

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke

**Évolution de l'expression du NPY et de ses récepteurs dans
l'endothélium endocardique au cours du développement fœtal
chez l'humain; rôle du NPY dans l'homéostasie calcique
intracellulaire**

Par

SAWSAN SADER

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire
Université de Sherbrooke

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du
grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Biologie Cellulaire

Août 2002



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-80547-6

Canada

*À mes très chers Parents, Siham et Elias
À mon frère et mes sœurs, Joseph, Rana, Roula, Lara et Zeina
Pour leur amour inconditionnel, encouragements et présence
Malgré la distance*

*À Sanaa et Ghada
Pour leur précieuse amitié*

Merci !

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
RÉSUMÉ	XIX
I. INTRODUCTION.....	1
1.1. L'endothélium endocardique.	2
1.1.1. Morphologie fonctionnelle.	2
1.1.2. Matrice extracellulaire.	11
1.1.3. Le plexus neural de la matrice extracellulaire.	11
1.1.4. Effet de l'endothélium endocardique sur la performance cardiaque.	15
1.1.5. L'EE est une barrière physicochimique.....	18
1.1.6. Relâchement de médiateurs cardioactifs par l'EE.	20
1.2. Neuropeptide Y (NPY) et peptides reliés.	30
1.2.1. Découverte.....	30
1.2.2. Structure du NPY.....	33
1.2.3. Distribution du NPY, PYY et PP.....	34
1.2.4. Régulation de l'expression des gènes du NPY.....	38
1.2.5. Synthèse et sécrétion du NPY.....	39
1.2.6. Les récepteurs au NPY et peptides reliés.	44

1.2.7. Agonistes et antagonistes de la famille des récepteurs au NPY.	57
1.2.8. Effets biologiques du NPY et de ses récepteurs.	63
1.3. Le calcium.	76
1.3.1. Les canaux calciques dépendants du voltage.....	78
1.4. Hypothèse et objectifs de travail.....	81
II. MATERIEL ET MÉTHODES.....	84
2.1. Isolation et culture des cellules endothéliales endocardiques isolées des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines ainsi que de rats adultes.....	85
2.2. Chargement des cellules avec des sondes fluorescentes.....	87
2.2.1. La sonde calcique, le Fluo-3.....	87
2.2.2. La sonde fluorescente pour identifier le réticulum endoplasmique, le DiOC ₆	88
2.2.3. La sonde fluorescente pour identifier les mitochondries, le MitoFluor/AM.	89
2.2.4. La sonde fluorescente PYY couplée à la fluorescéine (FITC).	90
2.3. Microscopie confocale.....	90
2.3.1. Principe de base.	91
2.3.2. Balayage des cellules.....	94
2.4. Marquage du noyau.	97
2.5. Marquage par immunofluorescence.	98
2.5.1. Marquage du NPY.....	98
2.5.2. Prétraitement des cellules avec une haute concentration de KCl.	99

2.5.3. Marquage du récepteur Y ₁	100
2.5.4. Technique de l'immunofluorescence indirecte.....	100
2.5.5. Visualisation et quantification du marquage par microscopie confocale. .	101
2.6. Dosage du neuropeptide Y.....	102
2.6.1. Préparation des échantillons.	102
2.6.2. Dosage radioimmunologique (RIA) du neuropeptide Y.	103
2.7. Statistiques.....	105
III. RÉSULTATS.....	107
3.1. Présence et distribution des récepteurs au NPY dans les cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines.	108
3.1.1. Présence de récepteurs au NPY au niveau de l'endothélium endocardique fœtal humain.	108
3.1.2. Présence de récepteurs au NPY au niveau des cellules isolées de l'endothélium endocardique fœtal humain.	111
3.1.3. Localisation et distribution du récepteur Y ₁ dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines.	117
3.2. Localisation et distribution du NPY dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines.	128
3.3. Effet de différentes concentrations de hNPY sur le niveau basal du [Ca] _c et [Ca] _n des cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines à différents stades de développement et de rats adultes.....	137

3.3.1. Effet de concentrations croissantes de hNPY sur le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 13 semaines.	142
3.3.2. Effet de concentrations croissantes de hNPY sur le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 17 semaines.....	150
3.3.3. Effet de concentrations croissantes de hNPY sur le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines et de rats adultes.....	159
3.4. Effet de l'administration des antagonistes des récepteurs Y_1 et Y_2 sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.	170
3.4.1. Effet préventif de l'administration de l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.	170
3.4.2. Effet préventif de l'administration de l'antagoniste du récepteur Y_2 , le BIIE0246, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.	176
3.4.3. Effet préventif de l'administration de l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le NPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.	182

3.4.4. Effet de l'antagoniste du récepteur Y_2 , le BIIE0246, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.....	187
3.5. Synthèse et sécrétion du NPY par les CEEs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.....	193
IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	206
V. REMERCIEMENTS.....	223
VI. BIBLIOGRAPHIE	226

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Endothélium endocardique et matrice extracellulaire.	3
Figure 2	Présence d'invaginations membranaires et d'un grand nombre de micro-villosités sur la surface des cellules endothéliales endocardiques (CEEs).	5
Figure 3	Présence de fentes intercellulaires et de jonctions serrées entre les CEEs.	9
Figure 4	Présence du NPY dans les fibres et les fascicules nerveux du plexus neuronal de la matrice extracellulaire.	13
Figure 5	Effet de l'EE sur la contraction isométrique du muscle cardiaque.	16
Figure 6	Les facteurs libérés par l'endothélium endocardique.	21
Figure 7	Structure primaire du NPY.	35
Figure 8	Sécrétion du NPY par les neurones sympathiques.	41
Figure 9	Représentation schématique du récepteur Y_1 et du récepteur Y_2	46
Figure 10	Blocage de l'effet chronotrope positif du hNPY sur les cellules cardiaques d'embryon de poulet de 10 jours par la nifedipine et le BIBP3226.	66
Figure 11	Effet du hNPY sur les cellules isolées du muscle lisse aortique humain.	72
Figure 12	Le point focal et le point confocal dans le système de la microscopie confocale.	92

Figure 13	Les compartiments optiques du système de la microscopie confocale.	95
Figure 14	Présence des récepteurs au NPY sur l'endothélium endocardique fœtal humain.	109
Figure 15	Marquage fluorescent du réticulum endoplasmique, des mitochondries et du noyau dans les cellules isolées de l'endothélium endocardique.....	112
Figure 16	Présence des récepteurs au NPY au niveau des cellules endothéliales endocardiques isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. .	115
Figure 17	Marquage immunofluorescent du récepteur Y ₁ dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines.....	119
Figure 18	Distribution et densité relative du récepteur Y ₁ dans les trois compartiments cellulaires (cytosol, région périnucléaire et noyau) des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines.....	121
Figure 19	Densité relative du récepteur Y ₁ dans les CEEGs et les CEEDs à différents stades du développement cardiaque fœtal humain.	125
Figure 20	Marquage immunofluorescent du NPY dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines. .	131
Figure 21	Distribution et densité relative du récepteur NPY dans les trois compartiments cellulaires (cytosol, région périnucléaire et noyau) des	

	CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines.....	134
Figure 22	Densité relative du NPY dans les CEEGs et les CEEDs à différents stades du développement fœtal.....	138
Figure 23	Expérience représentative de l'effet de différentes concentrations du hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13 semaines étudié en microscopie confocale.....	143
Figure 24	Effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13 semaines.....	145
Figure 25	Expérience représentative de l'effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 17 semaines étudié en microscopie confocale.....	152
Figure 26	Effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 17 semaines.....	154
Figure 27	Expérience représentative de l'effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines étudiées en microscopie confocale.....	160

- Figure 28 Effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.....163
- Figure 29 Effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs de rats adultes.....167
- Figure 30 Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304, sur l'augmentation du niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.....172
- Figure 31 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_1 (BIBO3304) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.....174
- Figure 32 Absence d'effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_2 , le BIIE0246, sur l'augmentation du niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.....178
- Figure 33 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_2 (BIIE0246) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.....180
- Figure 34 Effet préventif partiel de l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304, sur l'augmentation du niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.183

- Figure 35 Effet préventif partiel de l'antagoniste du récepteur Y_1 (BIBO3304) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.....185
- Figure 36 Expérience représentative de l'effet préventif partiel de l'antagoniste du récepteur Y_2 , le BIIE0246, en mode préventif sur l'augmentation du niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.....189
- Figure 37 Effet préventif partiel de l'antagoniste du récepteur Y_2 (BIIE0246) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.....191
- Figure 38 Effet de la dépolarisation de la membrane à l'aide d'une haute concentration de KCl sur le marquage immunofluorescent du NPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.195
- Figure 39 Effet de la dépolarisation de la membrane à l'aide d'une haute concentration de KCl sur le marquage immunofluorescent du NPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.197
- Figure 40 Détermination de la concentration intracellulaire et extracellulaire de NPY dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines suite à un traitement avec une haute concentration de KCl.....200

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Séquence polypeptidique du hNPY et de ses peptides apparentés.	32
Tableau 2	Caractéristiques des différents types de récepteurs au NPY.	49
Tableau 3	Mesure de la densité des récepteurs Y_1 dans les trois différents compartiments cellulaires des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs foetaux âgés de 13, 17 et 20 semaines.	127
Tableau 4	Mesure de la densité totale du récepteur Y_1 dans les CEEGs et les CEEDs des cœurs foetaux âgés de 13, 17 et 20 semaines.	129
Tableau 5	Mesure de la densité du NPY dans les trois différents compartiments cellulaires des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs foetaux âgés de 13, 17 et 20 semaines.	140
Tableau 6	Mesure de la densité totale du NPY dans les CEEGs et les CEEDs à différents stades du développement fœtal.	141
Tableau 7	EC_{50} du hNPY modulant le calcium cytosolique et nucléaire des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs foetaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines ainsi que de rats adultes.	151

LISTE DES ABRÉVIATIONS

[Ca] _c	Concentration de calcium libre cytosolique
[Ca] _i	Concentration de calcium libre intracellulaire
[Ca] _n	Concentration de calcium libre nucléaire
°C	Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
AA	Acide arachidonique
ACE	Enzyme de conversion de l'Angiotensine
Ach	Acétylcholine
ADH	Vasopressine
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADPRc	Adénosine diphosphate ribose cyclique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang	Angiotensine
Ang II	Angiotensine II
ANP	peptide natriurétique auriculaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate

BSA	Albumine de sérum bovin
BK	Bradykinine
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmoduline
CAV-1	Cavéoline-1
CEE	Cellules endothéliales endocardiques
CEED	Cellules endothéliales endocardiques isolées à partir du ventricule droit
CEEG	Cellules endothéliales endocardiques isolées à partir du ventricule gauche
CEV	Cellules endothéliales vasculaires
CMLV	Cellules du muscle lisse vasculaire
CPON	Peptide qui flanque la partie C-terminale du NPY
DiOC ₆	3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DPPIV	Dipeptidyl peptidase IV
EC ₅₀	Concentration produisant 50% de la réponse maximale
EE	endothélium endocardique
ET-1	Endothéline-1
FBS	Sérum de bovin foetal
HUVEC	cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
GMPC	Guanosine monophosphate cyclique

ICV	Intracerebro-ventriculaire
IgG	Immunoglobuline G
IP3	Inositol triphosphate
ir	Immunoréactif
L-Arg	L-arginine
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mV	Millivolt
n	Nombre d'expériences
NA	Noradrénaline
NE	Norépinéphrine
NGF	Facteur de croissance nerveux
NGS	Sérum normal de chèvre
nM	Nanomolaire
NO	Oxyde nitrique
NPY	Neuropeptide Y
NS	Liaison non-spécifique
p	Probabilité
PAF	Facteur activateur des plaquettes

PBS	Tampon phosphate salin
PG	Prostaglandine
PGD ₂	Prostaglandine D ₂
PGF _{2α}	Prostaglandine F ₂
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGI ₂	Prostaglandine I ₂
PHI	peptide histidyl-isoleucine
PKC	Protéine kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMT	Multiplicateur de photon
PP	Polypeptide pancréatique
PS	picosiemens
PTX	Toxine de pertussis
PYY	Peptide YY
RE	Réticulum endoplasmique
RIA	Dosage radioimmunologique
rpm	Révolution par minute
S-MEM	Milieu Essentiel Minimal de Suspension
SNC	système nerveux central
SP	Substance P
T	Liaison totale
tPA	Activateur tissulaire du plasminogène

TXA ₂	Thromboxane A ₂
vWF	Facteur de Von Willebrand
VIP	polypeptide vasoactif intestinal

**Évolution de l'expression du NPY et de ses récepteurs dans l'endothélium
endocardique au cours du développement fœtal chez l'humain; rôle du NPY
dans l'homéostasie calcique intracellulaire**

Par

SAWSAN SADER

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire
Université de Sherbrooke

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Biologie Cellulaire

RÉSUMÉ

Le Neuropeptide Y (NPY) est un peptide de 36 acides aminés qui est hautement conservé au cours de l'évolution et qui joue un rôle très important dans plusieurs fonctions physiologiques. Son effet sur le système cardiovasculaire, incluant le cœur et les vaisseaux sanguins a été bien étudié. Cependant, son effet sur l'endothélium endocardique n'a pas encore été élucidé. La réponse pharmacologique induite par le NPY dans différents tissus est relayée par au moins cinq types de récepteurs, soient les récepteurs Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 et Y_6 . Plusieurs études ont rapporté que le récepteur Y_1 joue un rôle majeur dans le système cardiovasculaire. Dans la première partie de ce projet de recherche, nous avons étudié l'expression et la distribution du NPY et du récepteur Y_1 au niveau des cellules endothéliales endocardiques isolées du côté ventriculaire gauche (CEEGs) et droit (CEEDs) du cœur fœtal humain âgé de 13, 17 et 20 semaines. Nos résultats ont démontré que la distribution et la densité relative du récepteur Y_1 et du NPY sont très différents dans les CEEGs par rapport aux CEEDs. L'expression du récepteur Y_1 augmente en fonction de l'âge dans les CEEGs et

les CEEDs. À 13 et 17 semaines, la densité du récepteur Y_1 est plus élevée au niveau des CEEDs par rapport au CEEGs. Cependant, à 20 semaines, la densité de ce récepteur devient plus élevée au niveau des CEEGs par rapport au CEEDs. En ce qui concerne le NPY, au niveau des CEEDs, son expression augmente en fonction de l'âge pour atteindre un maximum d'intensité à 20 semaines. Par contre, au niveau des CEEGs, le maximum d'immunoréactivité du NPY est observé à 13 semaines, diminue à 17 semaines et augmente de nouveau à 20 semaines sans toutefois atteindre le niveau observé à 13 semaines. De plus, nos résultats ont démontré que le NPY et le récepteur Y_1 sont présents non seulement au niveau de la membrane plasmique des CEEGs et des CEEDs mais aussi au niveau du cytosol et plus particulièrement au niveau nucléaire et surtout dans la région périnucléaire incluant les membranes nucléaires et ceci à 13, 17 et 20 semaines. Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons évalué l'effet du NPY sur les niveaux de base du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ dans les CEEGs et les CEEDs isolées à partir des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines et de rats adultes. Nos résultats montrent que le NPY induit une augmentation dose-dépendante de la concentration du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ à la fois dans les CEEGs et les CEEDs âgées de 13, 17 et 20 semaines. De plus, en comparaison avec les CEEs isolées du cœur de rat adulte, la pharmacologie des récepteurs au NPY au niveau des CEEDs fœtales humaines est semblable à celle observée au niveau des CEEDs du rat adulte et ce dès l'âge de 13 semaines. Cependant, du côté gauche, l'effet du NPY sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ au niveau des CEEGs du cœur fœtal humain ne devient comparable à celui de l'adulte qu'à l'âge de 20 semaines, suggérant ainsi qu'à 20 semaines les CEEGs et les CEEDs fœtales humaines constituent un excellent modèle pour les études pharmacologiques des récepteurs NPY chez l'adulte. De plus, nos résultats ont démontré que l'effet du NPY dans les CEEGs est médié via l'activation du récepteur Y_1 tandis que l'effet du NPY dans les CEEDs est dû à l'activation des récepteurs Y_1 et Y_2 . Finalement nous avons démontré que l'augmentation du $[Ca]_i$ dans les CEEDs induit la sécrétion du NPY

dans le milieu extracellulaire tandis que dans les CEEGs, l'augmentation du $[Ca]_i$ induit la synthèse *de novo* du NPY. Nos résultats démontrent qu'il y a une différence existe entre les CEEGs et les CEEDs et que la densité relative du NPY ainsi que ses récepteurs subissent des changements durant le développement et la différenciation du cœur humain. De plus, le NPY semble jouer un rôle important dans l'excitation-sécrétion des cellules endothéliales endocardiques humaines.

I. INTRODUCTION

1.1. L'endothélium endocardique.

L'endothélium endocardique (EE) est une fine mono-couche de cellules endothéliales (figure 1) de $0.5\mu\text{m}$ d'épaisseur qui tapisse les cavités du cœur et recouvre les trabécules et les muscles papillaires cardiaques (RHODIN, 1974). La large superficie occupée par l'EE et la présence, à la surface des cellules endothéliales endocardiques (CEEs), d'invaginations membranaires et d'un grand nombre de micro-villosités augmentent la surface de contact et facilitent l'échange entre ces cellules et le sang circulant (HARASAKI *et al.*, 1975; PEINE et LOW, 1975; BRUTSAERT et ANDRIES, 1992), (figure 2).

En vertu de sa position et de sa large superficie, l'EE peut sentir et transmettre au myocarde sous-jacent tout changement dans l'homéostasie sanguine, et participe, par la suite, à l'ajustement de ces changements. L'EE joue donc un rôle très important dans la régulation des fonctions cardiaques (BRUTSAERT et ANDRIES, 1992).

1.1.1. Morphologie fonctionnelle.

Plusieurs groupes, incluant le nôtre, ont démontré que les CEEs possèdent un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi bien développés (ANDRIES

Figure 1 Endothélium endocardique et matrice extracellulaire.

L'endothélium endocardique (EE) est la couche la plus interne du cœur, il est constitué d'une mono-couche de cellules endothéliales. Ces cellules sont séparées des cardiomyocytes sous-jacents (couleur rose), par une matrice extracellulaire formée d'une fine couche de lame basale qui est constituée d'une fine lamina basale et d'une lamina réticulée sous-jacente, contenant des fibres de collagène. Ces deux couches surmontent une couche fibroblastique contenant des vaisseaux sanguins et un plexus nerveux.

Modifié de RHODIN, 1974.

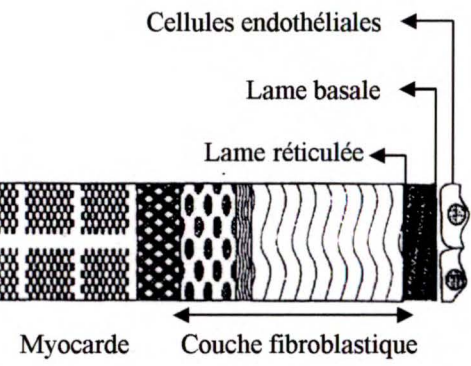
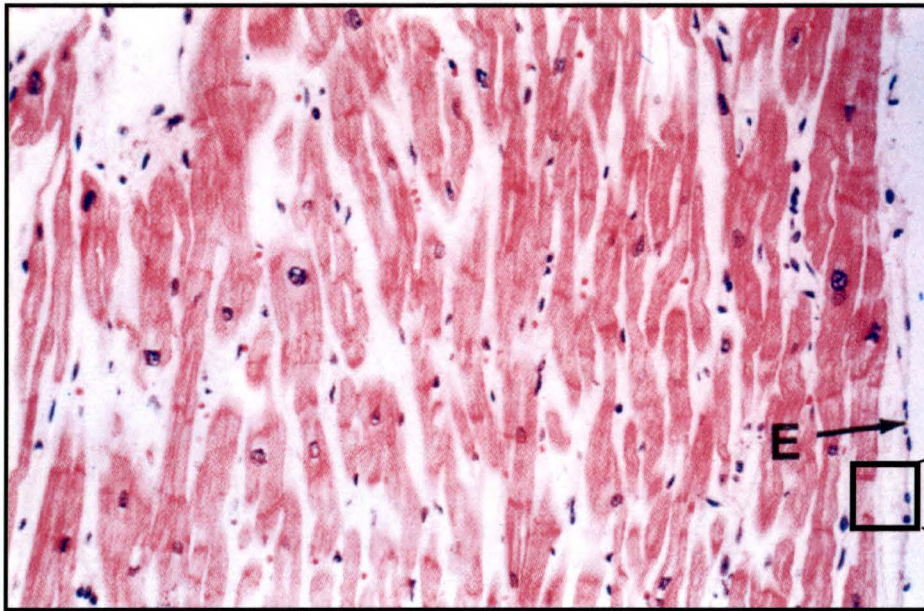
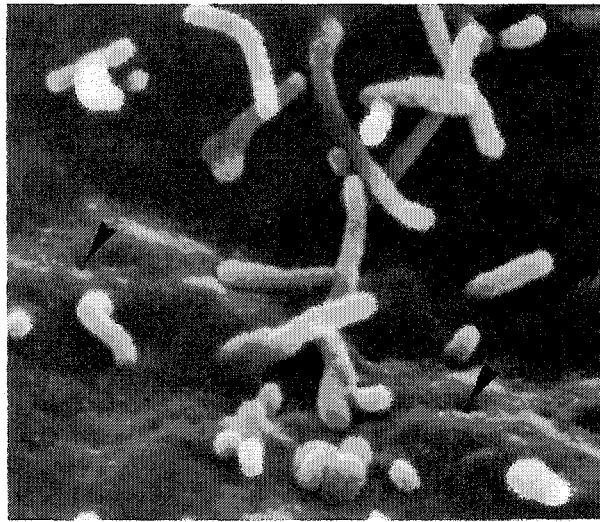


Figure 2 **Présence d'invaginations membranaires et d'un grand nombre de micro-villosités sur la surface des cellules endothéliales endocardiques (CEEs).**

La surface des CEEs est caractérisée par la présence d'un grand nombre de micro-villosités en forme de cylindre. Ces structures microscopiques augmentent la surface de contact des CEEs avec le sang circulant. De plus, la face luminale des CEEs montrent de nombreuses petites invaginations (pointes de flèches) qui représentent les orifices des vésicules de pinocytose.

