 136 à 10 mM et repris ces mêmes expériences. Alors, nous avons fait la preuve qu'un prétraitement au BGO 136 10mM entraîne l'accumulation d'ATP ainsi que d'ADP et il va de soit, une réduction de la quantité d'AMP tant au niveau artériel que veineux. En d'autres termes le BGO 136 a inhibé les propriétés ATPasique et ADPasique de la NTPDase réduisant ainsi les quantités d'AMP, produit majeur de l'hydrolyse séquentielle de l'ATP. Il a été démontré que le BGO 136 a aussi la capacité d'inhiber la 5'-nucléotidase (GENDRON et al, 2000). Cela pourrait également expliquer la présence d'AMP extracellulaire au niveau de la vascularisation mésentérique artérielle et veineuse lors d'un prétraitement au BGO 136. Suite à ces résultats, nous pourrions nous demander quel serait l'effet d'un prétraitement au BGO 136 10 mM sur des préparations pré et postcapillaires dénudées de leur endothélium. À notre avis, l'effet le plus marquant du côté artériel serait une hausse de la concentration d'AMP. En effet, nous avons démontré qu'en absence d'endothélium la 5'-nucléotidase, qui convertit l'AMP en adénosine, semble être très active. Or, comme mentionné précédemment, le BGO 136 a la capacité d'inhiber l'activité de la 5'-nucléotidase. Il ne serait donc pas étonnant d'observer une hausse du taux d'AMP au niveau artériel dans une telle situation. Du côté de la vascularisation veineuse, nous croyons que la conséquence

majeure serait une augmentation du taux d'ATP. Nous avons montré qu'une absence d'endothélium stimule une NTPDase à forte activité ATPasique. Alors, un traitement au BGO 136 pourrait inhiber cette activité ATPasique ce qui aurait pour effet d'augmenter le taux d'ATP par rapport au contrôle.

En fonction de nos résultats, il est possible de spéculer sur l'impact que pourrait avoir un endothélium altéré sur les taux circulants de nucléotides extracellulaires. La nette résultante d'un endothélium dysfonctionnel serait une augmentation très significative des taux circulants d'ADP et d'AMP dans la circulation postcapillaire. Puisque l'ADP possède des activités proagrégantes et chimiotactiques, il pourrait donc induire une augmentation des processus inflammatoires et thrombogéniques dans les circulations postcapillaires. Un débalancement de l'équilibre thrombogénique / thrombolytique pourrait en résulter. Le même type de considération peut être envisagé dans des conditions d'inhibition chronique de la NTPDase, alors que ceci pourrait augmenter significativement les taux circulants d'ATP et d'ADP au niveau pré et post capillaire.

Toutefois pour confirmer ces considérations physiopathologiques, il serait important de valider l'influence de la NTPDase et de l'endothélium sur les nucléotides extracellulaires au niveau des capillaires, sites des mécanismes d'extravasation plasmatique, des variations de pressions hydrostatiques et des échanges protéiques et ioniques entre les compartiments extra et intravasculaires.

CONCLUSION

Nous avons démontré que la vasodilatation induite par l'ATP est dépendante de l'endothélium. De plus nous suggérons que cet effet relaxant induit par l'ATP, est la résultante de l'activation du purinocepteur P2Y qui induit la relâche de prostacycline, d'oxyde nitrique et de EDHF par l'endothélium. Dans le cas de l'ADP et de l'AMP l'induction de la libération d'oxyde nitrique par les cellules endothéliales, serait l'événement majeur médiant l'effet relaxant stimulé par ces nucléotides.

Nous avons caractérisé de façon biochimique la présence et la fonctionnalité de la NTPDase au niveau de l'artère et de la veine mésentérique de cobaye. Ceci a été possible par l'emploi de préparation artérielle et veineuse intacte et dénudée de leur endothélium ainsi qu'avec l'utilisation d'inhibiteur de la NTPDase. Nous avons également mis en évidence que le type d'isoforme de la NTPDase identifié au niveau artériel est différent de celui que l'on retrouve au niveau veineux.

Les observations présentés dans cette étude devraient permettre une meilleure compréhension des effets vasoactifs des nucléotides extracellulaires au niveau pré et postcapillaires. De plus, par les informations apportés sur la NTPDase et son inhibiteur, on peut envisager que celles-ci pourraient être utile aux développements d'inhibiteurs de la NTPDase pour traiter certaines maladies telles que le cancer et les maladies auto-

immunes. En effet, certains types de cellules cancéreuses surexpriment la NTPDase à leur surface et il semblerait que cette présence protégerait ces cellules du système immunitaire de l'hôte (CLIFFORD et al, 1997; DZHANDZHUGAZYAN et al, 1998). En plus des propriétés ci-haut mentionnées, la NTPDase pourrait jouer un rôle important dans la modulation du tonus vasculaire et dans l'équilibre thrombolytique / thrombogénique.