Tiré de ANDRIES 1994.



et BRUTSAERT, 1990; BRUTSAERT et ANDRIES, 1992; ANDRIES, 1994; JACQUES *et al.*, 2000), ainsi qu'un grand nombre de mitochondries entourant un large noyau (JACQUES *et al.*, 2000), suggérant que ces cellules sont métaboliquement très actives. Par le biais de la microscopie électronique à transmission, ANDRIES et BRUTSAERT (1990; 1991) ont démontré que les CEEs de chat et de rat contiennent des corps de Weibel-Palade. Ces structures, caractéristiques des cellules endothéliales, contiennent le facteur de Von Willebrand (vWF), connu pour son rôle important dans la coagulation sanguine, l'adhérence des plaquettes à la matrice extracellulaire et les interactions interplaquettaires (SPORN *et al.*, 1989).

Les CEEs subissent continuellement un stress physico-mécanique, causé par les changements de la pression hydrostatique et les grandes variations de la forme et du volume des parois du cœur lors du cycle cardiaque. Ces traits caractéristiques peuvent donc avoir des conséquences sur la structure et la fonction des CEEs (BRUTSAERT *et al.*, 1996).

Le régulateur le plus important de la forme cellulaire est le cytosquelette (BRUTSAERT *et al.*, 1996). Dans l'EE, celui-ci a une structure particulière qui semble être impliqué dans plusieurs fonctions. Les filaments d'actine forment une bande périphérique associée à la ceinture d'adhérence (zonula adherens), et participent à la régulation de la perméabilité entre ces cellules endothéliales (ROTROSEN *et GALLIN*, 1986; SCHNITTLER *et al.*, 1990). Ces cellules sont aussi caractérisées par la présence d'un grand nombre de fibres de stress; ces

fibres jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium, probablement par l'augmentation de l'adhésion cellulaire et par le renforcement de la surface des cellules endothéliales (WHITE *et al.*, 1983; GOTLIEB *et al.*, 1991).

Le chevauchement intercellulaire et la présence de fentes entre les cellules sont des traits caractéristiques des CEEs (MELAX et LEESON, 1967). Chez le rat et le chien, l'EE ventriculaire possède des fentes intercellulaires fermées longues et profondes, caractérisées par la présence de jonctions serrées (ANVERSA *et al.*, 1975; BRUTSAERT et ANDRIES, 1992; ANDRIES et BRUTSAERT, 1994) (figure 3). L'espace intercellulaire ou les fentes entre les CEEs, sont recouvertes d'un glycocalyx négativement chargé qui joue un rôle important dans la perméabilité sélective trans-endothéliale (ANDRIES et BRUTSAERT, 1994; TOMPKINS *et al.*, 1989). Dans les CEEs, les jonctions serrées (Zonula occludens) sont simples, avec un ou deux points de contact, et servent de barrière sélective pour la diffusion des molécules, tout en limitant le transport entre les cellules par les fentes intercellulaires (ANDRIES et BRUTSAERT, 1994).

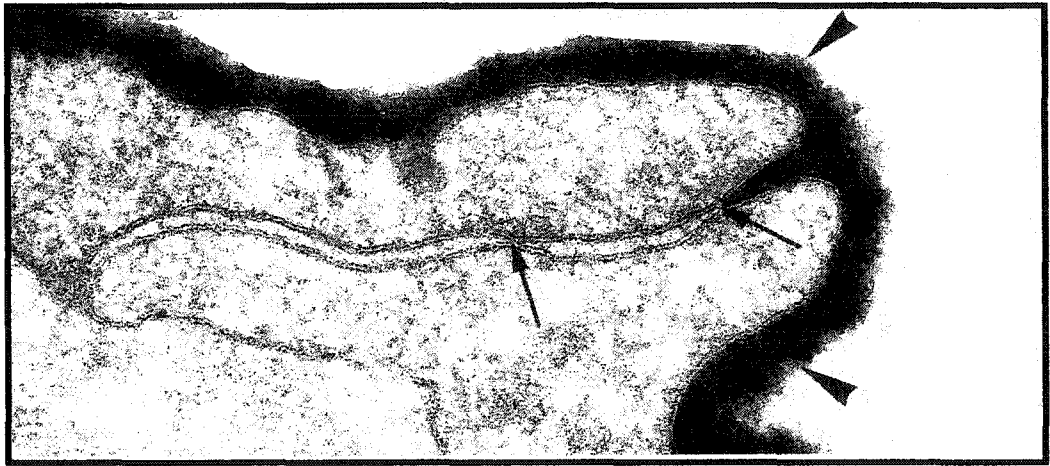
En utilisant la microscopie électronique à transmission, il a été démontré que les CEEs possèdent un grand nombre de jonctions de type gap (ANVERSA, 1975; ANDRIES, 1994). La présence de ce type de jonctions suggère un couplage électrochimique entre les CEEs (BRUTSAERT et ANDRIES, 1992). Il a été également suggéré que ces jonctions jouent un rôle dans la régulation de la

Figure 3 **Présence de fentes intercellulaires et de jonctions serrées entre les CEEs.**

Cette figure montre la présence d'une longue fente entre deux CEEs observées à fort grossissement. Les jonctions serrées sur cette figure sont formées par deux points de contact. La face luminale des CEEs est marquée par l'acide tannique. La pénétration de l'acide tannique dans la fente intercellulaire est arrêtée par les jonctions serrées.

—▶ : Jonctions serrées. ▶ : Acide tannique.

Tiré de BRUTSAERT et ANDRIES 1992.



prolifération cellulaire (ANVERSA, 1975; ANDRIES, 1994). Cependant, la présence des jonctions de type gap n'a pas été détectée entre les CEEs et les fibroblastes ou les cardiomyocytes adjacents (ANDRIES et BRUTSAERT, 1991; ANDRIES, 1994).

1.1.2. Matrice extracellulaire.

Les CEEs sont séparées des cardiomyocytes par une matrice sous-endothéliale endocardique ou extracellulaire, formée d'une fine couche de lame basale qui est constituée d'une fine lamina basale et d'une lamina réticulée sous-jacente, contenant des fibres de collagène. Ces deux couches surmontent une couche fibroblastique, contenant des vaisseaux sanguins et un plexus nerveux (RHODIN, 1975) (voir figure 1).

1.1.3. Le plexus neural de la matrice extracellulaire.

Il a été démontré par plusieurs groupes que le cœur est innervé à la fois par les nerfs autonomes (sympathique et parasympathique) et sensoriels (LEVY et MARTIN, 1979; WHARTON *et al.*, 1990; MARRON *et al.*, 1994). La distribution de ces nerfs dans le myocarde et au niveau des vaisseaux coronaires a

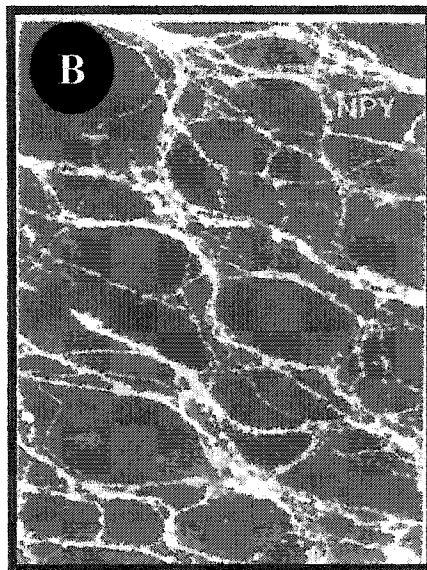
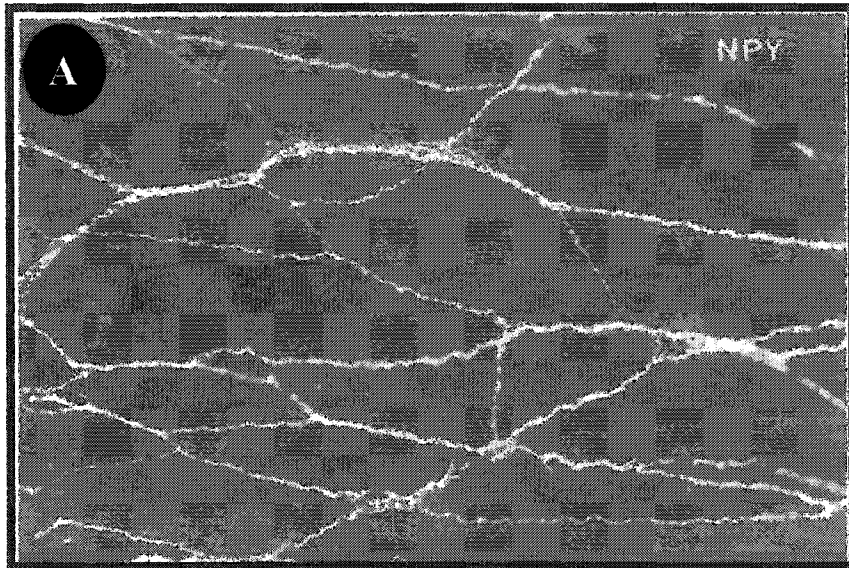
été étudiée extensivement (MARRON *et al.*, 1994), cependant, une faible attention a été donnée à l'endocarde.

En 1994, MARRON et ses collaborateurs ont démontré que la matrice extracellulaire située entre les CEEs et les cardimyocytes chez l'humain, contient un plexus de fibres et de fascicules nerveux dense composé de nerfs autonomes et sensoriels qui montrent des patrons de distribution différents dans les quatre cavités cardiaques. Cette étude montre également que les nerfs immunoréactifs pour le neuropeptide Y (NPY) sont les plus abondants et possèdent un patron de distribution ainsi qu'une densité relative similaire à ceux immunoréactifs pour la tyrosine hydroxylase (MARRON, *et al.*, 1994). De plus, ces nerfs sont relativement plus marqués du côté droit par rapport au côté gauche du cœur et dans les ventricules par rapport aux oreillettes (figure 4). Les fibres nerveuses contenant le polypeptide vasoactif intestinal (VIP) et la somatostatine forment une sous-population de nerfs relativement clairsemée à l'intérieur du plexus nerveux endocardique (MARRON, *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent que les peptides et les neurotransmetteurs relâchés par les fibres nerveuses du plexus nerveux peuvent influencer la contractilité du myocarde modulé par l'EE (MARRON *et al.*, 1994).

Figure 4 **Présence du NPY dans les fibres et les fascicules nerveux du plexus neuronal de la matrice extracellulaire.**

(A) Marquage immunofluorescent du NPY au niveau du plexus neural de la matrice extracellulaire du côté auriculaire droit. (B) Marquage immunofluorescent du NPY au niveau du plexus neuronal de la matrice extracellulaire du côté ventriculaire droit.

Tiré de MARRON et al., 1994.



1.1.4. Effet de l'endothélium endocardique sur la performance cardiaque.

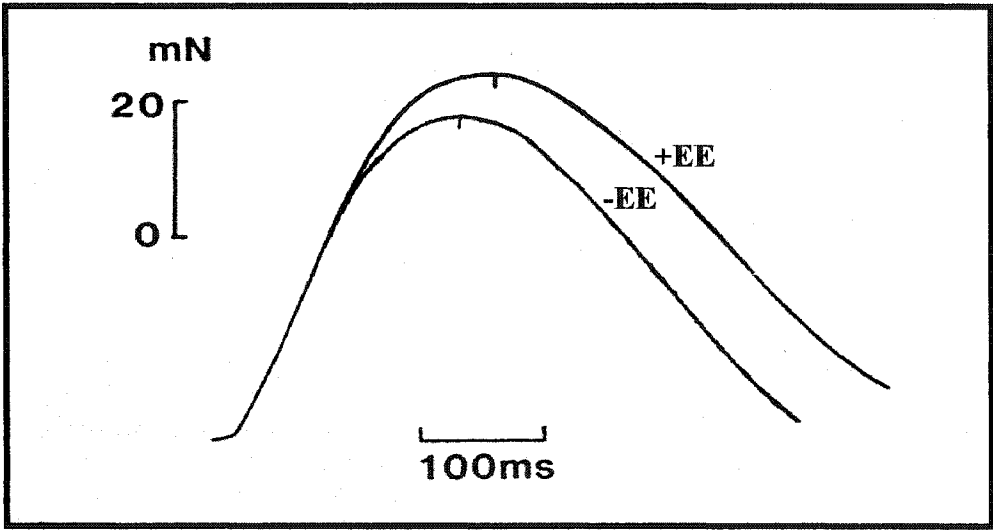
En 1988, Brutsaert et ses collaborateurs ont montré les premières évidences que les cellules endothéliales endocardiques influencent la fonction contractile du myocarde. Ils ont rapporté qu'une dénudation des cellules endothéliales endocardiques du muscle papillaire induit une relaxation précoce et une diminution de la force de contraction. Cependant, aucun changement significatif n'a été observé au niveau de la première phase de la contraction du muscle cardiaque (figure 5) (BRUTSAERT *et al.*, 1988).

Les mécanismes de transduction du signal des CEEs aux cardiomyocytes sous-jacents ne sont pas encore très bien connus. Des études plus approfondies sont donc nécessaires afin de mieux comprendre l'effet de l'EE sur la modulation de la performance cardiaque. BRUTSAERT et ANDRIES (1992) ont postulé deux mécanismes pour expliquer cet effet. Ils ont proposé que l'EE peut agir comme une barrière physico-chimique, contrôlant ainsi la composition ionique du milieu interstitiel des cellules cardiaques, et ils ont démontré que l'EE, par des stimuli physiques et humoraux, peut sécréter des médiateurs actifs qui modulent la contraction du muscle cardiaque (BRUTSAERT et ANDRIES, 1992).

Figure 5 Effet de l'EE sur la contraction isométrique du muscle cardiaque.

Cette figure montre la force d'une contraction isométrique en fonction du temps, en présence (+EE) et en absence (-EE) de l'EE au niveau d'un muscle papillaire de chat. La dénudation induit un changement dans la contraction isométrique, qui se traduit par une relaxation précoce et une diminution de la force contractile, sans aucun changement significatif dans la première phase de la contraction.

Modifié de BRUTSAERT et al., 1988.



1.1.5. L'EE est une barrière physicochimique.

En vertu de sa position unique à l'interphase entre le sang et les cardiomyocytes, et de sa perméabilité sélective due aux traits morphologiques caractéristiques décrits plus haut, les CEEs peuvent réguler finement la composition ionique du liquide interstitiel entourant les cardiomyocytes.

La barrière hémato-encéphalique est la barrière endothéliale la mieux étudiée. Elle est relativement imperméable aux ions, à plusieurs acides aminés, aux peptides et aux protéines. De plus, elle possède une résistance électrique supérieure à tous les autres endothéliums. La régulation ionique du liquide extracellulaire dans le cerveau est contrôlée par des canaux ioniques, des pompes et des transporteurs qui sont distribués d'une manière asymétrique entre la face luminale et la face basale des cellules endothéliales, assurant un transport du Na^+ du sang vers le cerveau et le transport du K^+ dans la direction opposée (ORKAND et OPAVA, 1994).

Comme le cerveau, le myocarde est un tissu hautement excitable dans lequel l'homéostasie ionique est vitale, non seulement pour l'organe, mais pour le corps entier. Des études électrophysiologiques assez récentes ont démontré la présence, sur la membrane de surface des CEEs, d'un grand nombre de canaux ioniques comme par exemple les canaux K^+ entrant retardés, les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} , les canaux Cl^- activés par le volume, les canaux cationiques activés par l'étirement, les canaux calciques de type R et la pompe Na^+ , K^+ -

ATPase (LASKEY *et al.*, 1990; HOYER *et al.*, 1994; FRANSEN *et al.*, 1995; 1997; MANABE *et al.*, 1995; JACQUES *et al.*, 2000). Le transport des ions, à travers les canaux ioniques et/ou via les pompes peut contribuer au transport direct des ions du sang vers le liquide interstitiel des cardiomyocytes et vice versa (BRUTSAERT *et al.*, 1998).

La localisation asymétrique des canaux cationiques non sélectifs et aussi de la pompe Na^+ , K^+ -ATPase sur la face basale des CEEs suggère qu'il y a un transport net du K^+ du cœur vers le sang et du Na^+ du sang vers le liquide interstitiel des cardiomyocytes (MANABE *et al.*, 1995), comme il a été déjà décrit pour l'endothélium des micro-vaisseaux de la barrière hémato-encéphalique (HANSEN *et al.*, 1977; BETZ, *et al.*, 1980). Pour détails voir BRUTSAERT *et al.*, 1998.

Un trait unique de la barrière hémato-encéphalique est sa haute résistance électrique trans-endothéliale ($1500\text{-}2000\Omega\text{cm}^2$) qui est beaucoup plus élevée que les autres barrières endothéliales ($6\text{-}20\Omega\text{cm}^2$) (BANNON *et al.*, 1995). En 1998, BRUTSAERT et ses collaborateurs ont rapporté que la résistance électrique trans-endothéliale des CEEs isolées de porc est de l'ordre de 50 à $60\Omega\text{cm}^2$. Ces valeurs sont 2 à 5 fois plus élevées que les autres barrières endothéliales suggérant ainsi que l'EE peut jouer le rôle d'une barrière active entre le sang et le liquide interstitiel des cardiomyocytes (BRUTSAERT *et al.*, 1998). De plus, outre son rôle comme régulateur de la performance cardiaque, l'EE en étant une barrière active entre le sang circulant et les myocytes cardiaques, contribue au maintien de l'homéostasie ionique dans le milieu interstitiel qui entoure les fibres de Purkinje

et le plexus neuronal sous-endocardique (MARRON *et al.*, 1995). Pour détails voir BRUTSAERT *et al.*, 1998.

1.1.6. Relâchement de médiateurs cardioactifs par l'EE.

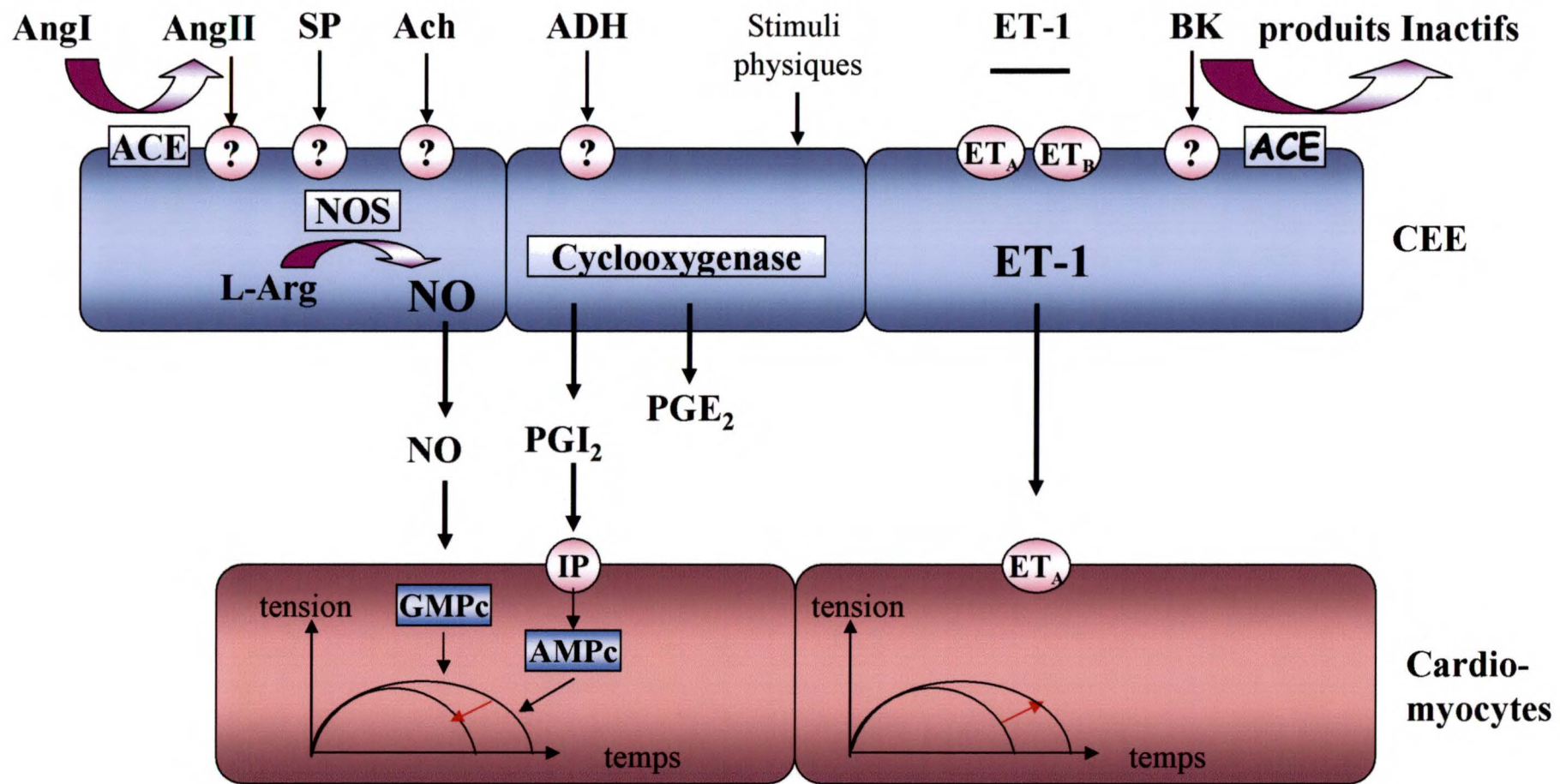
En plus de sa fonction comme barrière physico-chimique, l'EE joue le rôle d'un organe paracrine qui peut relâcher une variété de médiateurs chimiques, exerçant des effets importants sur la fonction contractile du myocarde et pouvant contribuer, du point de vue physiologique et pathophysiologique, à d'autres fonctions comme la croissance, la différenciation et l'hypertrophie des myocytes cardiaques (BRUTSAERT *et al.*, 1996). Le relâchement de tels médiateurs par l'EE a été aussi confirmé *in vivo* chez l'homme (PAULUS *et al.*, 1994; 1995). Parmi les médiateurs cardioactifs relâchés par l'EE, on note l'oxyde nitrique (NO), l'endothéline-1 (ET-1), les prostanoïdes, les adényl-purines, ainsi que d'autres substances qui ne sont toujours pas identifiées. Les CEEs possèdent aussi l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ACE) et des activités kininase, qui déterminent les niveaux locaux de l'angiotensine II (Ang II) et de la bradykinine (BK) (SCHULZ *et al.*, 1991; YAMADA *et al.*, 1991; LINDPAINNER et GRANTEN, 1991; PAUL *et al.*, 1992; MEBAZAA *et al.*, 1993; 1993a; SHAH *et al.*, 1996) (figure 6).

Figure 6 Les facteurs libérés par l'endothélium endocardique.

L'EE produit des facteurs qui peuvent moduler la fonction contractile du muscle cardiaque sous-jacent.

Ang = angiotensine; ACE = enzyme de conversion de l'angiotensine; Ach = acétylcholine; ADH = vasopressine; BK = bradykinine; AMPc / GMPc = adénosine / guanosine monophosphate cyclique; ET-1 = endothéline-1; L-Arg = L-arginine; NO = oxyde nitrique; PGE₂ = prostaglandine E₂; PGI₂ = Prostaglandine I₂; SP = substance P; les cercles représentent les récepteurs respectifs des substances agissant sur eux.

Modifié de PAULUS, 1994.



1.1.6.1. L'oxyde nitrique.

Le NO est l'une des plus petites molécules de signalisation biologiquement active. Il compte aussi parmi les premiers facteurs de nature gazeuse ayant une variété d'actions physiologiques et pathophysiologiques (CULOTTA *et al.*, 1992).

Le NO est produit par l'action des enzymes NO synthases (NOS) qui vont catalyser l'oxydation séquentielle de la L-arginine en NO et L-citrulline (ABU-SOUD et STUEHR, 1993; PALMER *et al.*, 1988). Le NO ne possède pas de récepteurs, il diffuse rapidement à travers les membranes cellulaires et interagit avec ses cibles à l'intérieur des cellules (MONCADA; 1992). La première molécule impliquée dans la voie de l'oxyde nitrique est la guanylate cyclase (GC) (MONCADA *et al.*, 1991). La GC catalyse la conversion de la guanosine triphosphate en guanosine 3', 5' monophosphate cyclique (GMPC). Ainsi, l'action première du NO est une élévation dans les taux de GMPC intracellulaire.

En 1991, SCHULZ et ses collaborateurs ont démontré que les CEEs relâchent du NO, qui à son tour va moduler l'activité contractile du myocarde. Plusieurs études ont également démontré que l'élévation du GMPC par le 8-bromo-GMPc (analogue du GMPC) dans les cardiomyocytes de rat (SHAH *et al.*, 1994), l'administration du NO exogène ou de la substance P (stimule le relâchement du NO endogène) dans le muscle papillaire isolé de furet (SHAH *et al.*, 1991) ou dans le cœur isolé de cochon d'Inde (GROCOTT-MASON *et al.*,

1994) induisent une relaxation précoce de la contraction isométrique des cardiomyocytes avec une diminution de la force de contraction (pour détails voir SHAH *et al.*, 1996 et BRUTSAERT *et al.*, 1996). En 1994, PAULUS et ses collaborateurs ont rapporté un effet similaire sur le cœur humain *in vivo*. Leurs résultats ont démontré qu'une injection intra-coronarienne de sodium nitroprusside cause un changement dans le comportement contractile du ventricule gauche, montrant ainsi un effet direct du NO sur la relaxation de ce dernier (PAULUS *et al.*, 1994). Il semble que l'effet inotrope négatif du NO est dû à la diminution de la sensibilité des myofilaments contractiles au calcium intracellulaire causée par l'augmentation du GMPc (SHAH *et al.*, 1994), et/ou par le blocage des courants calciques de type L (BKAILY et SPERELAKIS, 1985) et/ou due à l'hyperpolarisation de la membrane via l'activation du canal K^+ GMPc-dépendant (BKAILY, 1994d). De façon opposée, DOLLINGER et WAHLER (1994) ont rapporté que le GMPc peut augmenter la concentration du calcium intracellulaire. Ces dernières données sont donc contradictoires avec les données déjà connues concernant l'activité inotrope négative du NO et du GMPc mentionnée plus haut. En accord avec les résultats de DOLLINGER et WAHLER (1994), d'autres groupes ont démontré que l'administration de faibles doses de sodium nitroprusside ou de 8-bromo GMPc au niveau du muscle papillaire de chat dépourvu des CEEs, augmente la contractilité de ce muscle (LAITE-MOREIRA *et al.*, 1994; MOHAN *et al.*, 1996). Cependant, une concentration plus élevée de

ces composés provoquent un effet inotrope négatif similaire à ceux décrits plus haut (LAITE-MOREIRA *et al.*, 1994; MOHAN *et al.*, 1996).

Bien que les mécanismes moléculaires par lesquels le GMPc médie l'effet inotrope positif du muscle cardiaque restent encore spéculatifs, des études ont rapporté que le GMPc inhibe une phosphodiésterase, induisant une accumulation de l'AMPc qui à son tour va activer les canaux calciques de type L et provoquer l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (WALTER, 1989; KU *et al.*, 1990; DOLLINGER et WAHLER, 1994). D'autre part, des études ont démontré que le GMPc peut augmenter le Ca^{2+} intracellulaire dans les myocytes cardiaques, cet effet pouvant être médié par l'adénosine diphosphate ribose cyclique (ADPRc), un second messager récemment décrit, et qui pourrait stimuler le relâchement du Ca^{2+} des réserves intracellulaires via l'activation des récepteurs à la ryanodine (GALIONE *et al.*, 1991; GALIONE, 1993; BERRIDGE, 1993).

En conclusion, l'activité inotrope du NO-GMPc dépend de la concentration du GMPc dans les myocytes cardiaques (LAITE-MOREIRA *et al.*, 1994; MOHAN *et al.*, 1996). En effet, l'activité basale du NO et par conséquent la faible concentration du GMPc maintiennent la fonction cardiaque à l'état physiologique (BRUTSAERT *et al.*, 1996). Par contre, l'accumulation intracellulaire du GMPc due au relâchement excessif du NO par l'EE, suite à l'augmentation des forces de cisaillement ou à la présence de cytokines, comme dans certains cas pathologiques, pourrait diminuer la performance cardiaque (PAULUS *et al.*, 1994).

1.1.6.2. L'endothéline- 1.

L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide vasoconstricteur puissant, composé de 21 acides aminés (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Celui-ci est relâché par les cellules endothéliales (YANAGISAWA et MASAKI, 1989). Très récemment, nous avons démontré dans notre laboratoire que l'ET-1 augmente d'une façon dose-dépendante la concentration du calcium cytosolique ($[Ca]_c$) et du calcium nucléaire ($[Ca^{2+}]_n$) dans les CEEs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines, et ce à la fois dans les CEEs isolées à partir du ventricule droit (CEEDs) que gauche (CEEGs), avec un EC_{50} plus faible au niveau des CEEGs (10^{-11} M) par rapport au CEEDs (10^{-10} M) (JACQUES *et al.*, 2000). Cet effet semble être principalement dû à l'activation des récepteurs ET_A . Cependant, les récepteurs ET_B semblent être impliqués en partie dans l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ dans les CEEDs. Ces résultats suggèrent, l'existence d'une différence entre les CEEs isolées du ventricule droit par rapport à celles isolées du ventricule gauche (JACQUES *et al.*, 2000). D'autres groupes ont également démontré la présence des récepteurs ET_A et ET_B , au niveau des CEEs humaines et de différentes espèces animales comme le porc et le rat (DAVENPORT *et al.*, 1989).

Récemment, il a été démontré que l'ET-1 affecte le transport calcique des cellules cardiaques ventriculaires par l'activation des canaux calcique de type T et L (CURTIS *et al.*, 1993; BKAILY *et al.*, 1995; 1997). De plus, notre groupe a démontré que l'ET-1 augmente l'influx calcique à travers les canaux calciques dépendant du voltage de type R dans plusieurs types cellulaires incluant les

cellules cardiaques ventriculaires, les cellules du muscle lisse vasculaire et les cellules endothéliales vasculaires et endocardiques (BKAILY *et al.*, 1995; 1997; JACQUES *et al.*, 2000).

D'autre part, l'ARNm de l'ET-1 a été identifié dans les CEEs ventriculaires de mouton en culture (MEBAZAA *et al.*, 1993a). De plus, il a été démontré que les CEEs de mouton et de porc en culture ainsi que l'EE du muscle papillaire de chat relâchent l'ET-1 (MEBAZAA *et al.*, 1993a; SINEY et LEWIS, 1994; EVANS *et al.*, 1994; DE KEULNAER *et al.*, 1995). Cette relâche de l'ET-1 est due à l'augmentation de la force de cisaillement, à l'hypoxie et à l'activation des récepteurs présents à la surface membranaire des CEEs par des agonistes pharmacologiques. (RUBANYI et POLOKOFF, 1994). Plusieurs groupes ont rapporté une interaction complexe entre l'ET-1 et d'autres facteurs cardioactifs comme le NO, l'AngII et le peptide natriurétique auriculaire (ANP). Par exemple, l'ET-1 peut induire la relâche de l'ANP des tissus auriculaires (FUKUDA *et al.*, 1988). Cependant, l'AngII peut stimuler l'expression de l'ARNm de l'ET-1 (CHUA *et al.*, 1993) et le NO peut inhiber la production de l'ET-1 (RUBANYI et POLOKOFF, 1994).

En 1993, MEBAZAA et ses collaborateurs ont rapporté que l'ajout d'un milieu conditionné par les CEEs de mouton en culture sur les cardiomyocytes de rat, exerce un effet inotrope positif, une augmentation de l'amplitude de contraction accompagnée d'une augmentation transitoire du $[Ca^{2+}]_i$; (MEBAZAA

et al., 1993a). Ces études suggèrent donc que l'ET-1 endogène relâchée par les CEEs exerce un effet inotrope positif sur le cœur en présence d'un EE intact.

1.1.6.3. Les prostanoïdes.

Les prostanoïdes, comprenant les prostaglandines (PGs) et le thromboxane A_2 (TXA₂) sont des puissants médiateurs à action locale (BERGSTROM, 1967, VERGNE *et al.*, 1996). Elles peuvent agir de façon paracrine ou autocrine via des récepteurs membranaires liés aux protéines G qui leurs sont spécifiques. Il existe un type de récepteur aux prostaglandines pour chaque prostaglandine naturelle. Ainsi on trouve les récepteurs EP, DP, FP, IP, et TP qui correspondent respectivement à la prostaglandine E₂ (PGE₂), la prostaglandine D₂ (PGD₂), la prostaglandine F₂ (PGF_{2 α}), la prostaglandine I₂ (PGI₂) et le TXA₂ (pour plus de détails voir la revue de NARUMIYA *et* FITZGERALD, 2001). Les prostaglandines sont synthétisées à partir d'un précurseur commun, l'acide arachidonique (AA). Sous l'effet de la phospholipase A2 (PLA₂), l'AA est libéré des phospholipides membranaires et devient disponible pour les différents enzymes faisant partie de la cascade de l'AA (NUTGEREN *et al.*, 1966; LANDS *et* SAMUELSSON, 1968).

Des prostanoïdes, comme la PGI₂ et PGE₂ sont à la fois relâchés par les CEEs et les cellules endothéliales vasculaires (CEVs) (DUSTING *et*

McDONALD, 1990; MEBAZAA *et al.*, 1993). Ces prostanoïdes jouent un rôle très important dans la régulation du tonus vasculaire et dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (DUSTING et McDONALD, 1990). Dans certaines conditions expérimentales telles que l'hypoxie, il a été rapporté que le relâchement des prostanoïdes par les CEEs est 34 fois plus important que celui des CEVs (MEBAZAA *et al.*, 1995).

Plusieurs groupes ont obtenu des résultats contradictoires concernant l'effet direct des prostanoïdes sur la contractilité du myocarde. Certains ont démontré que la PGI₂ augmente la contractilité de l'oreillette isolée de cochon d'Inde (effet inotrope positif) (FASSINA *et al.*, 1983). Cependant, aucun effet de la PGI₂ n'a été observé sur les muscles papillaires isolés de chat (COULTENYE *et al.*, 1985). Par contre, d'autres groupes ont démontré que la PGI₂ réduit la contractilité des cardiomyocytes isolés de rat (effet inotrope négatif) (DAS *et al.*, 1983). Des recherches plus approfondies sont donc nécessaires afin de mieux comprendre l'effet des prostanoïdes sur la modulation des fonctions cardiaques (pour revue voir SHAH *et al.*, 1996).

1.1.6.4. Modulation de l'action inotrope de substances circulantes.

Plusieurs études *in vitro* ont démontré que l'EE participe à la réponse inotrope causée par plusieurs substances circulantes (voir les revues de SHAH *et al.*, 1996 et de BRUTSAERT *et al.*, 1996). Il a été rapporté que l'ANP exerce un

effet inotrope négatif sur le cœur, et que cet effet nécessite la présence d'un EE intact (MEULEMANS *et al.*, 1988; WILCOX *et al.*, 1991). De même, l'effet inotrope positif de la phényléphrine et des radicaux libres d'oxygène nécessite aussi la présence d'un EE intact (MEULEMANS *et al.*, 1990a; De KEULNAER *et al.*, 1995). D'autre part, il a été démontré que l'EE modifie la réponse inotrope des cardiomyocytes à la sérotonine, la vasopressine, l'acétylcholine, l'angiotensine I et II et l'endothéline-1 (SHAH *et al.*, 1989; MEULEMANS *et al.*, 1990; SCHOEMALEEN *et al.*, 1990; LI *et al.*, 1991; MOHAN *et al.*, 1994). Il semble donc y avoir des interactions complexes entre les substances circulantes, les facteurs libérés de l'EE et leurs effets sur le cœur.

1.2. Neuropeptide Y (NPY) et peptides reliés.

1.2.1. Découverte.

L'histoire de la famille du NPY a commencé il y a plus de 20 ans avec la découverte d'un peptide de 36 acides aminés isolé du pancréas de poulet et nommé polypeptide pancréatique (PP) (KIMMEL *et al.*, 1975). Aussitôt après, des anticorps dirigés contre le PP de poulet ont été développés et des études d'immunohistochimie ont révélé la présence d'une immunoréactivité pour le PP dans le système nerveux central (SNC) de différentes espèces (LOREN *et al.*,

1979). Malgré que l'immunoréactivité du PP observée dans le cerveau des mammifères était très élevée, l'isolation du PP du SNC a été infructueuse. Sept années se sont écoulées avant de découvrir la nature de cette immunoréactivité détectée dans le cerveau des mammifères (voir la revue de DUMONT *et al.*, 2000b).

En 1982, TATEMOTO a purifié, à partir des extraits de l'intestin de porc, un peptide de 36 acides aminés. Le séquençage de ce peptide a révélé la présence d'un résidu tyrosine à la fois aux positions N-et C-terminales. Ce peptide a été nommé peptide YY (PYY), "Y" étant l'abréviation pour désigner l'acide aminé tyrosine. Le même groupe a isolé aussi à partir des extraits de cerveau de porc, un autre peptide de 36 acides aminés, et comme pour le PYY, il contenait un résidu tyrosine aux positions N-et C-terminales (TATEMOTO, 1982). Dû à sa présence dans le cerveau, ce peptide a été nommé neuropeptide Y. Ces deux peptides présentent une importante homologie de leur séquence peptidiques avec le PP (Tableau 1) et c'est pourquoi ils ont été considérés comme étant membres de la famille du PP (TATEMOTO *et al.*, 1982). Par la suite, des anticorps ont été développés et les techniques d'immunohistochimie et de radioimmunos dosage ont révélé la présence d'une immunoréactivité importante pour le NPY (NPY-ir) dans le cerveau de mammifères (DUMONT *et al.*, 2000b). En effet, le NPY est un des peptides les plus abondants du SNC des mammifères (HENDY, 1983 ; PELLETIER *et al.*, 1984; O'DONOHUE *et al.*, 1985; CHAN-PALAY *et al.*, 1985; 1986; CHRONWALL *et*

Tableau 1: Séquence polypeptidique du hNPY et de ses peptides apparentés

hNPY	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRY-amide
hPYY	<u>YPIKPEAPGEDASPEELNRY</u><u>YASLRHYLNLVTRQRY</u>-amide
hPP	<u>APLEPVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRY</u>-amide

Il est à noter que les acides aminés en gras et soulignés au niveau des séquences du hPYY et du hPP représentent les acides aminés en commun avec le hNPY.

Tiré de MICHEL et al., 1998

al., 1985; DE QUIDT et EMSON, 1986, 1986a; GRAY et MORLEY, 1986). De plus, il a été démontré que le PP-ir déjà observé dans le cerveau était en effet dû à la réactivité croisée des anticorps utilisés avec le NPY (DiMAGGIO *et al.*, 1985). Bien que, le PYY fut considéré comme étant exclusivement présent dans les cellules endocrines de l'intestin (SOLOMON, 1985; McDONALD, 1988; LABURTHE, 1990), il a été aussi détecté dans le SNC, en particulier dans le tronc cérébral et dans différentes régions de l'hypothalamus (BROOME *et al.*, 1985; EKMAN *et al.*, 1986). Le NPY est présent chez tous les vertébrés, et est un des peptides les plus conservés au cours de l'évolution (LARHAMMAR, 1996), suggérant ainsi un rôle très important de ce peptide dans plusieurs fonctions physiologiques.

1.2.2. Structure du NPY.

Le NPY, le PYY et le PP ont une structure tertiaire constituée d'une hélice polyproline N-terminale (résidus 1-9) reliée à une hélice α -amphiphilique (résidus 14-30) par une boucle- β créant ainsi une structure en épingle à cheveux (ALLEN *et al.*, 1987; McKERELL, 1988; 1989; MINAKATA *et al.*, 1989; McLEAN *et al.*, 1990; SCHWARTZ *et al.*, 1990). Les hélices sont reliées entre elles par des interactions hydrophobes. La portion C-terminale (résidus 30-36) est disposée à

l'extérieur de la boucle en forme d'épingle à cheveux (GLOVER *et al.*, 1983) (figure 7).

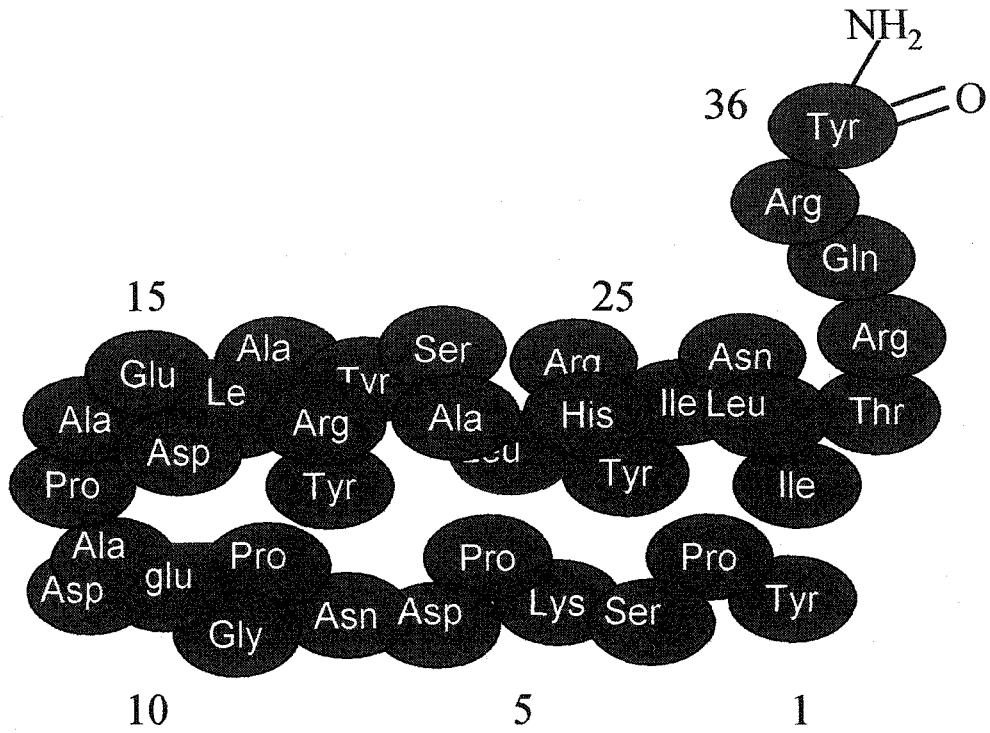
1.2.3. Distribution du NPY, PYY et PP.

En périphérie, les fibres nerveuses immunoréactives pour le NPY se retrouvent dans la majorité des organes étudiés incluant le système cardiovasculaire, la glande surrénale, le rein, le système urogénital, gastro-intestinal et le système respiratoire (EDVINSSON *et al.*, 1983; 1984a; LUNDBERG *et al.*, 1983; 1985; UDDMANN *et al.*, 1985; ALLEN *et al.*, 1985; MATTIASSON *et al.*, 1985;). Le NPY est présent dans la plupart des fibres nerveuses sympathiques et plus particulièrement dans les fibres périvasculaires et ce dans tous les systèmes (LUNDBERG et TATEMOTO, 1982; EKBLAD, *et al.*, 1984; SUNDLER, *et al.*, 1986; SHEIKH, *et al.*, 1988; LUNDBERG, *et al.*, 1989; WAHLESTEDT, *et al.*, 1990). Le NPY est aussi présent au niveau des fibres nerveuses périvasculaires non adrénérgiques (GIBBINS et MORRIS, 1988), entériques (SUNDLER, *et al.*, 1986), cardiaques non sympathiques (FORSGREN, 1989) et dans certaines fibres parasympathiques (SUNDLER, *et al.*, 1986). Au niveau du cœur, ce peptide est localisé dans les neurones qui innervent le myocarde, les fibres nerveuses du plexus neuronal de la matrice extracellulaire, les nœuds sinoauriculaire et auriculoventriculaire, les artères coronaires et les valves cardiaques (LUNDBERG *et al.*, 1983; ALLEN *et*

Figure 7 Structure primaire du NPY.