Une des limitations de la présente étude, consiste en l'absence de corrélation entre les activités de la NTPDase *in vitro* et celles qui prévalent *in vivo* chez l'animal. Néanmoins, nos résultats démontrent que le métabolisme de l'ATP est qualitativement différent dans la circulation artérielle et veineuse. Ceci constitue, à notre avis, un premier jalon dans la compréhension du métabolisme des nucléotides extracellulaires dans un circuit vasculaire intact.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs de travaux de maîtrise, le Dr. Pedro D'Orléans-Juste et le Dr. Ghassan Bkaily pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires, pour leur confiance et aussi de m'avoir permis d'être autonome dans l'exécution de mes travaux.

Je remercie également nos collaborateurs, le Dr. Adrien Beaudoin pour son enthousiasme, pour ses idées et ses encouragements. Merci aussi à Fernand-Pierre Gendron et à Johanne Proulx .

J'aimerais remercier le Dr. Witold Neugebauer pour son support technique et moral.

Je remercie mes collègues de travail avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir.

Je remercie ma famille pour leur encouragement et spécialement Frédéric pour avoir été présent durant les bons moments et les périodes plus difficiles.

Finalement, je remercie les membres du jury : les Drs. Adrien Beaudoin, Haroutioun Hassessian, Ghassan Bkaily et Pedro D'Orléans-Juste pour avoir accepté de réviser ce mémoire de maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

AGTERESCH, H.J., LEIJ-HALFWERK, S., VAN DEN BERG, J.W.O., HORDIJK-LUIJK, C.H., WILSON, J.H.P. et DAGNELIE, P.C. (2000) Effects of ATP infusion on glucose turnover and gluconeogenesis in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clinical Science* **98: 689-695.**

ALLEN, T.G. et BURNSTOCK, G. (1990) The actions of adenosine 5'-triphosphate on guinea-pig intracardiac neurones in culture. *Br. J. Pharmacol.* **100 (2): 269-276.**

BARNARD, E.A., SIMON, J. et WEBB, T.E. (1997) Nucleotide receptors in the nervous system. An abundant component using diverse transduction mechanisms. *Mol. Neurobiol.* **15: 103-129.**

BEAUDOIN, A.R., SÉVIGNY, J., GRONDIN, G., DAUD, S. et LEVESQUE, F.P. (1997) Purification, characterization and location of two ATP diphosphohydrolase isoforms in bovine heart. *Am. J. Physiol.* **273 (2) (*Heart Circ. Physiol.* 42) : H673-H681.**

BELHASSAN, B. et PELLEG, A. (1984) Electrophysiologic effects of adenosine triphosphate and adenosine on the mammalian heart: clinical and experimental aspects. *J. Am. Coll. Cardio.* **4 (2): 414-424.**

- BENREZZAK, O., GRONDIN, G., SÉVIGNY, J., GENDRON, F.P., ROUSSEAU, E., D'ORLEANS-JUSTE, P. et BEAUDOIN, A.R. (1999) Identification and immunolocalization of two isoforms of ATP diphosphohydrolase (ATPDase) in pig immune system. Arch. Biochem. Biophys. 370 (2) : 314-322.**
- BERRIC, C.P., HAWKINS, P.T., STEPHENS, L.R., HARDEN, T.K. et DOWNES, C.P. (1989) Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis in turkey erythrocytes is regulated by P2Y purinoceptors. Mol. Pharmacology. 35: 526-532.**
- BERTHIAUME, N. CLAING, A., REGOLI, D., WARNER, T.D. et D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1995) Characterization of receptors for kinins and neurokinins in the arterial and venous mesenteric vasculatures of the guinea-pig. Br. J. Pharmacol. 115: 1319-1325.**
- BERTHIAUME, N., HESS, F., CHEN, A., REGOLI, D. et D'ORLÉANS JUSTE, P. (1997) Pharmacology of kinins in arterial and venous mesenteric bed of normal and B2 knockout transgenic mice. Eur. J. Pharmacol. 333 (1): 55-61.**
- BLANCHARD, D.K., MC MILLEN, S. et DJEU, J.Y. (1991) INF-gamma enhances sensitivity of human macrophages to extracellular ATP-mediated lysis. J. Immunol. 147 (8): 2579-2585.**

- BLANCHARD, D.K., WEI, S., DUAN, C., PERICLE, F., DIAZ, J.I. et DJEU, J.I. (1995) Role of extracellular adenosine triphosphate in the cytotoxic T-lymphocyte mediated lysis of antigen presenting cells. *Blood* **85** (11): 3173-3182.
- BOARDER, M.R. et HOURANI, S.M.O. (1998) The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* **19**: 99-107.
- BODIN, P. et BURNSTOCK, G. (1995) Synergistic effect of acute hypoxia on flow-induced release of ATP from cultured endothelial cells. *Experientia* **51** (3): 256-259.
- BODIN, P. et BURNSTOCK, G. (1996) ATP-release of ATP by human endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **27**: 872-875.
- BOWDEN, A., PATEL, V., BROWN, C. et BOARDER, M.R. (1995) Evidence for requirement of tyrosine phosphorylation in endothelial P2Y- and P2U-purinoreceptor stimulation of prostacyclin release. *Br. J. Pharmacol.* **116**: 2563-2568.
- BRANDES, R.P., SCHMITZ-WINNENTHAL, F.H., FELETOU, M., GODECKE, A., HUANG, P.L., VANHOUTTE, P.M., FLEMING, I. et BUSSE, R. (2000) An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and

endothelial NO synthase knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (17): 9747-9752.

BURNSTOCK, (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor.

Dans : Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach (Eds) R.W. Straub and L. Bolis, Raven Press, New York 108-118.

BURNSTOCK, G. (1989) Vascular control by purines with emphasis on the coronary system. *Eur. Heart J.* **10** (Suppl. F): 15-21.

BUSSE, R. et MULSH, A. (1990) Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **275** (1-2): 87-90.

CAMPBELL, W.B., GEBREMEDHIM, D. PRATT, P.F. et HARDER, D.R. (1996) Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarising factors. *Circ. Res.* **78**: 415-423.

CLAING, A. (1992) Mémoire : Facteurs vasoactifs endogènes et exogènes modulant le tonus vasculaire du lit mésentérique de rat. 110p.

CLIFFORD, E.E., MARTIN, K.A., DALA, P., THOMAS, R. ET DUBYAK, G.R. (1996) Stage-specific expression of P2Y receptors, ecto-apyrase and ecto-5' nucleotidase in myeloid leukocytes. *Am. J. Physiol.* **42** (3) : C973-C987.

COADE, S.B. et PEARSON, J.D. (1989) Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ. Res.* **65**: 531-537.

COCKCROFT, S. et STUTCHFIELD, J. (1989) ATP stimulates secretion in human neutrophils and HL60 cells via a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein coupled to phospholipase C. *FEBS Lett.* **245** (1-2): 25-29.

COLLO, G. NEIDHART, S., KAWASHIMA, E., KOSCO-VILBOIS, M., NORTH, R.A. et BUELL, G. (1997) Tissue distribution of P2X₇ receptor. *Neuropharmacology.* **36** : 1277-1283.

COTE, Y.P., FILEP, J.G., BATTISTINI, B., GAUVREAU, J., SIROIS, P. et BEAUDOIN, A.R. (1992) Characterization of ATP-diphosphohydrolase activities in the intima and media of the bovin aorta : evidence for a regulatory role in platelet activation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1139** (1-2) : 133-142.

COTE, Y.P., PAVATE, C. T. et BEAUDOIN, A.R. (1993) The control of nucleotides in blood vessels: role of ATP-diphosphohydrolase (apyrase). *Curr. Top. Pharmacol.* **1**: 83- 93.

DANZIGER, R.S., RAFFAELI, S., MORENO-SANCHEZ, R. SAKAI, M., CAPOGROSSI, M.C., SPURGEON, H.A., HANSFORD, R.G. et LAKATTA, E.G.

(1988) Extracellular ATP has a potent effect to enhance cytosolic calcium and contractility in single ventricular myocytes. *Cell calcium* **9** (4): 193-199.

DELBRO, D. et BURNSTOCK, G. (1987) Depressor and pressor actions of purine nucleosides and nucleotides in the anaesthetized rat. *Acta Physiol. Scand.* **130** : 373-380.

DEYOUNG, M.B. et SCARPA, A. (1989) ATP receptor-induced Ca^{2+} transients in cardiac myocytes: sources of mobilized Ca^{2+} . *Am. J. Physiol.* **257** (1Pt 4): C750-C758.