Le NPY, le PYY et le PP ont une structure tertiaire constituée d'une hélice polyproline N-terminale type II (résidus 1-9) reliée à une hélice α -amphiphilique (résidus 14-30) par une boucle- β type II, créant ainsi une structure en épingle à cheveux. Les hélices sont reliées entre elles par des interactions hydrophobes.

Modifiée de SHWARTZ et al., 1990.



Hélice proline

YPSKPDNPG

Boucle- β

EDAP

Hélice α -amphiphilique

AEDLARYYSALRHYINL ITRQRY-amide

al., 1986; DALSGAARD *et al.*, 1986; CORR *et al.*, 1990; MARRON *et al.*, 1994). Pour plus de détails voir la revue de WAHLESTEDT et REIS (1993).

Dans les neurones sympathiques, le NPY est fréquemment co-localisé avec la norépinéphrine (NE) (ALLEN *et al.*, 1985a; LUNDBERG *et al.*, 1985; CORR *et al.*, 1990). Dans les neurones non-sympathiques, ce peptide se retrouve seul ou en co-localisation avec le VIP, le peptide histidyl-isoleucine (PHI) et l'Ach (FURNESS *et al.*, 1983; FORSGREN, 1989a; CORR *et al.*, 1990).

Le NPY est aussi abondant dans les cellules chromaffines contenant de la noradrénaline (NA) au niveau de la médullo surrénale (ALLEN *et al.*, 1983; GROUZMANN *et al.*, 1989). Des études montrent aussi la présence extra-neuronale de NPY dans les plaquettes mais chez le rat seulement (MYERS *et al.*, 1988; 1990), et au niveau des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998a). Le PYY se trouve principalement au niveau des cellules endocrines du tractus gastrointestinal inférieur (LUNDBERG *et al.*, 1982). Cependant, de faibles quantités de PYY sont aussi présentes dans certaines fibres sympathiques (HAPPOLA *et al.*, 1990). Le PP se trouve principalement dans les cellules endocrines des îlots pancréatiques (ALUMETS *et al.*, 1978). Pour plus de détails voir la revue publiée par WAHLESTEDT et REIS en 1993.

1.2.4. Régulation de l'expression des gènes du NPY.

L'ADN complémentaire qui code pour le NPY humain a été isolé pour la première fois à partir d'une tumeur de la glande surrénale (phéochromocytome) qui contient des concentrations élevées de NPY (MINTH *et al.*, 1984; 1986). L'ARNm correspondant se traduit en un précurseur simple du NPY, comprenant 97 acides aminés (MINTH *et al.*, 1984; 1986). Ce précurseur contient un peptide signal hydrophobe de 28 acides aminés, nécessaire à la pénétration de celui-ci dans la lumière du réticulum endoplasmique i.e dans le compartiment sécrétoire de la cellule (MINTH *et al.*, 1984; 1986). Par la suite, le peptide signal est clivé, libérant une pro-hormone de 69 acides aminés. Dans la pro-hormone, le NPY mature (36 acides aminés) est flanqué en sa partie C-terminale par 33 acides aminés, dont trois ont un motif Gly-Lys-Arg, nécessaires à l'amidation (Gly), un aspect critique nécessaire aux multiples fonctions du NPY (GRUNDEMAR *et al.*, 1990; SHEN *et al.*, 1991). Le peptide formé à partir des autres 30 acides aminés restants du précurseur est appelé CPON (peptide qui flanque la partie C-terminal du NPY). Bien que la séquence de CPON a été hautement conservée durant l'évolution, aucune fonction précise n'a été assignée à celui-ci. Le CPON se trouve dans toutes les cellules qui produisent le NPY et les deux peptides sont donc, par conséquent, libérés ensemble (ALLEN *et al.*, 1987; SUBURO *et al.*, 1992). Plusieurs facteurs régulent l'expression des gènes du NPY. Ceux-ci incluent le phorbol ester, le facteur de croissance nerveux (NGF), ainsi que des

activateurs de l'AMPc et des protéines kinases phospholipide- et calcium-dépendantes (SABOL et HIGUCHI, 1990; ALLEN et BALBI, 1993). Pour plus de détails voir la revue publiée par WAHLESTEDT et REIS en 1993.

1.2.5. Synthèse et sécrétion du NPY.

La synthèse et la sécrétion du NPY ont été décrites en détail dans les neurones sympathiques (ZUKOWSKA-GROJEC et WAHLESTEDT, 1993). Dans ces neurones, le NPY est stocké dans de grandes et denses vésicules de sécrétion contenant aussi la NA. Quoique le NPY soit exclusivement co-localisé avec la NA dans les grandes vésicules, la NA est aussi présente dans les petites vésicules de sécrétion (LUNDBERG *et al.*, 1982a; 1983; FRIED *et al.*, 1985, 1985a). Pour plus de détails sur la synthèse et la sécrétion du NPY, le lecteur est référé aux chapitres de livres de ZUKOWSKA-GROJEC et WAHLESTEDT (1993) et de MALMSTRÖM et LUNDBERG (1997).

La synthèse et le stockage du NPY dans des vésicules de sécrétion se font dans le corps cellulaire des neurones sympathiques. Par la suite, elles se déplacent jusqu'au site de sécrétion par un transport axonal (FRIED *et al.*, 1985, 1985a). En 1991, SCHALLING et ses collaborateurs ont observé que le niveau d'ARNm ainsi que le transport axoplasmique du NPY augmentent après un traitement avec la réserpine (connue pour son effet sur l'augmentation de la fréquence de dépolarisation des neurones sympathiques) (PERNOW *et al.*, 1988),

suggérant que l'activité nerveuse est cruciale pour la synthèse du NPY. Une autre étude a démontré que l'ARNm du NPY augmente d'une façon significative dans les ganglions sympathiques de rat suite au stress causé par l'immobilisation (NANKOVA *et al.*, 1996). Par conséquent, l'importance du NPY au niveau de la transmission sympathique change avec le degré de stress provenant de l'environnement (MALMSTRÖM, 1997).

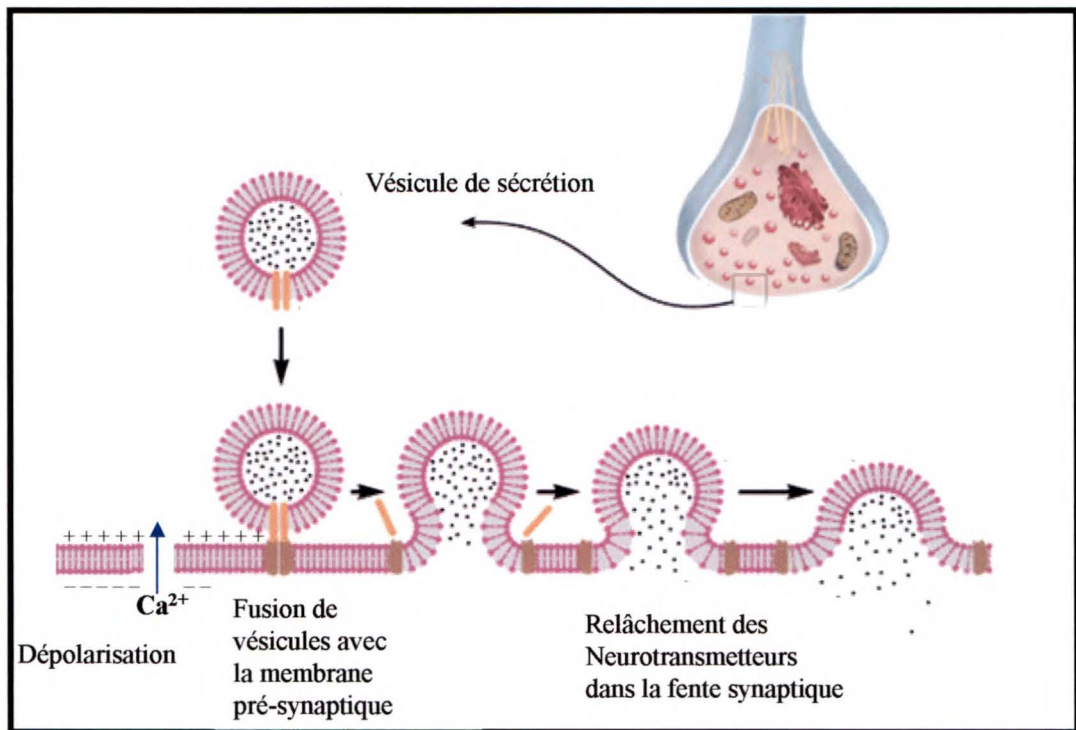
Le relâchement du NPY par les terminaisons nerveuses dépend de la fréquence de l'activité nerveuse et de l'influx calcique à travers la membrane de surface par l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage de type N (HAASS *et al.*, 1990). Bien que la NA est relâchée lors d'activités nerveuses à basse fréquence, le relâchement du NPY nécessite des trains de potentiel d'action à haute fréquence, de sorte que le $[Ca^{2+}]_i$ dans la terminaison nerveuse s'élève à un niveau suffisant pour déclencher la libération du NPY (ALLEN *et al.*, 1984; LUNDBERG *et al.*, 1984; 1986; 1989a, RUDEHILL *et al.*, 1986). Cette augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ semble être essentielle pour que les vésicules synaptiques libèrent leur contenu en NPY et ce par un phénomène d'exocytose (LUNDBERG *et al.*, 1984; 1987) (figure 8).

Le relâchement de la NA et du NPY par les neurones sympathiques semble être modulé par auto-inhibition, principalement, via l'activation pré-synaptique des récepteurs α_2 adrénergiques par la NA endogène. La régulation de la libération du NPY au niveau pré-synaptique par la NA peut être un facteur décisif empêchant la relâche du NPY lors des activités nerveuses de faible

Figure 8 Sécrétion du NPY par les neurones sympathiques.

Les vésicules de sécrétion du NPY sont véhiculées jusqu'au site de sécrétion par un transport axonal. Le relâchement du NPY nécessite des trains de potentiel d'action à haute fréquence de sorte que la $[Ca^{2+}]_i$ dans la terminaison nerveuse s'élève à un niveau suffisant pour déclencher la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane pré-synaptique et la libération du NPY dans la fente synaptique. Les vésicules libèrent leur contenu en NPY par un phénomène d'exocytose.

Modifiée de: homepage.psy.utexas.edu



fréquence (MALMSTRÖM et LUNDBERG, 1997). D'autre part, ce fait peut expliquer pourquoi il est difficile de vider les tissus du NPY et d'inhiber sa relâche après une longue durée de stimulation neuronale (MODIN *et al.*, 1993). La NA n'est pas le seul facteur qui module le relâchement des neurotransmetteurs. Les récepteurs NPY au niveau pré-synapthique peuvent aussi inhiber la relâche des neurotransmetteurs. Ainsi, il a été démontré que le PYY peut supprimer la relâche du NPY endogène provoquée par la stimulation des neurones sympathiques (PERNOW *et al.*, 1989). Chez le rat, il a été rapporté que l'inhibition de la relâche du NPY au niveau du canal déférent est due à l'activation pré-synapthique du récepteur Y_2 (WAHLESTEDT *et al.*, 1986), tandis que, chez le lapin, l'inhibition est due à l'activation du récepteur Y_1 (DOODS et KRAUSE, 1991). Cependant, la libération du NPY semble être facilitée par l'activation des récepteurs β -adrénergiques et des récepteurs de l'angiotensine II (PERNOW et LUNDBERG, 1989; DAHLÖF *et al.*, 1991). Pour plus de détails voir MALMSTRÖM et LUNDBERG (1997).

À l'état physiologique, la concentration plasmatique du NPY s'élève particulièrement lors du stress et des exercices physiques (LUNDBERG *et al.*, 1985a; PERNOW *et al.*, 1986). Plusieurs espèces, incluant le porc et l'homme, ont une concentration plasmatique basale de NPY de l'ordre du 20 à 40 pM (LUNDBERG *et al.*, 1987). Par contre, chez le rat, la concentration plasmatique est de l'ordre de 200 pM (ERICSSON *et al.*, 1991). Cette différence est due principalement à la libération du NPY des plaquettes chez le rat. Le NPY possède

une demi-vie plasmatique relativement élevée. Chez le porc et l'humain la disparition du NPY du plasma est biphasique avec une demi vie de 4 à 6 et de 20 à 40 minutes, respectivement (RUDEHILL *et al.*, 1987) tandis que celle de la noradrénaline est de 1 à 2 minutes (PERNOW *et al.*, 1986). Le NPY et le PYY peuvent être métabolisés par l'endopeptidase 24.11 neutre en des fragments inactifs, le NPY₁₋₃₀ et le PYY₁₋₂₉ (MEDEIROS et TURNER, 1994a; 1996) et par l'aminopeptidase P en fragments NPY₂₋₃₆ et PYY₂₋₃₆ (MEDEIROS et TURNER, 1994). Le NPY et le PYY peuvent aussi être clivés par la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) en NPY₃₋₃₆ et PYY₃₋₃₆ (MENTLEIN *et al.*, 1993). Il est intéressant de noter que ces deux fragments sont des agonistes pour les récepteurs Y₂ et Y₅. Le NPY₃₋₃₆ peut être aussi dégradé par des neuroendopeptidases en fragments biologiquement inactifs (MEDEIROS et TURNER, 1994). Pour plus de détails voir MALMSTRÖM (1997).

1.2.6. Les récepteurs au NPY et peptides reliés.

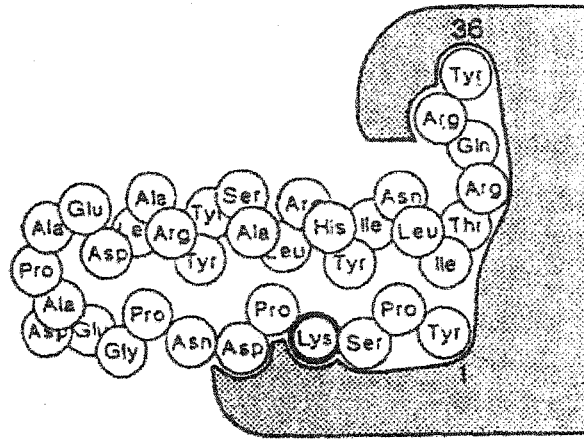
WAHLESTEDT et ses collaborateurs (1986) ont proposé la première classification des récepteurs au NPY. Cette classification était basée sur les différentes affinités du NPY et de ses fragments C-terminaux comme le NPY₁₃₋₃₆ et le PYY₁₃₋₃₆ sur différents essais biologiques. Les auteurs ont proposé l'existence de deux types de récepteurs au NPY; un récepteur pré-synaptique (le récepteur Y₂), qui est sensible au NPY, au PYY et aux fragments 13-36, et un

récepteur post-synaptique (le récepteur Y_1) qui n'est pas sensible aux fragments C-terminaux (figure 9). Toutefois, cette classification combinée, pré- (Y_2) versus post- (Y_1) synaptique n'est pas exclusive; plusieurs évidences démontrant la présence des récepteurs Y_1 et Y_2 au niveau de la membrane pré- comme post-synaptique (LUNDBERG *et al.*, 1988; 1988a; DOODS et KRAUSE, 1991; GRUNDEMAR *et al.*, 1992; McAULEY et WESTFALL 1992; St-PIERRE *et al.*, 1995, 2000; PICKEL *et al.*, 1998). Au début des années 90, le développement de deux analogues du NPY, le $[\text{Leu}^{31}, \text{Pro}^{34}]\text{NPY}$ et le $[\text{Pro}^{34}]\text{NPY}$ (FUHLENDORFF *et al.*, 1990, 1990a; SCHWARTZ *et al.*, 1990) a confirmé l'existence d'au moins deux types de récepteurs au NPY. Ces deux peptides agissent préférentiellement sur les récepteurs Y_1 (ED_{50} dans l'ordre du nM) et possèdent très peu d'affinité pour le récepteur Y_2 (affinité plus grande que 300 nM). De plus, des études fonctionnelles ont révélé que certains effets produits par une injection intracérébro-ventriculaire (ICV) du NPY et du PYY sont mimés par le $[\text{Leu}^{31}, \text{Pro}^{34}]\text{NPY}$ et le $[\text{Pro}^{34}]\text{NPY}$ (agonistes Y_1) mais pas par les fragments courts C-terminaux, le NPY_{13-36} et le PYY_{13-36} (agonistes Y_2). De façon opposée, d'autres effets du NPY/PYY sont mimés par les agonistes Y_2 (KALRA et CROWLEY 1992; DUMONT *et al.*, 1992, 1997; GRUNDEMAR *et al.*, 1993; BLEAKMAN *et al.*, 1993; McAULEY *et al.*, 1993; STANLEY, 1993; WAHLESTEDT et REIS., 1993; COLMERS et BLEAKMAN, 1994; GEHLERT, 1998). Par la suite, le clonage des récepteurs Y_1 et Y_2 a confirmé leur existence. Pour plus d'informations voir la revue de DUMONT *et al.* (2000b).

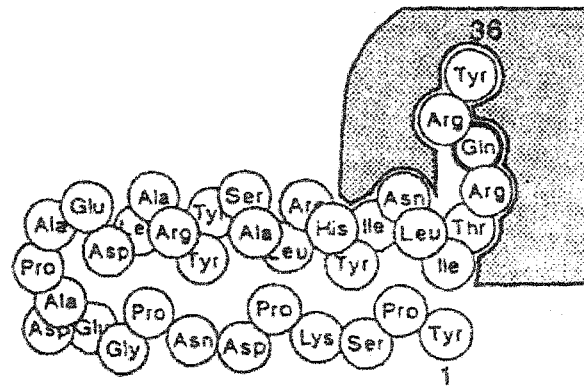
Figure 9 **Représentation schématique du récepteur Y₁ et du récepteur Y₂.**

Cette figure représente une schématisation de deux types de récepteurs au NPY, le récepteur Y₁ et le récepteur Y₂ selon la première classification de ceux-ci par WAHLESTEDT et ses collaborateurs en 1986. Le récepteur Y₁ nécessite la présence de toute la séquence des acides aminés du NPY pour être activé, tandis que, le récepteur Y₂ est activé de façon préférentielle par des fragments C-terminaux ainsi que par la séquence intacte du NPY.

Tiré de SCHWARTZ et al., 1990.



Récepteur Y₁



Récepteur Y₂

Jusqu'à maintenant, cinq types de récepteurs au NPY ont été identifiés et clonés, soient les récepteurs Y₁, Y₂, Y₄, Y₅ et y₆ (DUMONT *et al.*, 1992; WAHLESTEDT et REIS, 1993; GEHLERT, 1994, 1998; COLMERS et BLEAKMAN, 1994, BLOMQUIST et HERZOG, 1997; MICHEL *et al.*, 1998; BISCHOFF et MICHEL, 1999; INUI, 1999; VEZZANI *et al.*, 1999). Pour plus de détails voir la revue de DUMONT *et al.* (2000b). Tous les récepteurs au NPY connus jusqu'à présent appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Dans la majorité des types cellulaires étudiés, les récepteurs au NPY agissent par l'intermédiaire d'une protéine G, sensible à la toxine de pertusis (PTX) de type G_i ou G_o (MICHEL *et al.*, 1998) (Tableau 2). Dans la majorité des cellules étudiées, la réponse type suite à l'activation de ces récepteurs est l'inhibition de l'adenylyl cyclase (pour détails, voir la revue de MICHEL *et al.*, 1998). Cependant, l'inhibition de l'adenylyl cyclase ne peut probablement pas expliquer plusieurs réponses fonctionnelles obtenues après la stimulation des récepteurs au NPY (MICHEL *et al.*, 1998). Des réponses additionnelles qui sont restreintes à certains types cellulaires inclut l'inhibition des canaux calciques dans les neurones (EWALD *et al.*, 1998), l'activation ou l'inhibition des canaux potassiques au niveau des cardiomyocytes (MILLAR *et al.*, 1991) et des cellules du muscle lisse vasculaire (XIONG *et al.*, 1995) respectivement. En se basant sur des expériences ayant utilisé des bloqueurs des canaux calciques, il a été postulé que le NPY stimule les canaux

Tableau 2: Caractéristiques des différents types de récepteurs au NPY

Nomenclature	Y ₁	Y ₂	Y ₄	Y ₅	Y ₆
Autres noms	-	-	PP ₁	Y ₁ -like, Food intake receptor	Y ₅ , PP ₂ , Y _{2B}
Ordre de puissance	NPY ≥ PYY >> PP	NPY ≥ PYY >> PP	PP > NPY = PYY	NPY ≥ PYY ≥ PP	NPY = PYY > PP
Agonistes sélectifs	[Leu ³¹ , Pro ³⁴]NPY [Pro ³⁴]NPY [Leu ³¹ , Pro ³⁴]PYY [Pro ³⁴]PYY	NPY ₁₃₋₃₆ NPY ₃₋₃₆ PYY ₃₋₃₆	PP [Leu ³¹ , Pro ³⁴]NPY Leu ³¹ , Pro ³⁴]PYY	PP [Leu ³¹ , Pro ³⁴]NPY [Leu ³¹ , Pro ³⁴]PYY PYY ₃₋₃₆	-
Antagonistes sélectifs	GR231118 SR120107A BIBP3226 BIBO3304	T4 (NPY ₃₃₋₃₆) BIIE0246	-	-	-
Radioligands	[¹²⁵ I] [Leu ³¹ , Pro ³⁴]NPY [³ H] BIBP3226	[¹²⁵ I] PYY ₃₋₃₆	[¹²⁵ I] PP	[¹²⁵ I] PP	-
Protéines G	G _{i/o}	G _{i/o}	G _{i/o}	G _{i/o}	G _{i/o}
Gène/Chromosome	NPY1R/ 4q31.3-32	NPY2R/ 4q31	NPY4R/ 10q11.2	NPY5R/ 4q31.3-32	NPY6R/ 5q31

Tiré de MICHEL et al., 1998

calciques de type L dans les cellules du muscle lisse vasculaire (MICHEL et RACHER, 1995; MICHEL *et al.*, 1998). Il a été aussi rapporté que le NPY peut mobiliser le Ca^{2+} des réserves intracellulaires dans les cellules nerveuses de rat en culture, et ce, par un mécanisme dépendant de la voie de l'inositol triphosphate (IP_3) (PERNEY et MILLER, 1989). Par contre, une autre étude a rapporté une mobilisation du Ca^{2+} par une voie indépendante de l' IP_3 dans la lignée cellulaire HEL (MOTULSKY et MICHEL, 1988). La sensibilité de certaines réponses à l'inhibiteur de la cyclooxygénase, l'indométacine, indique une activation possible de la phospholipase A_2 par les récepteurs au NPY (MARTIN et PATTERSON, 1989). L'activation de la phospholipase D ou de la tyrosine kinase, qui peut avoir lieu suite à l'activation de certains récepteurs couplés au protéine G_i/G_o , n'est pas encore clairement démontrée jusqu'à présent (voir la revue de MICHEL *et al.*, 1998). En général, les récepteurs au NPY démontrent un couplage préférentiel aux protéines G sensibles à la toxine de pertussis (PTX), i.e. G_i et G_o , qui est suivi par une réponse typique de l'activation de ces protéines G (LIMBIRD, 1988).