DING, Y. CESAR, P., DREW, L., NIKITAKI, D. et WOOD, J.N. (2000) ATP, P2X receptors and pain pathway. *J. Auton. Nerv. Syst.* **81** (1-3): 289-294.

DUBYAK, G.R., EL-MOATOSSIM, C. (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* **265**: C577-C606.

DZHANDZHUGAZYAN, K.N., KIRKIN, A.F.M STRATEN, P.T. et ZEUTHEN, J. (1998) Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett.* **430** (3): 227-230.

EL-MOATASSIM, C., DORNAND, J. et MANI, J.C. (1992) Extracellular ATP and cell signalling. *Biochem. Biophys. Acta* **1134**: 31-45.

ERLINGE, D. (1998) Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen. Pharmacol.* **31** (1): 1-8.

ESTRELA, J.M. OBRADOR, E., NAVARRO, J., LASSO DE LA VEGA, M.C. et PELLICER, J.A. (1995) Elimination of Ehrlich tumors by ATP-induced growth inhibition, glutathione depletion and X-rays. *Nat. Med.* **1**: 84-88.

FIDLER, J.S., POLLARD, H.B. et ROJAS, E (1992) Quantitative analysis of depolarization-induced release from mouse brain synaptosomes: external calcium dependent and independent process. *J. Memb. Biol.* **127**: 21-33.

FILLPINI, A., TAFFS, R.E., AGUI, T., SITKOVSKY, M.V. (1990) Extracellular ATP in T-lymphocyte activation possible role in effector functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8267-8271.

GAARDER, A., JONSEN, A., LALAND, S., HELLEM, A.J. et OWREN, P. (1961). Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature* **192** (4802): 531-532.

GACHET, C., HECLER, B., LEON, C., VIAL, C., OHLMANN, P. et CAZENAVE,

- J.P. (1997) Activation of ADP receptors and platelet function. *Thromb. Haemostasis* 78(1): 271-275.**
- GARCIA-VELASCO, G., SANCHEZ, M., HIDALGO, A. et GARCIA DE BOTO, M.J. (1995) Pharmacological dissociation of UTP- and ATP- elicited contractions and relaxations in isolated rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 294 (2-3): 521-529.**
- GENDRON, F.-P., KRUGH, B.W., KONG, Q., WEISMAN, G.A., PICHER, M., PAGE, G., ROUSSEAU, E. et BEAUDOIN, A.R. (2000) The ectonucleotidase (NTPDase-1) inhibitor 1-hydroxynaphthalene-3,6-disulfonic acid also interacts with P2Y₂ purinoceptor. Dans thèse: Développement, caractérisation et identification de nouveaux inhibiteurs de la nucléoside triphosphate diphosphohydrolase. 205 p.**
- GRATTON, J.P., COURNOYER, G., LOFFLER, B.-M., SIROIS, P., D'ORLÉANS JUSTE, P. (1997) ET_B receptor and nitric oxide synthase blockade induce BQ-123 sensitive pressor effects in the rabbit. *Hypertension.* 30 (5): 1204-1209.**
- GRINTHAL, A. et GUDOTTI, G. (2000) Substitution of His-59 converts CD39 apyrase into ADPase in quaternary structure dependent manner. *Biochemistry.* 39 (1) : 9-16.**

- GUTIERREZ, A.M. LOU, X., PERSSON, A.E.G. et RING, A. (2000) Growth hormones reverse desensitization of P2Y₂ receptors in rat mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**: 594-599.
- HANADA, T., HASHIMOTO, M. SASAKI, T., NAKAYAMA, K., MASUMURA, S., YAMAUCHI, M. et TAMURA, K. (2000) Shear stress enhances prostacyclin release from endocardial endothelial cells. *Life Sciences.* **66** (3): 215-220.
- HARDEN, T.K., LAZAROWSKI, E.R. et BOUCHER, R.C. (1997) Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends Pharmacol. Sc.* **18**: 43-46.
- HASSÉSIAN, H., BODIN, P. et BURNSTOCK, G. (1993) Blockade by glibenclamide of the flow-evoked endothelial release of ATP that contributes to vasodilatation in the pulmonary vascular bed of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **109** (2) : 466-472.
- HASSÉSIAN, H. et BURNSTOCK, G. (1995) Interacting roles of nitric oxide and ATP in the pulmonary circulation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **114** (4) : 846-850.

HIGUCHI, H et SATOH, T. (1997) Endothelin-1 induces vasoconstriction and nitric oxide release via endothelin ET(B) receptors in insolated perfused rat liver. Eur. J. Pharmacol. 328 (2-3): 175-182.