1.2.6.1. Le récepteur Y_1 .

Le premier clone des récepteurs NPY a été initialement considéré comme étant un récepteur orphelin (EVA *et al.*, 1990; pour revue DUMONT *et al.*, 2000b). La distribution de l'ARNm de ce récepteur orphelin correspondait à la distribution déjà rapportée dans la littérature pour les récepteurs Y_1 dans le

cerveau de rat (DUMONT *et al.*, 1990; 2000b). De plus, après transfection dans une lignée cellulaire, ce clone a démontré un profil pharmacologique identique avec celui d'un récepteur Y_1 typique i.e: $PYY \geq NPY \geq [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY > NPY_{2-36} \gg hPP > NPY_{13-36}$ (KRAUSE *et al.*, 1992). Par la suite, l'ADN complémentaire (ADNc) des récepteurs Y_1 des différentes espèces incluant l'homme, la souris, le porc et le chien (HERZOG *et al.*, 1992; LARHAMMAR *et al.*, 1992; EVA *et al.*, 1992; NAKAMURA *et al.*, 1995; MALMSTRÖM *et al.*, 1998) ont été isolés et lorsque transfectés dans des lignées cellulaires, ont confirmé par la suite que ces récepteurs clonés sont du type Y_1 . D'autres études ont démontré que ce récepteur est aussi exprimé chez des espèces autres que les mammifères (BLOMQUIST *et al.*, 1995). De plus, il a été démontré que le récepteur Y_1 est hautement conservé au cours de l'évolution (LARHAMMAR *et al.*, 1996). Chez l'homme, le gène du récepteur Y_1 est localisé sur le chromosome 4q(31.3-32) (EVA *et al.*, 1992; HERZOG *et al.*, 1993; pour revue DUMONT *et al.*, 2000b).

L'ARNm du récepteur Y_1 a été détecté dans une grande variété de tissus humains, de rat et de souris, incluant le cerveau, le cœur, les vaisseaux sanguins, le rein et l'appareil gastrointestinal (LARSEN *et al.*, 1993; WHARTON *et al.*, 1993; NAKAMURA *et al.*, 1995). Suite à l'activation des récepteurs Y_1 , la réponse typique est une vasoconstriction dans la majorité des lits vasculaires (MALMSTRÖM, 1997). La présence d'une population homogène de récepteurs Y_1 a aussi été démontrée dans des lignées cellulaires humaines comme la lignée

SK-N-MC et la lignée HEL (FUHLENDORFF *et al.*, 1990; MICHEL *et al.*, 1990; FETH *et al.*, 1992; WIELAND *et al.*, 1995). Pour plus de détails voir la revue de MICHEL *et al.* (1998).

1.2.6.2. Le récepteur Y₂.

L'ADNc du récepteur Y₂ a été isolé en premier à partir de la lignée cellulaire humaine SMS-KAN (ROSE *et al.*, 1995) et par la suite à partir de l'hippocampe humain (GERALD *et al.*, 1995) et du cerveau humain (GEHLERT *et al.*, 1996), ainsi qu'à partir de la lignée cellulaire KAN-TX (RIMLAND *et al.*, 1996; MICHEL *et al.*, 2000). Il est intéressant de noter que l'homologie entre le récepteur Y₁ et Y₂ est de 31% (DUMONT *et al.*, 2000b). De plus, il a été rapporté par plusieurs groupes que les récepteurs Y₂ de différentes espèces montrent une grande homologie (AMMAR *et al.*, 1996; NAKAMURA *et al.*, 1996; St-PIERRE *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 1998; MALMSTRÖM *et al.*, 1998). L'ARNm du récepteur Y₂ a été détecté dans plusieurs parties du système nerveux central, tandis qu'un bas niveau d'expression a été détecté au niveau de tissus humains périphériques (ROSE *et al.*, 1995; GEHLERT *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1997). Suite leur stimulation, les récepteurs Y₂ inhibent le relâchement des neurotransmetteurs, comme par exemple, la NA au niveau de la membrane pré-synaptique (WAHLESTEDT *et al.*, 1986). Les récepteurs Y₂ sont aussi présents au niveau de la membrane post-synaptique de plusieurs tissus (MICHEL *et al.*,

1998). La lignée cellulaire humaine SMS-KAN ainsi que le rein de lapin contiennent apparemment une population homogène de récepteurs Y_2 (WIELAND *et al.*, 1995; MICHEL *et al.*, 1998).

1.2.6.3. Le récepteur Y_3 .

Plusieurs groupes ont proposé l'existence d'un récepteur qui possède une haute affinité pour le NPY mais pas pour le PYY dans plusieurs systèmes incluant le système nerveux central (GRUNDEMAR *et al.*, 1991), le colon (McCULLOUGH et WESTFALL, 1995), le cœur (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 1990; GRUNDEMAR *et al.*, 1991; DUMONT *et al.*, 1994), les poumons (HIRABAYASHI *et al.*, 1996) et la glande surrénale de rat (BERNET *et al.*, 1994) et de bovin (NÖRENBERG *et al.*, 1995). Ce site d'action préférentiel pour le NPY a été nommé le récepteur Y_3 . En 1991, RIMLAND et ses collaborateurs ont rapporté le clonage d'un récepteur chez le rat, qui était plus sensible au NPY qu'au PYY. Deux années plus tard, d'autres études ont démontré que ce clone était un artéfact (HERZOG *et al.*, 1993a; JAZIN *et al.*, 1993). Il est à noter que les évidences actuelles ne sont pas encore suffisantes pour confirmer l'existence de ce récepteur et des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer sa présence. Pour plus de détails, voir la revue publiée par MICHEL *et al.* en 1998.

1.2.6.4. Le récepteur Y₄.

Le gène du récepteur Y₄ a été initialement cloné d'une librairie génomique humaine et le récepteur dérivé de ce clone a été désigné comme "PP1" (LUNDELL *et al.*, 1995). Des homologues du récepteur Y₄ ont aussi été clonés chez le rat et la souris (GREGOR *et al.*, 1996a; GERALD *et al.*, 1996; LUNDELL *et al.*, 1996; YAN *et al.*, 1996). La principale caractéristique du récepteur Y₄ est sa haute affinité pour le PP de la même espèce. Par exemple, le PP d'autres espèces semble avoir une affinité de 50 à 100 fois plus faible par rapport au PP de la même espèce (GEHLERT *et al.*, 1996b). Cependant, ceci n'est pas observé dans tous les cas (GERALD *et al.*, 1996; GREGOR *et al.*, 1996a). Le PP humain possède une haute affinité (<100 pM) pour les récepteurs Y₄ humains, de rat et de souris (BARD *et al.*, 1995; LUNDELL *et al.*, 1995 ; GEHLERT *et al.*, 1996b). L'ARNm du récepteur Y₄ humain est présent dans le colon, l'intestin grêle et la prostate (LUNDELL *et al.*, 1995), tandis qu'il est absent dans les autres tissus périphériques. Une faible expression de l'ARNm de ce récepteur a été démontrée dans certaines régions du système nerveux central (LUNDELL *et al.*, 1995). L'ARNm du récepteur Y₄ de rat est présent dans les testicules et les poumons avec un niveau d'expression beaucoup plus faible au niveau du colon (LUNDELL *et al.*, 1996). Pour plus de détails voir MICHEL *et al.* (1998).

1.2.6.5. Le récepteur Y₅.

Il a été proposé que l'effet du NPY sur la prise de nourriture soit médié via un récepteur Y₁ atypique (QUIRION *et al.*, 1990; STANLEY *et al.*, 1992; DUMONT *et al.*, 2000b). De façon intéressante, le profil d'un autre récepteur au NPY cloné chez l'humain et le rat, le type Y₅, est très similaire au récepteur Y₁ atypique (GERALD *et al.*, 1996; HU *et al.*, 1996; DUMONT *et al.*, 2000b). Ce récepteur a été également cloné chez la souris (NAKAMURA *et al.*, 1997) et chez le chien (BOROWSKI *et al.*, 1998). Une des principales caractéristiques du récepteur Y₅ est sa haute affinité pour le hPP mais pas pour le rPP (GERALD *et al.*, 1996; HU *et al.*, 1996; MICHEL *et al.*, 1998; DUMONT *et al.*, 2000b). De plus le NPY, le PYY, le [Leu³¹, Pro³⁴]NPY ou PYY, les fragments longs comme le NPY₂₋₃₆ et le PYY₃₋₃₆ ont une affinité dans l'ordre du nM (3 à 20 nM) tandis que les fragments courts C-terminaux sont beaucoup moins puissants (affinités > 400 nM; GERALD *et al.*, 1996a; HU *et al.*, 1996; pour plus de détails voir DUMONT *et al.*, 2000b). Le gène du récepteur Y₅ humain réside sur le chromosome 4q31.3-32 i.e. la même localisation que le récepteur Y₁ humain mais disposé dans une direction opposée (GERALD *et al.*, 1996; HU *et al.*, 1996). Par immunobuvardage Northern et hybridation *in situ*, l'ARNm de ce récepteur a été détecté dans les testicules ainsi que dans plusieurs régions du cerveau, incluant celles qui sont connues pour jouer un rôle très important dans la prise de la

nourriture (par exemple l'hypothalamus) (GERALD *et al.*, 1996; HU *et al.*, 1996). L'expression du récepteur Y₅ dans la lignée cellulaire HEK 293 montre que suite à son activation, il y a une inhibition de l'accumulation de l'AMPc (GERALD *et al.*, 1996; HU *et al.*, 1996).

1.2.6.6. Le récepteur y₆.

Trois groupes ont rapporté le clonage d'un autre type de récepteur au NPY chez la souris, le lapin, le singe et l'humain et ont été désignés selon les auteurs comme le récepteur Y₅ (WEINBERG *et al.*, 1996), PP₂ (GREGOR *et al.*, 1996) ou Y_{2b} (MATSUMOTO *et al.*, 1996). Afin de standardiser sa nomenclature, il a été entendu que la désignation récepteur y₆ soit utilisée (MICHEL *et al.*, 1998). Cependant, le profil pharmacologique de ce récepteur n'est pas encore très clair. Contrairement aux autres types de récepteurs qui sont exprimés chez plusieurs espèces, incluant l'homme (LARHAMMAR, 1996), le récepteur y₆ n'est pas exprimé chez le rat (BURKHOFF *et al.*, 1998). De plus, chez l'homme et les primates, l'ADNc de ce récepteur contient une mutation localisée dans le troisième domaine transmembranaire du récepteur résultant en une protéine tronquée de 290 acides aminés (GREGOR *et al.*, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 1996; WEINBERG *et al.*, 1996). Malgré la forte expression de l'ARNm du récepteur y₆ dans une variété de tissus humains et de primates, la protéine de ce

récepteur est non-fonctionnelle (GREGOR *et al.*, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 1996; MICHEL *et al.*, 1998). Il semble donc que le gène du récepteur y_6 est devenu non-fonctionnel au cours de l'évolution (MICHEL *et al.*, 1998). La fonction physiologique possible du récepteur y_6 reste obscure. Pour plus de détails, voir MICHEL *et al.*, 1998 et DUMONT *et al.*, 2000b.

1.2.7. Agonistes et antagonistes de la famille des récepteurs au NPY.

Il y a quelques années, le $[\text{Pro}^{34}]\text{NPY}$, le $[\text{Leu}^{31},\text{Pro}^{34}]\text{NPY}$, le $[\text{Leu}^{31},\text{Pro}^{34}]\text{PYY}$ et le PYY_{3-36} étaient considérés comme étant des agonistes sélectifs pour les récepteurs Y_1 ou Y_2 (FUHLENDORFF *et al.*, 1990; SCHWARTZ *et al.*, 1990; DUMONT *et al.*, 1994; 2000b). Maintenant, il est bien connu que ces composés peuvent reconnaître plus qu'un seul type de récepteur au NPY. En effet, le $[\text{Leu}^{31},\text{Pro}^{34}]\text{NPY}$ et le $[\text{Leu}^{31},\text{Pro}^{34}]\text{PYY}$ possèdent une haute affinité pour les récepteurs Y_4 (BARD *et al.*, 1995; GEHLERT *et al.*, 1996b; GERALD *et al.*, 1996; BLOMQVIST et HERZOG, 1997; MICHEL *et al.*, 1998; DUMONT *et al.*, 2000b), Y_5 (GERALD *et al.*, 1996; HU *et al.*, 1996; BLOMQVIST et HERZOG, 1997; MICHEL *et al.*, 1998; DUMONT *et al.*, 2000b), et possiblement y_6 (WEINBERG *et al.*, 1996; GREGOR *et al.*, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 1996; DUMONT *et al.*, 2000b). En plus de sa haute affinité pour le récepteur Y_2 (DUMONT *et al.*, 1994, 1995; GEHLERT *et al.*, 1996; GERALD *et al.*, 1996), le PYY_{3-36} semble être un agoniste potentiel pour

les récepteurs Y_5 (GERALD *et al.*, 1996; HU *et al.*, 1996; BLOMQUIST et HERZOG, 1997; MICHEL *et al.*, 1998) et possiblement y_6 (WEINBERG *et al.*, 1996; GREGOR *et al.*, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 1996), tandis que, le hPP, le bPP et le rPP sont considérés comme étant des agonistes pour le récepteur Y_4 (BARD *et al.*, 1995; LUNDELL *et al.*, 1995, 1996; YAN *et al.*, 1996; GEHLERT *et al.*, 1996, 1996a, 1996b; GERALD *et al.*, 1996; BLOMQUIST et HERZOG, 1997; MICHEL *et al.*, 1998). Cependant, les évidences actuelles montrent que ces composés peuvent agir sur d'autres types de récepteurs au NPY (DUMONT *et al.*, 2000b). Par exemple, le hPP semble être un agoniste pour le récepteur Y_5 (GERALD *et al.*, 1996; HU *et al.*, 1996; DUMONT *et al.*, 1998) et possède de hautes affinités pour le récepteur y_6 (GREGOR *et al.*, 1996). Par contre, le [Cys²,8-amino-octanoic acid⁵⁻²⁴, D-Cys²⁷]NPY, aussi connu sous le nom de C2-NPY, est un agoniste sélectif du récepteur Y_2 (McLEAN *et al.*, 1990) qui n'a pas d'affinité pour les récepteurs Y_1 , Y_4 et Y_5 (GERALD *et al.*, 1996; BECK-SICKINGER, 1997). Plus récemment, BECK-SICKINGER (1999) a rapporté le développement d'un agoniste sélectif du récepteur Y_5 , le hPP1-17[A³¹,Aib³²]NPY. Ce peptide a une affinité de 0.2 nM dans les cellules HEK 293 transfectées avec l'ADNc du récepteur Y_5 humain, cependant, son affinité pour les récepteurs Y_1 , Y_4 et Y_5 est seulement de 200 à 400 nM. Donc, les agonistes disponibles jusqu'à présent ne sont pas sélectifs pour un type de récepteur en particulier. Afin de définir précisément la nature d'un récepteur, il faut utiliser une

série d'agonistes (MICHEL *et al.*, 1998) en plus d'antagonistes sélectifs qui deviennent de plus en plus disponibles (DUMONT *et al.*, 2000b).

Depuis les années 90, plusieurs antagonistes ont été développés, cependant, ceux-ci ne répondent pas aux critères de haute affinité, spécificité et compétitivité requise pour être de bons antagonistes (pour détails voir DUMONT *et al.*, 2000b). Un des premiers antagonistes non-peptidiques rapportés fut le R-N²-(diphenylacetyl)-N-(4-hydroxyphenyl)-methylargininamide, connu sous le nom de BIBP3226 (RUDOLF *et al.*, 1994). Cet antagoniste a bien été étudié et la majorité des données obtenues montre que cette molécule possède une haute sélectivité pour le récepteur Y₁ sans aucune activité significative sur les types Y₂, Y₄ et Y₅ et ce aussi bien en utilisant la technique de radioliasion sur membrane que des essais biologiques *in vivo* et *in vitro* (RUDOLF *et al.*, 1994; ABOUNADER *et al.*, 1995; DOODS *et al.*, 1995; JACQUES *et al.*, 1995; WIELAND *et al.*, 1995; LUNDBERG *et al.*, 1996; GEHLERT *et al.*, 1996, 1996b; GERALD *et al.*, 1996). Cependant, des études *in vivo*, et plus spécifiquement des études impliquant des injections ICV doivent être interprétées avec prudence car le BIBP3226 peut être toxique (RUDOLF *et al.*, 1997). Un autre antagoniste Y₁ non-peptidique qui peut être pris oralement a été rapporté par le groupe de SERRADEIL-LE (1995) i.e. le (R,R)-1-[2-[2-(2-naphthylsulphamoyl)-3-phenylpropionamido]-3-[4-[N-[4-(dimethylaminomethyl)-cis-cyclohexylmethyl] amidino] phenyl] propionyl]-pyrrolidine), nommé SR120819A (SERRADEIL-LE *et al.*, 1995). Dû au fait que l'accès à cette

molécule a été limitée à un certain nombre de chercheurs, il y a q'un seul groupe jusqu'à maintenant qui a pu confirmer son activité d'antagoniste pour le récepteur Y_1 (MALMSTRÖM *et al.*, 1996), tandis que son affinité vis-à-vis les récepteurs Y_4 , Y_5 et y_6 n'est pas encore déterminée (DUMONT *et al.*, 2000b). Très récemment, d'autres antagonistes des récepteurs Y_1 ont été caractérisés (DUMONT *et al.*, 2000b). Parmi ces antagonistes, le ((R)-N[[4-(aminocarbonylamino)methyl]-phenyl]methyl]-N²(diphenylacetyl)-argininamide trifluoroacetate) ou BIBO3304 a démontré une affinité de l'ordre du nanomolaire, pour les récepteurs Y_1 d'origine humaine et de rat. De plus, il est inactif sur les récepteurs Y_2 , Y_4 et Y_5 (WIELAND *et al.*, 1998). Il a été également démontré par DUMONT *et al.* (2000) que le BIBO3304 est au moins 10 fois plus puissant que le BIBP3226 pour déplacer les sites de liaison du [¹²⁵I] [Leu³¹,Pro³⁴]PYY dans le cerveau de rat. Plusieurs autres antagonistes non-peptidiques pour le récepteur Y_1 ont été rapportés (HIPSKIND *et al.*, 1997 ; ZARRINMAYEH *et al.*, 1998 ; 1999 ; ZIMMERMAN *et al.*, 1998 ; DANIELS *et al.*, 1997). Cependant, leur sélectivité n'a pas encore été démontrée (DUMONT *et al.*, 2000b). Finalement, un antagoniste peptidique, le Ile-Glu-Pro-Dpr-Tyr-Arg-Leu-Arg-Tyr-CONH₂, désigné au départ comme le 1229U91 (DANIELS *et al.*, 1995a), ou le GW1229 (BITRAN *et al.*, 1997) et maintenant le GR231118 (MICHEL *et al.*, 1998; PARKER *et al.*, 1998), a été étudié par plusieurs groupes. Au départ, le GR231118 a été caractérisé comme étant un antagoniste sélectif du récepteur Y_1 sur la base de son blocage sélectif des effets des récepteurs Y_1 par rapport à Y_2

(LEBAN *et al.*, 1995; DANIELS *et al.*, 1995a,b; KIM *et al.*, 1997; BITRAN *et al.*, 1997). Cependant, des études récentes ont démontré que le GR231118 est un agoniste des récepteurs Y_4 et y_6 (KANATANI *et al.*, 1998; PARKER *et al.*, 1998; SCHOBER *et al.*, 1998) et possède une très faible activité agoniste pour les récepteurs Y_5 (KARATINI *et al.*, 1998 ; PARKER *et al.*, 1998). L'utilisation du [125 I]GR231118 a confirmé ces données et a démontré clairement que le GR231118 a une faible sélectivité pour le récepteur Y_1 (SCHOBER *et al.*, 1999; DUMONT et QUIRION, 2000; DUMONT *et al.*, 2000b).

En 1997, GROUZMANN et ses collaborateurs ont proposé le T_4 -[NPY(33-36)] $_4$ comme étant un antagoniste du récepteur Y_2 . Cependant, une année plus tard, le même groupe a démontré une faible affinité de cette molécule pour le récepteur Y_2 (GROUZMANN *et al.*, 1998). Ces résultats ont aussi été confirmés par PHENG *et al.*, (1999). De plus, des études de radioliation sur membrane n'ont pas pu démontrer une vraie sélectivité de cette molécule pour le récepteur Y_2 versus les récepteurs Y_1 , Y_4 et Y_5 (DUMONT *et al.*, 2000). Très récemment, DOODS et ses collaborateurs (1999) ont rapporté que le BIIE0246 est un antagoniste puissant pour le récepteur Y_2 avec un pA_2 de l'ordre de 7.8 dans le canal déférent de rat (un tissu qui exprime exclusivement le récepteur Y_2). Par contre, celui-ci ne bloque pas l'effet du NPY au niveau de la veine saphène de lapin (un tissu qui exprime exclusivement le récepteur Y_1) (DUMONT *et al.*, 2000a). De plus, des études de radioliation ont démontré que le BIIE0246 possède une haute affinité pour le récepteur Y_2 , alors qu'il reste inactif vis-à-vis les autres

types de récepteurs (Y_1 , Y_4 et Y_5) (DUMONT *et al.*, 2000a). Des études d'autoradiographie quantitative ont démontré que le BIIE0246 inhibe la liaison du [125 I]PYY₃₋₃₆ mais pas celle du [125 I] [Leu³¹, Pro³⁴]PYY dans le cerveau de rat (DUMONT *et al.*, 2000a). Donc, le BIIE0246 représente le premier antagoniste sélectif qui peut être utilisé pour étudier les fonctions du récepteur Y_2 (voir DUMONT *et al.*, 2000b).