HILL-KAPTURCZAK, N., KAPTURCZAK, M.H., PLOCK, E.R., PATEL, J.M., MALINSKI, T., MADSEN, K.M. et TISHER, C.C. (1999) Angiotensin II-stimulated nitric oxide release from porcine pulmonary endothelium is mediated by angiotensin IV. J.Am. Soc. Nephrol. 10 (3): 481-491.

HJELMELAND, L.M. (1980) A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane Biochemistry dosing: Desing and synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (11): 6368-6370.

HORI, N., WIEST, R. Et GROSZMAN, R.J. (1998) Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. Hepatology. 28 (2): 1467-1473.

HORTON, H.R., MORAN, L.A., OCHS, R.S., RAWN, J.D. et SCRIMGEOUR, K.G. Principes de biochimie (Eds) : De boeck Université, Bruxelles. (1994) 720 p.

- HOURANI, S.M.O. et HALL, D.A. (1994) Receptors for ADP on human blood platelets. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**(4): 103-108.
- ISHIHATA, A., KATANO, Y., NAKAMURA, M., DOI, K. TASAKI, K. et ONO, A. (1999) Differential modulation of nitric oxide and prostacyclin release in senescent rat heart stimulated by angiotensin II. *Eur. J. Pharmacol.* **382** (1): 19-26.
- ISHIZAWA, M. (1988) Effect of vasoactive intestinal peptide on the motility of guinea-pig colon in vitro. *Nip. Heikats. Gak. Zass.* **24** (3): 185-192.
- JOHNSON, P.J., BORNSTEIN, J.C. et BURCHER, E. (1998) Roles of neuronal NK1 and NK3 receptors in synaptic transmission during motility reflexes in the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* **124** (7): 1375-1384.
- KATO, M., SHIODE, N., TERAGAWA, H., HIRAO, H., YAMAGATO, T., MATSUURA, H. et KAJIYAMA, G. (1999) Adenosine 5'-triphosphate induced dilatation of human coronary microvessels in vivo. *Internal Medicine.* **38**: 324-329.
- KATSURGI, T., TAMESUE, S., SATO, C., SATO, Y. et FURUKAWA, T. (1996) ATP release by angiotensin II from segments and cultured smooth muscle cells of guinea pig taenia coli. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* **354** :796-799.

- KATUSIC, Z .S. et SHEPHERD, J.T. (1991) Endothelium-derived vasoactive factors; II Endothelium-dependent contraction. Hypertension. 18 (5 Suppl 1) : III86-92.**
- KHATTAB, M., HOAGE, H., HOLLAH, P., RAHN, K.H. et SCHLATTER, E. (1998) Effects of diadenosine polyphosphates on systemic and regional hemodynamics in anesthetized rats. Kidney Blood Press. Res. 21 (1) : 42-49.**
- KIEN, ND., WHITE, DA., REITAN, J.A. et EISELE, J.H. Jr. (1987) Cardiovascular function during controlled hypotension induced by adenosine triphosphate or sodium nitroprusside in the anesthetized dog. Anesth. Analog. 66 (2) : 103-110.**
- KITAZONO, T., TAKESHIGE, K. ET MINAKAMI, S. (1992) Activation of cultured bovine aortic endothelial cells by extracellular pyrimidine triphosphate. Int. J. Biochem 24 (8) : 1323-1327.**
- KOMOSZYNSKI, M. et WOJTCZAK, A. (1995) Apyrase (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5) : function and relationship to ATPases. Biochem. Biophys. Acta. 310 : 233-241.**
- KOZIAK, K., SÉVIGNY, J., ROBSON, S.C., SIEGEL, J.B. et KACZMAREK, E. (1999) Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. Thromb. Haemo. 82 (5) : 1538-1544.**

KUNAPULI, S., DANIEL, J.L., (1998) P₂ receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* **336: 513-523.**

LA, M. et REID, J.J (1995) Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **22 : 315-323.**

LANGLEY, D. et PEARCE, B. (1998) Pyrimidine nucleotide-stimulated thromboxane A₂ release from cultured glia. *Cell. Mol. Neurobiol.* **18 (5) : 477-486**

LEVINE, L. (1972) Prostaglandin production by mouse fibrosarcoma cells in culture: inhibition by indomethacin and aspirin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47: 888-896.**

LIDOFSKY, S. (1997) Adenosine triphosphate mediates intercellular communication in liver: talk ain't exactly cheap. *Hepatology* **25: 778-779.**

MALMSJÖ, M., BERGDAL, A., MÖLLER, S., ZHAO, X.-Y., SUN, X.-Y., HEDNER, T., EDVINSSON, L. et ERLINGE, D. (1999) Congestive heart failure induces downregulation of P₂X₁-receptors in resistance arteries. *Cardiovasc. Res.* **43: 219-227.**

- MALMSJÖ, M., EDVINSSON, L. et ERLINGE, D. (2000) P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. Eur. J. Pharmacol. 390 (1-2): 173-180.**
- MARCUS, A. J. et SAFIER, L. B. (1993) Thromboregulation : multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. FASEB J. 7 : 516-522.**
- MARIEB E, Anatomie et physiologie humaine (Eds): Éditions du Renouveau Pédagogique, St-Laurent. (1993) 1014 p.**
- MARSHALL, J.J. et KONTOS, H.A. (1990) Endothelium-derived relaxing factors : a perspective from in vivo data. Hypertension 16 : 371-386.**
- MAYMON, R., BAR-SHIRA MAYMON, B., COHEN-ARMON, M., HOLTZINGER, M. et LEIBOVICI, J. (1994) Enhancing effect of ATP on intracellular adriamycin penetration in human ovarian cancer cell lines. Biochem. Biophys. Acta. 1201: 173-178.**
- McGREGOR, D.D. (1965) The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of rat. J. Physiol. 177 : 21-30.**

- MILLS, D.C.B. (1996) ADP receptors on platelets. *Thromb. Haemostasis*. **76(6)**: 835-856.
- MIYAGI, Y., KOBAYASHI, S., NISHIMURA, J., FUKUI, M. et KANAIDE, H. (1996) Dual regulation of cerebrovascular tone by UTP: P2U receptor-mediated contraction and endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.* **118 (4)**: 847-856.
- MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R. BUNTING, S. et VANE, J.R. (1976) An enzyme isolated from arteries transform prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**: 663-665.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J. et HIGGS, E.A. (1991) Nitric oxide: physiologie, pathophysiologie and pharmacologie. *Pharmacol. Reviews*. **43 (2)** :109-142.
- MUNOZ, D.J., MC FIE, C. et THORNE, P.R. (1999) Modulation of cochlear blood flow by extracellular purines. *Hearing Research*. **127 (1-2)** : 55-61.
- NAKAZAWA, K., INOUE, K., FUJIMORI, K. et TAKANAKA, A. (1991) Effect of ATP antagonists on purinoceptor-operated inward currents in rat pheochromocytoma cells. *Eur. J. Physiol.* **418** : 214-219.

- NILSSON, T., HRAFNKELSDOTTIR, T., EDVINSSON, L., JERN, S., ERLINGE, D. et WALL, U.(2000) Forearm blood flow responses to neuropeptide Y, noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate in hypertensive and normotensive subjects. Blood Pressure 9 (2-3): 126-131.**
- ORJI, G.K. (1999) Endothelin-induced prostacyclin production in rat aortic endothelial cells in mediated by protein Kinase C. Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids. 60 (4): 263-268.**
- PALMER, R.M., ASHTON, DS. et MONCADA, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 333: 664-666.**
- PADEH, S., COHEN, A. et ROIFMAN, M. (1991) ATP-induced activation of human B lymphocytes via P₂-purinoceptors. J. Immunol. 146 : 1626-1632.**
- PATEL, V., BROWN, C. et BOARDER, M.R. (1996 a) Protein kinase C isoforms in bovine aortic endothelial cells: role in regulation of P₂Y-and P₂U-purinoceptor stimulated prostacyclin release. Br. J. Pharmacol. 118 (1): 123-130.**

- PATEL, V. BROWN, C. G. GODWIN, A., WILKIE, N., et BOARDER M.R. (1996 b)**
Phosphorylation and activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase are required for the P2 purinoceptor stimulation of endothelial prostacyclin production. *Biochem. J.* **320**: 221-226.
- PICHER, M., SÉVIGNY, J., D'ORLÉANS-JUSTE, P. et BEAUDOIN, A.R. (1996)**
Hydrolysis of P2-purinoceptor agonists by a purified ectonucleotidase from the bovine aorta, the ATP diphosphohydrolase. *Biochem. Pharmacol.* **51** : 1453-1460.
- RANDALL, M.D., ALEXANDER, S.P.H., BENNETT, T., BOYD, E.A. FRY, J.R., GARDINER, S.M., KEMP, P.A., MCCULLOCH, A.I. et KENDALL, D.A. (1996)**
An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 114-120.
- RAPAPORT, E. et FONTAINE, J. (1989)** Generation of extracellular ATP in blood and its mediated inhibition of host weight loss in tumor-bearing mice. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 4261- 4266.
- RALEVIC, V. et BURNSTOCK, G.(1996)** Relative contribution of P2U- and P2Y purinoceptors to endothelium-dependent vasodilatation in the golden hamster isolated mesenteric bed. *Br. J. Pharmacol.* **117** : 1797-1802.