Plusieurs molécules ont été proposées comme étant des antagonistes pour le récepteur Y_5 (GERALD *et al.*, 1996a). Parmi ces molécules, le (2-(naphthalene-1-yl)-3-phenylpropane-1,2-diamine), connu sous le nom de JCF104 a démontré une faible activité antagonistique pour le récepteur Y_5 (ordre de pM) (PHENG *et al.*, 1997; FELETOU *et al.*, 1998 ; DUMONT *et al.*, 2000b). Récemment, deux autres antagonistes pour le récepteur Y_5 , le CGP71683A (CRISCIONE *et al.*, 1998) et le L-152804 (KANATANI *et al.*, 1997) ont été rapportés. Ces antagonistes ont des affinités dans l'ordre du nM. Par des études de radioliasion, DUMONT et ses collaborateurs (2000) ont démontré que le CGP71683A possède une haute affinité pour le récepteur Y_5 mais pas pour les récepteurs Y_1 , Y_2 , et Y_4 . Pour plus de détails voir la revue de DUMONT *et al.*, 2000b.

1.2.8. Effets biologiques du NPY et de ses récepteurs.

Le neuropeptide Y et ses peptides apparentés sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques importants comme par exemple la prise de nourriture, le métabolisme énergétique, la thermorégulation, la sécrétion neuroendocrinienne, la locomotion, les comportements liés à l'anxiété, et la fonction cardio-respiratoire. Pour plus de détails, voir les revues de DUMONT *et al.*, 1992; 2000b. Toutes ces effets ont été rapportées chez le rat. Cependant, plusieurs études suggèrent que le NPY possède des rôles similaires chez l'humain (DUMONT *et al.*, 2000b).

Dans cette section, je vais traiter plus spécifiquement du rôle du NPY et de ses récepteurs dans le système cardiovasculaire.

1.2.8.1. Effets sur le cœur.

Plusieurs groupes ont étudié l'effet du NPY sur la contraction cardiaque. Ces effets varient selon les espèces et les préparations utilisées (MILLAR *et al.*, 1991). Par exemple, ALLEN *et al.* (1983a) et FRANCO-CERECEDA *et al.* (1985) ont rapporté que le NPY exerce un effet inotrope négatif sur la performance ventriculaire du cœur isolé de lapin et de cochon d'Inde, tandis qu'un effet inotrope positif a été observé sur les oreillettes isolées de cochon d'Inde (LUNDBURG *et al.*, 1984a; FRANCO-CERECEDA *et al.*, 1985).

D'autres études ont rapporté également que le NPY n'exerce aucun effet inotrope sur le cœur (ALLEN *et al.*, 1983a; FRANCO-CERECEDA *et al.*, 1987; MICHEL *et al.*, 1988; MALMSTRÖM et LUNDBERG, 1997).

Les études électrophysiologiques ont démontré que le NPY active un courant K^+ sortant (I_{to}) (WEIS *et al.*, 1990; MILLAR *et al.*, 1991). Le I_{to} est présent dans les myocytes ventriculaires de plusieurs espèces incluant le rat, le lapin, le chien et l'humain mais pas chez le cochon d'Inde (CORABOEUF et VASSORT, 1968; JOSEPHSON *et al.*, 1984; GILES et GINNEKEN, 1985; HUME et UEHARA, 1985; LITOVSKY et ANTZELEVITCH, 1988; SHIBATA *et al.*, 1989). MILLAR et ses collaborateurs ont suggéré que l'activation de ce courant par le NPY, raccourci la durée du potentiel d'action et diminue ainsi le temps disponible pour l'entrée de calcium dans la cellule, ce qui diminue par conséquent la réponse contractile (MILLAR *et al.*, 1991). D'autre part, ce même groupe a aussi démontré que le NPY active un courant calcique entrant (I_{si}) et donc peut augmenter la réponse contractile, mais seulement en présence de 4-aminopyridine (bloqueur de I_{to}) (MILLAR *et al.*, 1991). Les auteurs proposent donc l'existence de deux mécanismes couplés aux récepteurs NPY qui influencent la réponse contractile au niveau des cardiomyocytes ventriculaires de rat : 1) activation de I_{to} par une protéine G sensible au PTX et 2) activation de I_{si} par un mécanisme insensible au PTX (MILLAR *et al.*, 1991).

Très récemment, nous avons démontré dans notre laboratoire que le NPY active les canaux calciques de type L et R dans les cellules cardiaques

d'embryons de poulets âgés de 10 jours (JACQUES *et al.*, 2000a). Nos résultats montrent que le NPY (10^{-10} M) induit une augmentation de la fréquence du calcium cytosolique et nucléaire transitoire durant la contraction spontanée des cellules cardiaques d'embryons de poulet de 10 jours. L'addition subséquente de nifédipine (10^{-5} M; un bloqueur des canaux calciques de type L) a bloqué complètement l'augmentation du calcium cytosolique et nucléaire et révèle une augmentation significative des niveaux de base du calcium nucléaire. En présence de NPY (10^{-10} M) et de nifédipine (10^{-5} M), l'addition du PN-200-110 (10^{-7} M ; un bloqueur des canaux calciques de type R) diminue les niveaux de base du calcium cytosolique et nucléaire au niveau contrôle (JACQUES *et al.*, 2000a). De plus, nos résultats démontrent aussi que l'effet chronotrope du NPY est inhibé par le BIBP3226, un antagoniste sélectif des récepteurs Y_1 , suggérant ainsi l'implication de ce récepteur dans cette fonction (JACQUES *et al.*, 2000a) (figure 10). Nos résultats suggèrent que le NPY stimule un influx calcique à travers la membrane plasmique (via un canal calcique de type L et R), induit une augmentation soutenue du calcium cytosolique et nucléaire et augmente la fréquence de cette augmentation via l'activation, en bonne partie, du récepteur Y_1 (JACQUES *et al.*, 2000a).

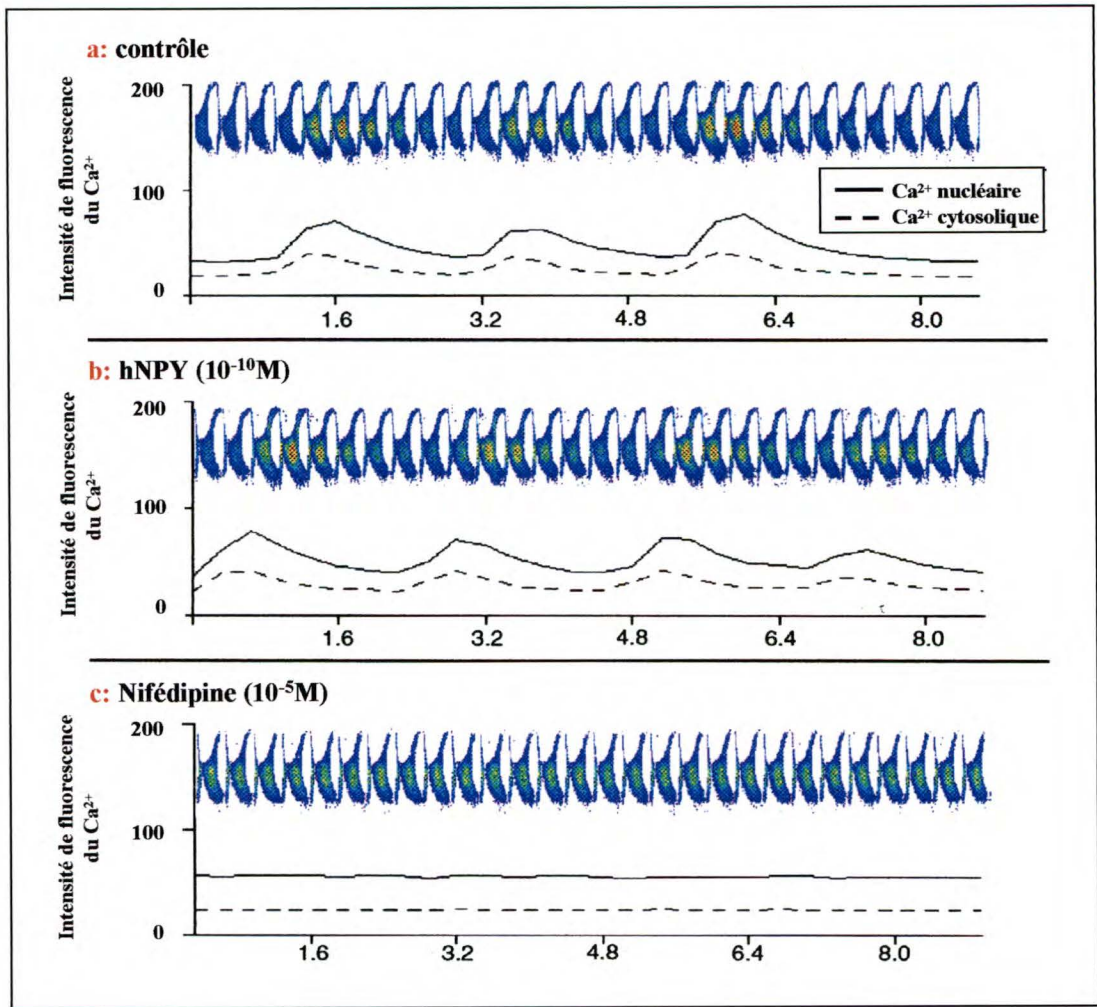
Dans les cardiomyocytes, le NPY exerce des effets sur l'adenylyl cyclase, les canaux ioniques et la performance contractile (MILLAR *et al.*, 1994; JACQUES *et al.*, 2000a). A long terme, le NPY cause une réduction de la

Figure 10 Blocage de l'effet chronotrope positif du hNPY sur les cellules cardiaques d'embryon de poulet de 10 jours par la nifedipine et le BIBP3226.

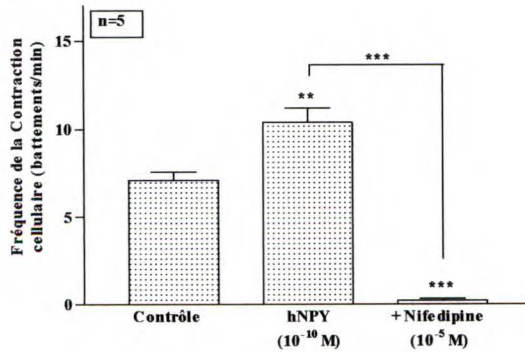
(A) Balayage rapide en continu d'un myocyte ventriculaire d'embryon de poulet âgé de 10 jours lors d'une contraction spontanée, visualisée par microscopie confocale. (a) Cellule montrant une contraction rythmique en condition contrôle. (b) Effet chronotrope positif du hNPY 10^{-10} M sur la contraction spontanée. (c) Blocage de l'effet chronotrope positif du hNPY par la nifedipine 2×10^{-5} M. (B) L'addition du hNPY (10^{-10} M) augmente de façon significative la fréquence de l'augmentation transitoire calcique durant la contraction spontanée des cellules cardiaques isolées d'embryon de poulet de 10 jours. L'ajout de la nifedipine (10^{-5} M) bloque complètement la fréquence de l'augmentation transitoire du calcium. (C) Le BIBP3226 (10^{-6} M), un antagoniste sélectif des récepteurs Y_1 et renverse l'effet du hNPY (10^{-10} M) sur l'augmentation de la fréquence transitoire du calcium durant la contraction spontanée des cardiomyocytes.

Modifié de JACQUES et al., 2000a.

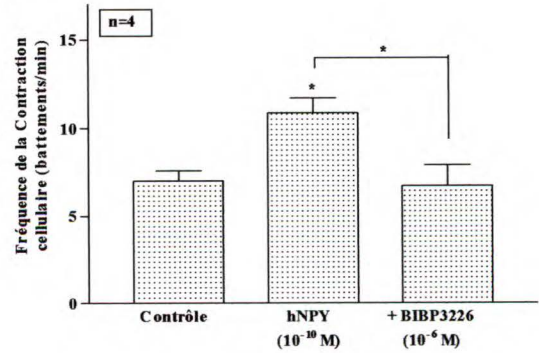
A)



B)



C)



dégradation protéique, une augmentation de la synthèse protéique et de la masse d'ARN et l'activation d'enzymes comme la créatine kinase au niveau cardiaque (MILLAR *et al.*, 1994). Tous ces effets portent donc l'empreinte d'une hypertrophie du myocarde. L'identification de cet effet du NPY semble être particulièrement intéressante, vu que la concentration du NPY augmente chez les patients souffrant d'une hypertrophie du myocarde ou d'une insuffisance cardiaque (HULTING *et al.*, 1990; WESTFALL *et al.*, 1990). En 1998, GOLDBERG et ses collaborateurs ont démontré que les mécanismes qui sont à la base de cet effet impliquent, d'une part, l'activation d'une protéine G sensible à la toxine de pertussis (PTX), et d'autre part, l'activation de la voie de la protéine kinase C (PKC) et subséquemment, la voie des MAP kinases (GOLDBERG *et al.*, 1998). Leurs résultats ont démontré que le NPY, à une concentration de 100 nM, induit une augmentation de 34% de la synthèse protéique et de 18% de la masse d'ARN et que cet effet est inhibé en présence de 1 µg/ml de PTX. De plus, les auteurs ont étudié la voie de signalisation intracellulaire menant à l'hypertrophie des cardiomyocytes suite à l'activation d'une protéine G sensible au PTX par le NPY. Leurs résultats ont démontré que le NPY active la voie de la PI3-kinase; l'inhibition de cette voie par la wortmannin bloque l'effet du NPY sur la synthèse protéique et suggère donc que la PI3-kinase est une étape intermédiaire dans cette voie de signalisation. Par la suite, les auteurs ont étudié l'effet du NPY sur la p70^{s6k}, une protéine en amont de la PI3-kinase. L'ajout de la rapamycine, un bloqueur spécifique de la p70^{s6k}, réduit l'effet stimulateur du NPY

sur la synthèse protéique. L'augmentation de la masse d'ARN suite à la stimulation avec le NPY ne semble pas être strictement dépendante de la voie PI3-kinase/ p70^{s6k}. Cependant, l'inhibition de cette voie diminue l'effet du NPY sur la synthèse protéique. D'autres part, les auteurs ont rapporté que le NPY peut activer certaines isoformes de la PKC qui vont induire la formation d'une forme fœtale de créatinine kinase (CK-BB) par une voie MAP kinase dépendante. Il est à noter que l'induction de la CK-BB est caractéristique d'une hypertrophie du myocarde (SMITH *et al.*, 1990)

1.2.8.2. Effets sur le muscle lisse vasculaire.

Le NPY est reconnu comme étant un agent vasoconstricteur puissant dans la majorité des lits vasculaires (ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998). Il a été rapporté qu'une administration intraveineuse de NPY induit une vasoconstriction soutenue suivie d'une augmentation de la pression sanguine (ZUKOWSKA-GROJEC et WAHLESTEDT, 1993; MACLEAN et HILEY, 1990). Il a également été démontré que le NPY possède deux actions principales sur le muscle lisse vasculaire. Dans certains tissus vasculaires, il induit une vasoconstriction (e.g., dans le rein de rat) (ENTZEROTH *et al.*, 1994; DOODS *et al.*, 1995), tandis que dans d'autres, il est seulement capable de potentialiser l'effet d'autres agents vasoactifs (e.g., au niveau de l'artère mésentérique de rat) (EDVINSSON *et al.*, 1984; GRUNDEMAR *et al.*, 1992; McAULEY et WESTFALL, 1992). Dans ces

préparations, il a été démontré que l'ajout de BIBP3226 (antagoniste sélectif des récepteurs Y_1) inhibe d'une façon dose-dépendante l'effet du NPY sur le muscle lisse vasculaire (DOODS *et al.*, 1995; ABOUNADER *et al.*, 1995), suggérant l'implication des récepteurs Y_1 dans cet effet. D'autres études ont démontré la présence des récepteurs Y_2 dans certains lits vasculaires (ZUKOWSKA-GROJEC et WAHLESTEDT, 1993; DUMONT *et al.*, 1991; ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998). Cependant, la présence des récepteurs Y_4 et Y_5 au niveau des vaisseaux sanguins reste à être démontré (ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998).

Plusieurs études ont démontré que l'effet vasoconstricteur du NPY est atténué par les bloqueurs des canaux calciques ou la diminution de la concentration du calcium extracellulaire par l'EGTA (chélateur du calcium), ce qui indique que l'augmentation du Ca^{2+} dans les cellules du muscle lisse vasculaire est due à l'influx calcique à travers la membrane de surface (EDVINSSON *et al.*, 1983; AIZAWA *et al.*, 1989; MIHARA *et al.*, 1990).

Récemment, nous avons démontré que le NPY induit une augmentation de $[Ca^{2+}]_c$ et $[Ca^{2+}]_n$ dans les cellules isolées du muscle lisse aortique humain, avec un EC_{50} de l'ordre de 10^{-9} M, aussi bien dans le cytosol que dans le noyau (JACQUES *et al.*, 2000a). Nous avons suggéré que cette augmentation est due à l'influx calcique à travers la membrane de surface, via l'activation des canaux calciques de type R. Nos résultats montrent aussi que le NPY induit une augmentation soutenue de $[Ca^{2+}]_c$ et $[Ca^{2+}]_n$, et que cet effet est partiellement bloqué par le BIBP3226, montrant que les récepteurs Y_1 sont impliqués en partie

dans l'augmentation de $[Ca^{2+}]_c$ et $[Ca^{2+}]_n$. Ces résultats suggèrent que d'autres types de récepteurs peuvent être impliqués dans cet effet, tels les récepteurs Y_2 et Y_5 (JACQUES *et al.*, 2000a) (figure 11).

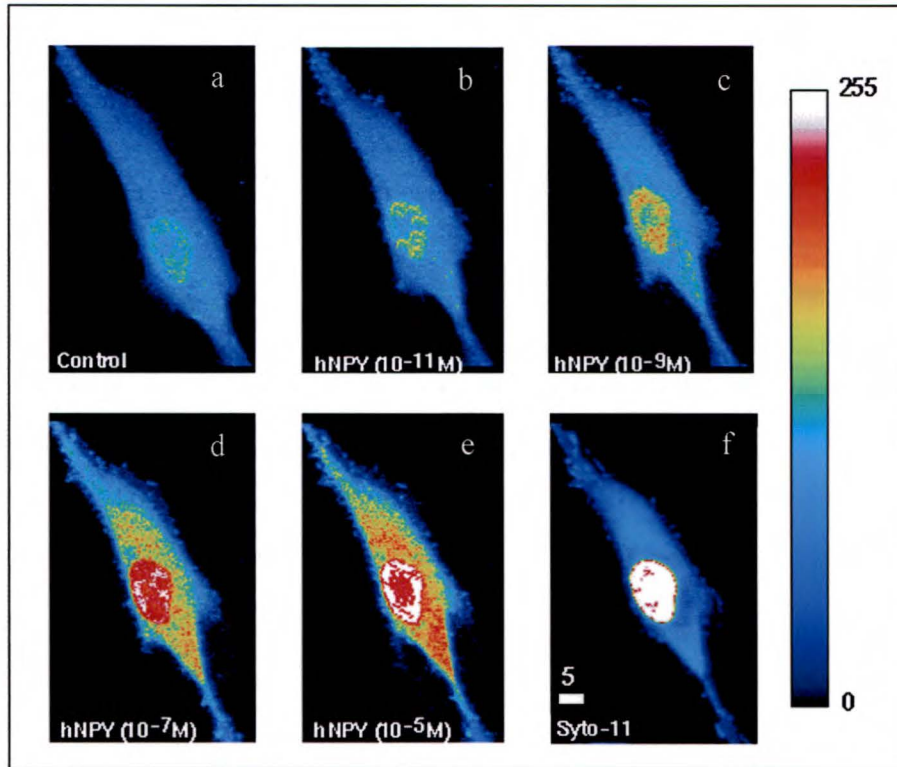
Des études récentes ont démontré que le NPY exerce d'autres effets importants sur les vaisseaux sanguins (SHIEGERI *et al.*, 1993; ZUKOWSKA-GROJEC et WAHLESTEDT, 1993; ERLINGE *et al.*, 1994; ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998). Chez le rat, l'homme et le porc, il a été rapporté que le NPY stimule la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire et ceci à des concentrations plus faibles que celles nécessaires pour induire une vasoconstriction (SHIEGERI *et al.*, 1993; ZUKOWSKA-GROJEC et WAHLESTEDT, 1993; ERLINGE *et al.*, 1994; ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998). ZUKOWSKA-GROJEC et WAHLESTEDT (1993) ont suggéré que l'effet mitogène du NPY est médié via les récepteurs Y_1 . Cependant, des études plus récentes ont démontré que l'effet mitogène du NPY sur les cellules vasculaires aortiques isolées de rat est biphasique avec un premier pic à une concentration de NPY de 1 pM, et le second à une concentration de NPY entre 10 et 100 nM. Les auteurs ont démontré que le premier pic de l'effet mitogène du NPY est mimé par l'agoniste du récepteur Y_2 , le NPY_{3-36} , et est bloqué par l'antagoniste du récepteur Y_2 , le $T_4-[NPY_{3-36}]_4$, tandis que deuxième pic est mimé par l'agoniste du récepteur Y_1 , le $[Leu^{31}, Pro^{34}]NPY$ et est partiellement bloqué par le BIBP3226, un antagoniste sélectif du récepteur Y_1 (ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998). Cet

Figure 11 Effet du hNPY sur les cellules isolées du muscle lisse aortique humain.