RALEVIC et BURNSTOCK, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. Am. Soc. Pharmacol. Exp. Therap. 50 (3): 425-492.

REES, D.D., PALMER, R.M.J., SCHULZ, R., HODSON, H.F. et MONCADA, S. (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. Br. J. Pharmacol. 101 : 746-752.

REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S. et D'ORLÉANS-JUSTE, P. (1989) Receptors for substance P and related neurokinins. Pharmacology 38 : 1-15.

RINALDI-CARMONA, M., BARTH, F., HEAULEME, M., SHIRE, D., CALANDRA, B., CONGY, C., MARTINEZ, S., MARUANI, J., NELIAT, G., CAPUT, D., FERRERA, P., SOUBRIE, P., BRELIÈRE, J.C. et LEFUR, G. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. FEBS Lett. 350: 240-244.

ROBSON, S.C., KACZMAREK, E., SIEGEL, J.B., CANDINAS, D., KOZIAK, K., MILLAN, M., HANCOCK, W.W. et BACH, F.H. (1997) Loss of ATP Diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. J. Exp. Med. 185: 153-163.

RUBINO, A., AMERINI, S., LEDDA, F. et MANTELLI, L. (1992) ATP modulates the efferent function of capsaicin-sensitive neurones in guinea-pig isolated atria. *Br. J. Pharmacol.* **105** (3): 516-520.

RUBINO, A., ZIABARY, L. et BURNSTOCK, G. (1999) Regulation of vascular tone by UTP and UDP in isolated rat intrapulmonary arteries. *Eur. J. Pharmacol.* **370** (2): 139-143.

SAANO, V., VIRTA, P., JOKI, S. NUUTIEN, J. KARTTUNEN, P. et SILVASTI, M. (1992) ATP induces respiratory ciliostimulation in rat and guinea pig in vitro and in vivo. *Rhinology.* **30**(1): 33-40.

SAKAMOTO, H. et FIRKIN, F. (1984) Characterization of leucocyte phagocytic stimulatory material released by activated human platelets. *Br. J. Haematol.* **57** (1): 49-60.

SCHMIDT, A., ORTALDO, J.R. et HERBERMAN, R.B. (1984) Inhibition of human natural killer cell reactivity by exogenous adenosine 5¹-triphosphate. *J. Immunol.* **132** (1): 146-150.

SCHULZE-LOHOFF, E., OGLIVIE, A. et STERZEL, R.B. (1996) Extracellular nucleotides as signalling molecules for renal mesangial cells. *J. Auton. Pharmacol.* **16**: 381-384.

- SENAGORE, A.J., MILSOM, J.W., WALSHAW, R.K., MOSTOSKEY, U.,
DUNSTAN, R. et CHAUDRY, T.H. (1992) Adenosine triphosphate-magnesium
chloride in radiation injury. *Surgery* **112**: 933-939.
- SÉVIGNY, J., BEAUDOIN, A.R. (1994) Le monde des nucléotides extracellulaires.
Med. Sci. **10**: 836-844.
- SÉVIGNY, J., PICHER, M., GRONDIN, G. et BEAUDOIN, A.R. (1997 a) Purification
of blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localization by
immunological techniques. *Biochem. Biophys. Acta* **1334** (1): 73-88.
- SÉVIGNY, J., DUMAS, F. et BEAUDOIN, A.R. (1997 b) Purification and
identification by immunological techniques of different isoforms of mammalian ATP
diphosphohydrolase. *Ecto-ATPase. Recent progress on structure and function.* (Eds)
L. Plesner, T.L. Kirley et A.F. Knowles. Plenum Press. New York, 294 p.
- SÉVIGNY, J., ROBSON, S.C., WAELKENS, E., CSIZMADIA, E., SMITH, R.N. et
LEMMENS, R. (2000) Identification and characterization of a novel hepatic
canalicular ATP diphosphohydrolase. *Am. Soc. Biochem. and Molec. Biol.* **275** (8) :
5640-5647.
- SHEPHERD, J.T., et KATUSIC, Z.S. (1991) Endothelium-derived vasoactive factors :
Endothelium –dependent relaxation. *Hypertension* **18** : III 76- III 85.

- SMIDT, A., ORTALDO, J.R. et HERBERMAN, R.B. (1990) Inhibition of human natural killer cell reactivity by exogenous adenosine 5'-triphosphate. *J. Immunol.* **132**: 146-150.
- SPERLAGH, B., HASKO, G., NEMETH, Z. et VIZI, E.S. (1998) ATP release by LPS increase nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X₇ receptors. *Neurochem. Int.* **33**: 209-215.
- STAR, R.A. (1993) Southwestern International Medicine Conference : nitric oxide. *Am. J. Med. Sci.* **306** : 348-358
- STEVENS A et LOWE J. *Histologie* (Eds): Edisem. St-Hyacinthe, (1992) 378 p.
- SUD'INA, G.F., MIRZOEVA, O.K., GALKINA, S.I., PUSHKAREVA, MA. ULLRICH V. (1998) Involvement of ecto-ATPase and extracellular ATP in polymorphonuclear granulocyte-endothelial interaction. *FEBS Letters* **423** (2): 243-248.
- TAKEUCHI, K., ISHII, R., SHINOZUKA, K. et HASHIMOTO, T. (1995) High potassium-evoked release of ATP from rabbit pulmonary artery via endogenous noradrenaline. *Gen. Pharmacol.* **26**: 1385-1390

- TAMESUE, S., SATO, C. et KATSURAGI, T. (1998) ATP release caused by bradykinin, substance P and histamine from intact and cultured smooth muscles of guinea-pig vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* **357** : 240-244.
- TEKKANAT, K. .K. et FOX, I.H. (1988) Isocratic separation of ATP and its degradation products from biological fluids by automated liquid chromatography. *Clin. Chem.* **34** (5) : 925-932
- TORTORA, G. et GRABOWSKI, S., *Principes d'anatomie et de physiologie.*
(Eds): Centre Éducatif et Culturel. Anjou., (1993) 1204 p.
- TRISCHITTA, V., VIGNERI, R. ROTH, R.A. et GOLDFINE, I.D. (1984) ATP and other nucleotide triphosphates inhibit the binding of insulin to its receptor. *Metabolism* **33** (6) :577-581.
- VENUGOPALAN, C.S., TUCKER, T.A. et O'MALLEY, N.A. (1986) Effects of ATP and VIP on guinea-pig airways. *Methods & Find. in Exp. & Clin. Pharmacol.* **8** (11) : 661-665.
- WARNER, T.D. (1990) Simultaneous perfusion of rat isolated superior mesenteric arterial and venous beds : comparaison of their vasoconstrictor and vasodilator responses to agonists. *Br. J. Pharmacol.* **99** : 427-433

WILSON, P.D., HOVATER, J.S., CASEY, C.C., FORTENBERRY, J.A. et SCHWIEBERT, E.M. (1999) ATP release mechanism in primary cultures of epithelia derived from the cysts of polycystics kidneys. *J. Am. Soc. Nephro.* 10 : 219-229.

WITTENBURG, H., BÜLTMANN, R., PAUSE, B., GANTER, C., KURZ, G. et STARKE, K. (1996) P2-purinoceptor antagonists : Blockade of P2-purinoceptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to Evans Blue and trypan blue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 354 : 491-497.

XIAO, D., LIU, Y., PEARCE, W.J. et ZHANG, L. (1999) Endothelial nitric oxide release in isolated perfused ovine uterine arteries: effect of pregnancy. *Eur. J. Pharmacol.* 367 (2-3): 223-230.

XU, Q., et SHAFFER, E.A. (1992) The influence of bile salts on small intestinal mobility in the guinea pig in vitro. *Gastroenterology.* 103: 29-35

YAMASAKI, S., SWADA, S., KOMATSU, S., KAWAHARA, T., TSUDA, Y., SATO, T., TORATANI, A., KONO, Y., HIGAKI, T., IMAMURA, H., TADA, Y., AKAMATSU, N., TAMAGAKI, T., TSUJI, H. et NAKAGAWA, M. (2000) Effects of bradykinin on prostaglandin I (2) synthesis in human vascular endothelial cells. *Hypertension* **36** (2): 201-207.

YANAGISAWA, M, KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K. Et MASAKI, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**: 411-415.

YANG,S., CHEEK, D.J., WESTFALL, D.P. et BUXTON, I.L. (1994) Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells. *Circ.Res.* **74** : 401-407.