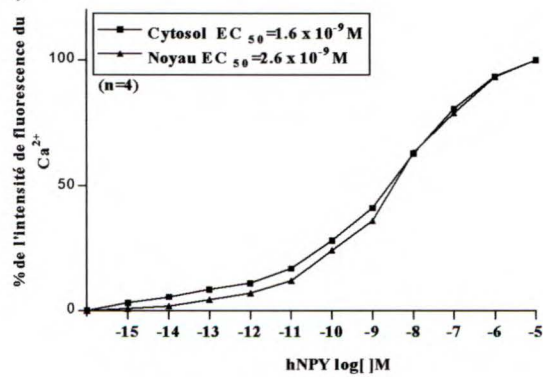
(A) Reconstruction en 3-D d'une cellule du muscle lisse aortique visualisée par microscopie confocale, avant (a) et après l'administration de différentes concentrations de hNPY (b à e) et marquage nucléaire avec le Syto 11 (f). Le hNPY induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ qui est plus élevée au niveau nucléaire qu'au niveau du cytosol. L'échelle de pseudo-couleur allant de 0 à 255 représente le niveau de l'intensité de fluorescence du complexe Ca^{2+} /Fluo-3. En f, les couleurs n'ont aucune signification et l'échelle de grandeur (blanche) équivaut à $5\mu m$. (B) Le hNPY induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ avec un EC_{50} de 1.6×10^{-9} M et 2.6×10^{-9} M, respectivement. (C) Le BIBP3226 (10^{-6} M), un antagoniste sélectif des récepteurs Y_1 , bloque partiellement l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY (10^{-7} M) au niveau des cellules isolées du muscle lisse aortique humain.

Modifié de JACQUES et al., 2000a.

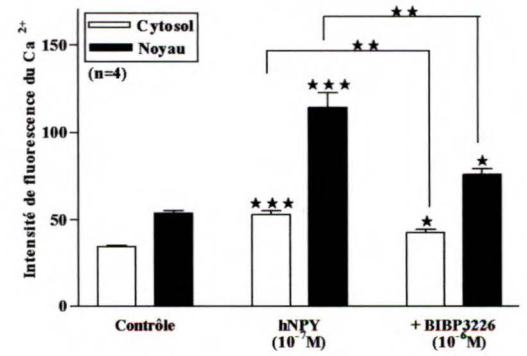
A)



B)



C)



effet mitogène du NPY est bloqué par le vérapamil et la nifédipine (deux bloqueurs des canaux calciques de type L) suggérant que cet effet nécessite un influx calcique à travers la membrane de surface via l'activation des canaux calcique de type L. De plus, les auteurs ont rapporté que l'effet mitogène du NPY est dû à l'activation de la voie p42/p44 MAPK (ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998).

1.2.8.3. Effet sur l'endothélium vasculaire.

Les effets du NPY sur le système cardiovasculaire ont surtout été étudiés au niveau du muscle cardiaque et du muscle lisse vasculaire. Cependant, son effet sur l'endothélium est relativement peu documenté. Récemment, ZUKOWSKA-GROJEC et ses collaborateurs (1998a) ont démontré que le NPY a un effet angiogène sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC). Leurs résultats ont démontré que de faibles concentrations de NPY induisent la formation de nouveaux vaisseaux, l'adhésion, la migration, la prolifération et la formation des tubes capillaires par les HUVECs. De plus, les auteurs ont remarqué que les récepteurs Y_1 et Y_2 sont exprimés d'une façon constitutive dans les HUVECs. Cependant, une fois que ces cellules sont mises en culture sur Matrigel, elles sur-expriment d'une façon similaire, les deux types de récepteurs et ce après 6 heures. Tandis que l'ARNm du récepteur Y_2 reste élevé

pendant plus de 20 heures après la culture sur matrigel, l'ARNm du récepteur Y_1 diminue pour atteindre un niveau basal après 20 heures. D'autre part, leurs résultats ont démontré que les cellules commencent à former des tubes capillaires 6 heures après l'incubation avec le NPY et que cet effet se maintient pendant 20 heures. En utilisant des agonistes et antagonistes des récepteurs Y_1 et Y_2 , ils ont observé que les effets du NPY sur la prolifération cellulaire et la formation des tubes capillaires sont complètement mimés par le NPY₃₋₃₆ (agoniste du récepteur Y_2) et partiellement par le [Leu³¹, Pro³⁴]NPY (agoniste du récepteur Y_1). D'autre part, les effets du NPY et du NPY₃₋₃₆ sont complètement bloqués par l'antagoniste sélectif du récepteur Y_2 , tandis que le BIBP3226 (antagoniste sélectif du récepteur Y_1) n'inhibe pas l'effet du NPY. En tenant compte de ces résultats, les auteurs ont suggéré qu'une activation séquentielle des récepteurs Y_1 et Y_2 est nécessaire pour stimuler l'effet angiogène du NPY. Ainsi, les événements précoces de la formation des vaisseaux (adhésion et migration) peuvent être dus à l'activation de ces deux types de récepteurs. Toutefois, l'effet angiogène dans les phases plus avancées de la formation des vaisseaux est dû à l'activation du récepteur Y_2 qui coïncide avec la prolifération et la formation des tubes capillaires. Cette hypothèse a été indirectement supportée par la présence du DPPIV dans les HUVECs. Cette enzyme est responsable du clivage du NPY en NPY₃₋₃₆ qui est reconnue comme un agoniste du récepteur Y_2 et Y_5 (ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998a).

1.3. Le calcium.

Le calcium est le second messenger le plus répandu dans les cellules eucaryotes (SCHWARTZ, 1989; SPEDDING et PAOLETTI, 1992) et joue un rôle critique dans la régulation des fonctions cellulaires (KATZ, 1969; CHO, 1992). Celui-ci est essentiel au couplage excitation-contraction des cellules musculaires comme les CMLVs et les cardiomyocytes (BOLTON, 1979 ; BKAILY, 1994c ; BKAILY *et al.*, 1996, 1997, 2000) ainsi qu'au couplage excitation-sécrétion des cellules sécrétrices comme les cellules endothéliales (voir la revue de NILIUS et DROOGMANS, 2001). Il est généralement accepté que la synthèse et/ou la relâche des pro- et anticoagulants, des facteurs de croissances, et des composés vasoactifs par les cellules endothéliales vasculaires, dépendent ou peuvent être modulés par le changement de $[Ca]_i$ (BUSSE *et al.*, 1991; CARTER et PEARSON, 1992; INAGAMI *et al.*, 1995; NILIUS et CATEELS, 1994; NILIUS *et al.*, 1997). Parmi les substances relâchées par les cellules endothéliales on peut distinguer celles qui sont produites "sur demande" comme le NO, la PGI_2 , le facteur activateur des plaquettes (PAF), et celles qui sont relâchées par exocytose à partir des granules de stockage comme le facteur de von Willebrand (vWF) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) (pour plus de détails voir la revue de NILIUS et DROOGMANS, 2001). Le relâchement de tous ces composés dépend de l'augmentation du $[Ca]_i$. Par exemple, le NO est produit par la eNOS via l'activation d'une voie Ca^{2+} /calmoduline (CaM) dépendante qui

nécessite un influx calcique à travers la membrane de surface (GRAIER *et al.*, 1992; IOUZALEN *et al.*, 1996; LANTOINE *et al.*, 1998). À l'état de repos, la eNOS est inactive, et ceci est dû à sa liaison à la caveoline-1 (CAV-1) (PARTON, 1996). L'augmentation du $[Ca]_i$ favorise la liaison de la eNOS à la CaM et sa dissociation de la CAV-1 et par conséquent, son activation et le relâchement du NO (pour revue, voir les articles de FERON *et al.*, 1997; MICHEL *et al.*, 1997; MICHEL et FERON, 1997; PRABHAKAR *et al.*, 1998). De plus, la synthèse de la PGI₂ nécessite une augmentation du $[Ca]_i$ et une phosphorylation de la phospholipase A₂ (PLA₂) (PATEL *et al.*, 1996). L'augmentation du $[Ca]_i$ favorise la translocation de la PLA₂ du cytosol aux phospholipides membranaires, surtout au niveau de la membrane de surface et de la membrane nucléaire. Cette translocation se produit grâce à un domaine de liaison au phospholipide présent à son extrémité NH₂-terminale qui est Ca²⁺-dépendante (CLARK *et al.*, 1995; FREARSON *et al.*, 1995). D'autre part, plusieurs composés stockés dans des vésicules de sécrétion sont relâchés après la stimulation des cellules endothéliales comme par exemple le vWF (NILIUS et DROOGMANS, 2001). Ce facteur est stocké dans des vésicules de sécrétion, les corps de Weibel-Palade, et est relâché par un phénomène d'exocytose CaM-dépendant qui est déclenché par une augmentation du $[Ca]_i$ (BIRCH *et al.*, 1992). En résumé, la production des composés vasoactifs "sur demande" et le relâchement des composés stockés dans des vésicules de sécrétion par exocytose, nécessitent une augmentation du $[Ca]_i$ soit par une relâche des réserves intracellulaires du calcium ou soit par un influx

calcique à travers la membrane de surface via l'activation des canaux calciques. Pour plus de détails concernant le rôle du calcium dans la synthèse et la relâche des composés vasoactifs, le lecteur est référé à la revue de NILIUS et DROOGMANS (2001).

1.3.1. Les canaux calciques dépendants du voltage.

La principale voie d'entrée du calcium dans la cellule se fait via les canaux calciques membranaires qui sont normalement à l'état fermé. Suite à une stimulation, les canaux s'ouvrent et le calcium entre dans la cellule. La littérature rapporte actuellement l'existence de six types de canaux calciques, soient les canaux calciques de type P/Q, N, R (résistant: aux bloqueurs des canaux calciques connus), L, T et R (repos) (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997; TRIGGLE, 1999; FISHER et BOURQUE, 2001).

Tous ces canaux se distinguent par leurs caractéristiques d'ouverture et de fermeture ainsi que par leurs seuils d'activation et leurs distributions dans les tissus (DAS, 1988; HOSEY et LAZDUNSKI 1988; SPEDDING et PAOLETTI 1992; BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997; TRIGGLE, 1999; FISHER et BOURQUE, 2001).

Les canaux de type P/Q s'activent à partir d'un seuil près de -40mV et possèdent une conductance de 10 à 12 pS (LLINAS *et al.*, 1989; REGAN *et al.*, 1991). Ces canaux semblent constituer la majorité des canaux calciques au niveau

du cerveau où ils sont responsables, dans certaines régions, de la libération de neurotransmetteurs (HILLMAN *et al.*, 1991). Les canaux calciques de type N s'activent à partir d'un voltage de -30 mV. Ces canaux ont une conductance de 12 à 20 pS et ils produisent un courant moyen intermittent (WILLIAMS *et al.*, 1992; FUJITA *et al.*, 1993). Ils sont principalement exprimés dans les neurones et jouent un rôle important dans la libération de neurotransmetteurs (CATTERALL et STRIESSNIG, 1992). Les canaux calciques de type R (résistants) s'activent à partir d'un voltage de -30 mV et possèdent une conductance de 15 pS (pour plus de détails voir la revue de TRIGGLE, 1999 et de FISHER et BOURQUE, 2001). Ces canaux sont aussi présents au niveau du cerveau (TAKAHASHI et MOMIYAMA, 1993; REGEHR et MINTZ, 1994; WHEELER *et al.*, 1994; WU et SAGGAU, 1994; MINTZ *et al.*, 1995) et jouent également un rôle dans la libération de neurotransmetteurs (QIAN *et al.*, 1997; JUN *et al.*, 1999).

Les canaux calciques de type L et T sont présents dans les cellules cardiaques (FOX *et al.*, 1987). Les canaux calciques de type L possèdent un seuil d'activation élevé (~ -30 mV en présence de 10 mM Ca^{2+}) et conduisent un courant lent ayant une large conductance unitaire (25 pS en 110 mM Ba^{2+}) (NOWYCKY *et al.*, 1985). Les canaux calciques de type T peuvent être activés par de faibles dépolarisations (~ -70 mV en présence de 110 mM Ca^{2+}) et possèdent une petite conductance unitaire (8 pS en 110 mM Ba^{2+}) (NOWYCKY *et al.*, 1985; MITRA et MORAD, 1986). Si on les compare au type L, le courant calcique de type T s'active et s'inactive relativement rapidement à partir d'un

potentiel de membrane plus négatif. L'inactivation des canaux calciques de type L est dépendante du calcium intracellulaire tandis que pour les canaux de type T, elle est dépendante du voltage (FOX *et al.*, 1987; BKAILY, 1994).

Dans les cellules endothéliales, il ne semble pas exister de canaux calciques de type P, N, Q, R (résistant), L ou T (TAKEDA *et al.*, 1987; NILIUS et RIEMANN, 1990; TAKEDA *et* KLEPPER, 1990). Cependant, il a été rapporté la présence des canaux calciques de type R (repos) dans ces cellules (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997a). L'existence de ces canaux calciques a été initialement suggérée par BAKER *et al.* (1971) qui a montré que ce type de canal permettait l'entrée passive de Ca^{2+} dans la cellule pendant une dépolarisation membranaire de longue durée. Ils furent également nommés canaux calciques du potentiel de repos (R) par DIPOLO en 1979. Contrairement aux autres types de canaux calciques dépendants du voltage, les canaux calciques de type R n'ont pas de porte d'inactivation (DIPOLO, 1979; BKAILY, 1991; BKAILY *et al.*, 1997). Ces canaux sont activés lors d'une dépolarisation soutenue de la membrane cellulaire et possèdent une conductance de 24 pS (BKAILY, 1991; BKAILY *et al.*, 1997).

Dans les cellules du muscle lisse vasculaire, une dépolarisation soutenue de la membrane produit une augmentation transitoire rapide de calcium intracellulaire qui est suivie par une phase soutenue (BKAILY *et al.*, 1992). La première phase est abolie par les bloqueurs des canaux calciques de type L comme la nifédipine et de type L et R comme l'isradipine (BKAILY *et al.*, 1992). Cependant, la phase soutenue est insensible à la nifédipine, à la caféine

ainsi qu'à d'autres bloqueurs calciques, mais est sensible à l'isradipine et à l'EGTA, un chélateur de calcium (BKAILY, 1991; BKAILY *et al.*, 1992). Les canaux calciques de type R sont responsables des augmentations soutenues de calcium durant la contraction soutenue du muscle lisse vasculaire par différents agents vasoactifs et proinflammatoires comme le PAF, l'endothéline-1 ainsi que l'insuline (BKAILY *et al.*, 1992, 1993; BKAILY, 1994a et 1994b; TAOUDI-BENCHECROUN *et al.*, 1995). De plus, l'influx de calcium via les canaux calciques de type R est principalement responsable du maintien de la concentration de calcium intracellulaire normale physiologique et du tonus de base du muscle lisse vasculaire (BKAILY *et al.*, 1991). Il a été également rapporté que ces canaux semblent être impliqués dans des phénomènes de sécrétion basale de l'endothélium vasculaire (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997a).

1.4. Hypothèse et objectifs de travail.

Le NPY est un des peptides les plus abondants identifiés jusqu'à présent chez les mammifères. Sa structure est bien conservée au cours de l'évolution suggérant des rôles importants dans les processus physiologiques et pathophysiologiques. Le NPY médie ses effets via l'activation d'au moins cinq types de récepteurs désignés Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 et y_6 . Au niveau du système cardiovasculaire, la majorité des travaux effectués traitent de l'effet du NPY sur le

muscle cardiaque, le muscle lisse vasculaire et l'endothélium vasculaire. De plus, ces travaux ont démontré que le récepteur Y_1 joue un rôle majeur dans ces tissus. Cependant, aucune étude n'a démontré l'effet du NPY sur l'EE qui tapisse les cavités cardiaques et qui joue un rôle très important dans la régulation de la fonction cardiaque. Dans certaines conditions, le NPY est secrété dans la circulation en tant qu'hormone adrénomédullaire. De plus, des études récentes montrent la présence du NPY au niveau des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine. Aucune étude n'a démontré la présence du NPY et de ses récepteurs au niveau de l'EE qui est sujet non seulement au relâchement neuronal local du NPY mais également au NPY circulant et possiblement au NPY relâché par les CEEs elles-mêmes. Dans notre laboratoire, nous avons développé des cultures primaires de cellules endothéliales endocardiques isolées à partir du ventricule gauche et droit du cœur fœtal humain âgé de 13, 17 et 20 semaines et de rat adulte. Le but de cette thèse est de tester l'hypothèse selon laquelle le NPY et le récepteur Y_1 apparaissent graduellement au cours du développement fœtal humain de l'EE. De plus, il est postulé que la densité du NPY et du récepteur Y_1 au niveau des CEEs peut changer en fonction de l'âge et selon leur origine anatomique i.e des CEEs isolées à partir du ventricule gauche (CEEGs) ou du ventricule droit (CEEDs). De plus, la stimulation des récepteurs au NPY peut moduler la réponse du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le NPY au niveau des CEEGs et des CEEDs et finalement, l'augmentation du $[Ca]_i$ dans les CEEs peut induire la sécrétion du NPY dans le milieu extracellulaire, où il peut agir d'une façon

autocrine et paracrine. Afin de tester ces hypothèses, nous proposons de répondre aux questions suivantes:

- 1- Est-ce que les cellules endothéliales endocardiques possèdent des récepteurs au NPY?
- 2- Est-ce que ces récepteurs sont localisés préférentiellement sur la membrane de surface et/ou nucléaire?
- 3- Est-ce que les cellules endothéliales endocardiques contiennent du NPY?
- 4- Est-ce que le NPY et le récepteur Y_1 apparaissent de façon graduelle au cours du développement fœtal des CEEs ?
- 5- Est-ce qu'il existe une différence entre les CEEGs et les CEEDs en terme de densité et de distribution du NPY et du récepteur Y_1 ?
- 6- Est-ce que la stimulation des récepteurs au NPY module le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ au niveau des CEEGs et des CEEDs?
- 7- Est-ce que les CEEs sont capable de sécréter le NPY suite à une augmentation du $[Ca]_i$?

Afin de répondre à ces questions nous avons utilisé des CEEs isolées à partir des ventricules gauches et droits des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines. Les techniques utilisées sont l'immunofluorescence indirecte et la méthode de mesure du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ en utilisant la sonde calcique le Fluo-3/AM, ainsi que l'imagerie tridimensionnelle générée par la microscopie confocale. Finalement, nous avons utilisé la technique de radioimmunos dosage (RIA).

II. MATERIEL ET MÉTHODES

2.1. Isolation et culture des cellules endothéliales endocardiques isolées des cœurs foetaux âgés de 13, 17 et 20 semaines ainsi que de rats adultes.

Les cellules endothéliales endocardiques sont isolées à partir du ventricule droit et gauche (CEEDs et CEEGs, respectivement) du cœur foetal humain à différents stades de développement et de rat adulte en utilisant la trypsine et des méthodes mécaniques (BKAILY *et al.*, 1997; JACQUES *et al.*, 2000). La procédure est en accord avec les recommandations du comité d'éthique concernant l'utilisation des matériaux humains.

Les cœurs foetaux humains sont prélevés dans des conditions aseptiques. Ils sont immédiatement déposés dans un bécher contenant une solution stérile de S-MEM (Milieu Essentiel Minimal de Suspension) ayant la composition suivante: NaCl (120 mM), KCl (5 mM), MgSO₄ (0.8 mM), NaH₂PO₄ (10 mM)) (Gibco BRL; Burlington, Ont.) et supplémentée de Penicilline-G-Potassium (Ayerst; Montréal, QC). Par la suite, les ventricules sont disséqués et nettoyés du sang avec du milieu M199 (Gibco BRL, Burlington, Ont.) stérile, contenant de la Pénicilline et de la Streptomycine (Gibco BRL; Burlington, Ont.). Afin d'isoler les CEEDs et les CEEGs, les ventricules ouverts sont placés dans un pétri de culture avec leur face luminale dirigée vers le haut, et sont par la suite exposés à la trypsine (0.05%) (Whittaker; Walkerville, MD) pour 5 minutes. L'endothélium endocardique des deux côtés ventriculaires est ensuite gratté délicatement avec la lame d'un scalpel. Les cellules grattées sont lavées avec du milieu M199 (Gibco

BRL; Burlington, Ont) supplémenté de 10% FBS (sérum bovin fœtal) (Gibco BRL, Burlington, Ont). Après une centrifugation de 10 min à 1000 rpm (révolution par min), le milieu de culture est éliminé et le culot de cellules est suspendu dans un milieu M199 supplémenté de FBS (10%). Par la suite, les cellules sont dispersées dans des pétris. Pour les études sur des cellules fraîchement isolées, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre disposées dans de boîtes de pétris de 35 mm de diamètre, ou bien directement dans des boîtes de pétris de 100 mm (BKAILY *et al.*, 1992), et elles sont incubées à 37°C en présence de 5% CO₂. Pour produire des cultures cellulaires primaires, les CEEDs et les CEEGs, sont cultivées dans des flacons de culture (GibcoBRL, Burlington, Ont) et incubées comme ci-haut mentionné. À confluence, les cellules sont détachées par trypsinisation et recultivées dans du milieu M199 supplémenté de FBS (10%) (BKAILY *et al.*, 1997; JACQUES *et al.*, 2000).

Une vérification de la qualité et de la pureté des CEEDs et des CEEGs est faite en utilisant une sonde fluorescente, "Lectin Ulex Europeans Agglutinin" conjugué au FITC (6µg/ml pour 2 heures à la température de la pièce; Sigma, St-Louis, MO). Cette sonde lie les résidus α-fucose à la surface des cellules endothéliales (BKAILY *et al.*, 1997; JACQUES *et al.*, 2000). Les CEEDs et CEEGs se caractérisent par la présence d'un réticulum endoplasmique bien développé et d'un grand nombre de mitochondries qui entourent un large noyau (BKAILY *et al.*, 1999; JACQUES *et al.*, 2000). Ces cellules possèdent aussi un

canal calcique de type R (repos) fonctionnel, insensible à la nifédipine mais sensible à l'isradipine (JACQUES *et al.*, 2000).

2.2. Chargement des cellules avec des sondes fluorescentes.

2.2.1. La sonde calcique, le Fluo-3.

Les cellules sont mises en culture sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre. Les cellules sont lavées trois fois avec 2 ml d'une solution de Tyrode ayant comme composition 5 mM HEPES, 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.9 mM CaCl₂, 5 mM Hepes, 5.6 mM glucose, pH 7.4 ajusté avec du Tris base, le tout supplémenté de 0.1% de BSA (albumine de sérum bovin; Sigma, St Louis, MO). L'osmolarité de la solution de Tyrode avec ou sans BSA est ajustée à 310 mOsm avec du sucrose à l'aide d'un osmomètre (Advanced Instruments Inc., MA).

La sonde calcique, le Fluo-3/AM (Molecular Probes, Eugene, OR), est diluée dans une solution de Tyrode contenant du BSA à partir d'une solution stock congelée de 1 mM dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde); la concentration finale de la sonde étant de 13 μ M (BKAILY *et al.*, 1997). Les cellules sont incubées, suivant la méthode de la lamelle renversée, dans 100 μ l de sonde diluée placée sur une plaque de verre enveloppée de parafilm pendant 45 min.

L'incubation se fait à l'abri de la lumière dans un environnement humide afin de minimiser l'évaporation (BKAILY *et al.*, 1997; JACQUES *et al.*, 2000).

Après la période d'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec la solution Tyrode-BSA et par la suite deux fois avec la solution Tyrode seule. Les cellules chargées sont ensuite laissées dans le milieu Tyrode pour 15 min afin d'assurer l'hydrolyse totale des groupements acétoxyméthyl esters et de se débarrasser ainsi, de la forme non-hydrolysée de la sonde calcique (forme AM du Fluo-3) (BKAILY *et al.*, 1997; JACQUES *et al.*, 2000).

2.2.2. La sonde fluorescente pour identifier le réticulum endoplasmique, le DiOC₆.

Le réticulum endoplasmique (RE) des CEEDs et des CEEGs isolées est visualisé avec la sonde fluorescente des chaînes courte de carbocyanine, le DiOC₆ (3,3'-dihexyloxacarbo-cyanine iodide) (Molecular Probes, Eugene, OR). Les cellules sont mises en culture sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre qui conviennent à leur montage dans une chambre d'expérimentation (BKAILY *et al.*, 1997; 1999).

Le DiOC₆ est préparé à partir d'une solution stock congelée de 10 mM dans du DMSO. Par la suite, la sonde est diluée dans une solution Tyrode contenant du BSA afin d'obtenir une concentration finale de 50 nM. Le marquage du RE par le DiOC₆ est suivi par un marquage du noyau avec le marqueur des

acides nucléiques, le Syto11 (Molecular Probes, Eugene, OR). Cette technique de double marquage permet la localisation simultanée des deux organelles (BKAILY *et al.*,1997;1999).

2.2.3. La sonde fluorescente pour identifier les mitochondries, le MitoFluor/AM.

Les mitochondries des CEEDs et des CEEGs sont marquées avec le MitoFluor/AM (Molecular Probes, Eugene, OR), une sonde cationique attirée par le potentiel membranaire hautement négatif de ces organelles. Le MitoFluor/AM est diluée dans une solution Tyrode contenant du BSA à partir d'une solution stock de 1 mM dans du DMSO; la concentration finale étant de 50 à 100 nM. L'incubation est faite directement dans une chambre contenant 1 ml d'une solution Tyrode, à la température de la pièce et à l'abri de la lumière (BKAILY *et al.*,1997; 1999). Après 5 min d'incubation avec le MitoFluor, le marquage des mitochondries est visualisé à l'aide de la microscopie confocale. Comme pour le RE, le marquage des mitochondries est suivi par un marquage du noyau avec le Syto11.

2.2.4. La sonde fluorescente PYY couplée à la fluorescéine (FITC).

Les récepteurs au NPY de la membrane plasmique des cellules endothéliales endocardiques sont marqués à l'aide d'une sonde fluorescente développée dans notre laboratoire, le PYY couplé au FITC (PYY-FITC) (BKAILY *et al.*,1999).

Les cellules sont mises en culture sur des lamelles de 25 mm de diamètre qui conviennent à leur montage dans une chambre d'expérimentation. La sonde est ajoutée directement dans la chambre contenant 1 ml d'une solution Tyrode à une concentration finale de 10^{-7} M. Après 30 min d'incubation avec la sonde, le marquage du PYY est visualisé à l'aide de la microscopie confocale. Un contrôle négatif est réalisé en pré-incubant les cellules avec du PYY froid (non-conjugué au FITC) à une concentration de 10^{-5} M en présence de la sonde fluorescente, le PYY-FITC. Le Syto11 est ajouté à la fin des expériences afin de marquer le noyau.

2.3. Microscopie confocale.

La microscopie confocale offre plusieurs avantages par rapport à d'autres systèmes de fluorescence. En effet, elle permet entre autres, la génération d'images optiques sériées par élimination de la lumière hors foyer, ce qui n'est pas possible dans les études conventionnelles de fluorescence (NIGGLI et

LEDERER, 1991; LIPP et NIGGLI, 1993; BKAILY *et al.*, 1994; 1997; NIGGLI *et al.*, 1994). Grâce à un système d'ouverture confocale situé devant le détecteur de fluorescence, il est possible d'obtenir des sections optiques le long de l'axe vertical des cellules. Ces coupes servent, par la suite, à l'analyse des différentes couches de la cellule, et donc, à la reconstruction et la visualisation du matériel étudié en trois dimensions.

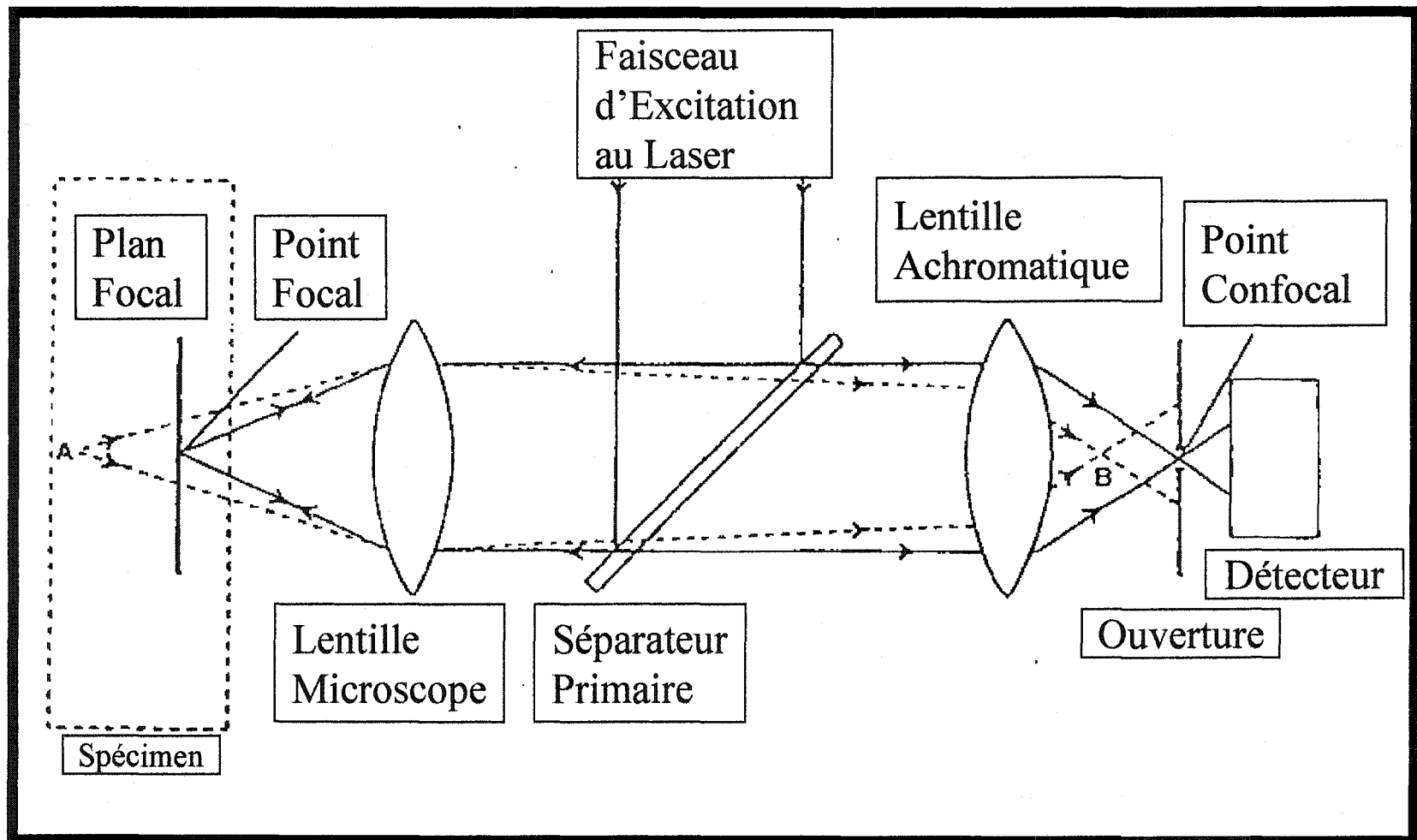
2.3.1. Principe de base.

Dans le système confocal, la lentille du microscope dirige le faisceau de lumière laser vers un point donné de l'échantillon, appelé le point focal (figure 12). La lumière émise (ou réfléchi) par ce point reprend le même chemin à travers le microscope. Les compartiments optiques du microscope focalisent la lumière de ce point vers un deuxième point, appelé le point confocal. Un système de volets ou ouvertures, positionnés au point confocal, ne laisse passer que la lumière provenant du point focal de se rendre au détecteur. Toute lumière incidente provenant de points au-dessus ou en-dessous du plan focal, et par conséquent hors foyer, est éliminée par l'ouverture confocale (Manuel d'utilisation du microscope Multi probe 2001).

Figure 12 Le point focal et le point confocal dans le système de la microscopie confocale.

Dans le système de la microscopie confocale, la lumière d'excitation venant du laser passe par un séparateur primaire et converge par les lentilles du microscope au point focal de l'échantillon. Une faible quantité de lumière du laser converge sur d'autres points du plan focal. La fluorescence provenant de l'échantillon repasse par le séparateur primaire afin de séparer la fluorescence émise de celle qui est réfléctée. La fluorescence émise est convergée par la lentille achromatique au point confocal et est enregistrée par le détecteur. Tout rayon frappant l'ouverture à des points autres que le point confocal n'est pas détecté.

(modifié du manuel d'utilisation du microscope Multi Probe 2001).



2.3.2. Balayage des cellules.

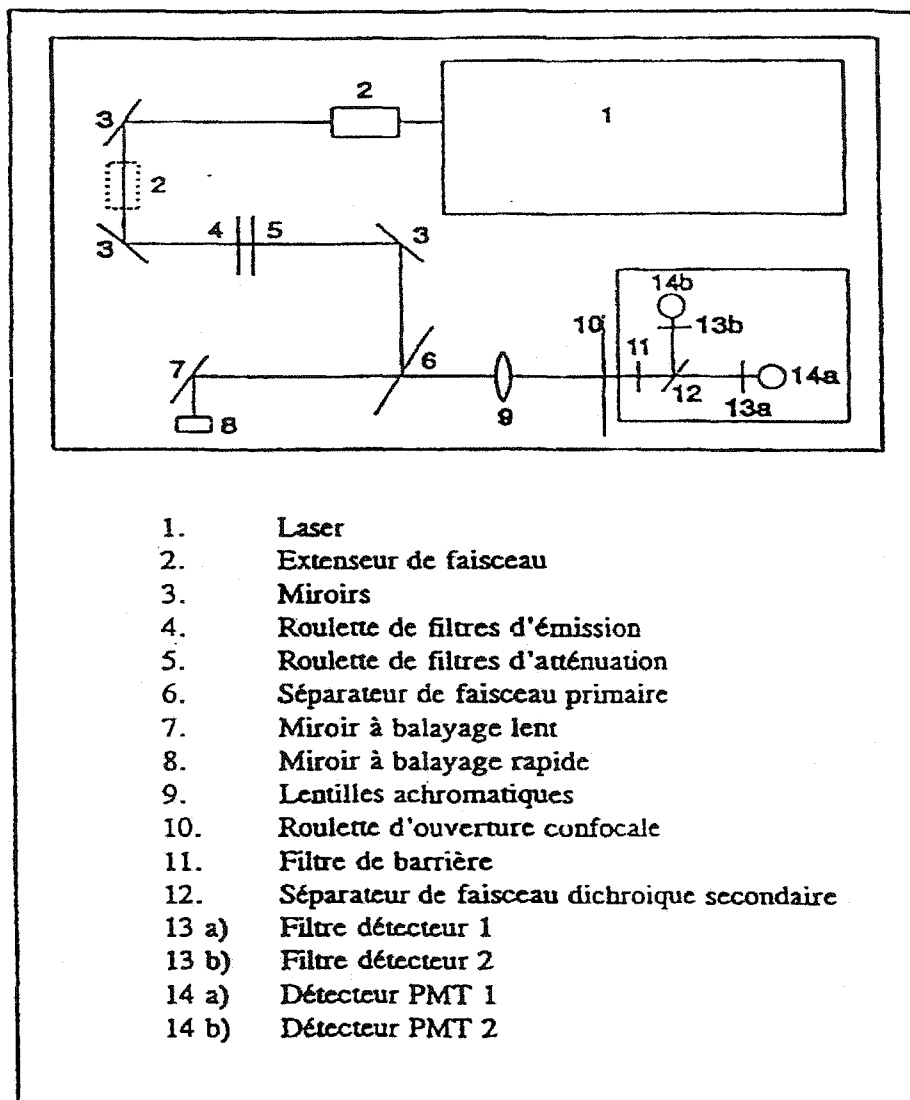
Les cellules chargées sont examinées à l'aide d'un système de microscopie confocale Multi Probe 2001 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) muni d'un laser à argon équipé d'un microscope à épifluorescence à phase inverse (Diaphot Nikon) et d'un objectif achromat (Nikon Oil Plan) de 60 X.

Le laser d'argon (9.0 mV), à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm, est dirigé sur l'échantillon via un filtre dichroïque primaire de 510 nm et est atténué avec un filtre de densité neutre de 1-3% afin de réduire la défluorescence. L'ouverture confocale est de 100 μm .

Pour toutes les expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34 μm . L'intensité du laser, l'acquisition photométrique, la configuration du PMT (multiplicateur de photons) et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales (figure 13). Les cellules sont balayées le long de l'axe Z par sections sériées pour permettre la reconstruction tridimensionnelle et la prise de mesures du niveau basal de l'intensité de fluorescence ainsi que de la réponse cellulaire suite à l'ajout de différents agents, dans le cytosol aussi bien que dans le noyau (BKAILY *et al.*, 1997).

Figure 13 Les compartiments optiques du système de la microscopie confocale.

(Modifié du manuel d'utilisation du microscope Multi Probe 2001)



2.4. Marquage du noyau.

À la fin de chaque expérience le noyau est marqué avec le Syto-11, un marqueur des acides nucléiques (Molecular Probes, Eugene, OR), à une concentration de 100 nM. Les cellules sont balayées par sections sériées immédiatement après le développement du marquage (8-10 min). La position, le nombre de sections ainsi que l'incrément entre ces dernières sont maintenus identiques à ceux utilisés lors de la fluorescence calcique. Une reconstruction en trois dimensions du noyau est réalisée afin de délimiter le calcium nucléaire du calcium cytosolique (BKAILY *et al.*, 1997).

Les images balayées sont transférées à une station d'analyse Indy de Silicon Graphics équipée d'un logiciel d'analyse et de reconstruction "Imagespace" de Molecular Dynamics. La reconstruction des images en 3D est présentée en projections d'intensité maximale générant une série d'images montrant l'intensité maximale des unités voxels (BKAILY *et al.*, 1997).

Les images des cellules chargées au Fluo-3, sont représentées en pseudo-couleur suivant une échelle d'intensité allant de 0 à 255 où le noir indique l'intensité zéro et le blanc l'intensité maximale. Les mesures de calcium dans le noyau sont effectuées sur des images individuelles et sur des reconstructions en 3D (sections sériées). La région du noyau, marquée au Syto-11, est isolée du reste de la cellule en fixant un seuil inférieur d'intensité afin de délimiter les pixels de cet espace.

Une série d'images binaires du volume nucléaire est générée en 3D pour chaque cellule en utilisant les mêmes paramètres pour les positions x, y, et z que ceux utilisés pendant les mesures calciques. En appliquant ces images binaires aux cellules chargées avec la sonde calcique, une nouvelle projection en 3D est créée montrant les niveaux d'intensité de fluorescence exclusivement dans le noyau (BKAILY *et al.*, 1996; 1997).

En isolant le noyau de la région cytosolique environnante, il est donc possible de mesurer les valeurs d'intensité moyenne du volume nucléaire en éliminant toute contribution possible du calcium périnucléaire.

2.5. Marquage par immunofluorescence.

2.5.1. Marquage du NPY.

L'immunofluorescence indirecte et un anticorps spécifique dirigé contre le NPY humain sont utilisés afin de marquer le NPY au niveau des CEEDs et des CEEGs. Cet anticorps nous a été généreusement fourni par le docteur Georges Pelletier (Centre de Recherches en Endocrinologie Moléculaire, Centre hospitalier universitaire de Québec, Québec, Canada) et est utilisé à une dilution de 1:2000. L'anticorps secondaire utilisé est un anti-IgG de lapin conjugué à la fluorescéine

(FITC) (Boheringer Mannheim; Mannheim, Allemagne) et ce dernier est utilisé à une dilution de 1:2000.

Pour déterminer la spécificité de l'immunoréactivité obtenue, des contrôles négatifs sont réalisés en préabsorbant du hNPY froid, à une concentration de 10^{-5} M, avec l'anticorps primaire. Le hNPY est généreusement fourni par le Dr Alain Fournier (INRS-Santé Université de Québec, Pointe-Claire, Québec, Canada).

2.5.2. Prétraitement des cellules avec une haute concentration de KCl.

Il a été rapporté que l'ajout d'une concentration élevée du KCl extracellulaire induit une dépolarisation soutenue de la membrane de surface des cellules endothéliales. Cette dépolarisation engendre une augmentation soutenue de la concentration du calcium cytosolique et nucléaire et ce via la stimulation des canaux calciques dépendant du voltage de type R (BKAILY *et al.*, 1997; JACQUES *et al.*, 2000).

Afin d'étudier l'effet de cette augmentation du calcium intracellulaire sur la mobilisation du NPY intracellulaire, la concentration du potassium extracellulaire ($[K]_o$) des CEEDs et des CEEGs en culture est augmentée de 5 à 30 mM KCl pendant 5, 10, 20, 30 et 60 min à 37°C. Par la suite, les cellules sont fixées avec 4% paraformaldéhyde. La mobilisation du NPY intracellulaire est

déterminée par immunofluorescence indirecte et visualisée à l'aide de la microscopie confocale.

2.5.3. Marquage du récepteur Y_1 .

La localisation ainsi que la distribution des récepteurs Y_1 dans les CEEDs et les CEEGs, sont réalisées en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte et un anticorps polyclonal spécifique, dirigé contre les deuxième et troisième boucles extracellulaires du récepteur Y_1 . Cet anticorps est utilisé à une dilution de 1:2000. L'antisérum du récepteur Y_1 nous est généreusement fourni par le Dr Annette G. Beck-Sickinger (Université de Leipzig, Leipzig, Allemagne). L'anticorps secondaire utilisé est un anti-IgG de poulet (Sigma; St Louis, MO) conjugué à la fluorescéine (FITC). Celui-ci est utilisé à une dilution de 1:2000.

2.5.4. Technique de l'immunofluorescence indirecte.

La technique utilisée a été modifiée de BRISMAR *et al.* (1998). En bref, les CEEDs et les CEEGs mises en culture sur des lamelles de 25 mm, sont fixés pendant 10 min dans une solution de paraformaldéhyde 4% (Cedarlane; Hombly, Ont) et sont ensuite lavés deux fois avec du PBS 1X, pH 7.4. Les cellules à étudier sont ensuite incubées pendant 10 min dans une solution de sodium borohydrure (2mg/ml) (Sigma; St Louis, MO) afin de neutraliser les groupements

aldéhydes, et sont lavés deux fois pendant 5 min avec du PBS. Afin de perméabiliser les cellules et de bloquer les sites de liaison non-spécifiques, les cellules sont incubées pendant 30 min à la température de la pièce dans une solution Triton 0.1% contenant 7% de sérum normal de chèvre (NGS) (Sigma, St Louis, MO) et 5% de lait écrémé (Sigma; St Louis, MO). Par la suite, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire à 4°C pendant toute la nuit dans une solution de Triton 0.1% contenant 1.4 % de NGS et 1 % de lait écrémé. Les préparations sont ensuite lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS et sont incubées pendant 1 heure, à la température de la pièce et à l'obscurité avec un anticorps secondaire fluorescent dans une solution de Triton 0.1% contenant 1.4 % de NGS et 1 % de lait écrémé (BRISMAR *et al.*, 1998). Finalement, les cellules sont visualisées en utilisant la microscopie confocale.

2.5.5. Visualisation et quantification du marquage par microscopie confocale.

Pour la visualisation et la quantification de l'intensité de fluorescence par microscopie confocale, les cellules sont mises en culture sur des lamelles de 25 mm de diamètre qui conviennent à la chambre d'expérimentation de 1 ml de solution tampon (PBS). Pour toutes les expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34 μm . L'intensité du laser, l'acquisition photométrique, la configuration du PMT (multiplicateur de photons) et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales. Les

échantillons sont balayés le long de l'axe Z par sections sériées pour permettre la reconstruction tridimensionnelle et la prise de mesures du niveau de l'intensité de fluorescence (BKAILY *et al.*, 1997).

Les paramètres utilisés pour la visualisation et la mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde FITC en simple marquage par microscopie confocale sont les mêmes que les paramètres utilisés pour les mesures du Ca^{2+} avec le complexe Fluo-3- Ca^{2+} .

2.6. Dosage du neuropeptide Y.

La concentration du NPY secrétée par les CEEDs et les CEEGs dans le milieu de culture, ainsi que la concentration du NPY dans le milieu intracellulaire, ont été déterminées à l'aide d'un essai radioimmunologique dosant le NPY (0-300 pmole) (Alpco-diagnostics; Windham, NH).

2.6.1. Préparation des échantillons.

Les CEEDs et les CEEGs sont mises en culture dans des boîtes de pétri de 100 mm de diamètre en présence de 5ml de milieu M199 supplémenté de 10% FBS. Une fois à confluence, le $[\text{K}]_o$ est augmentée de 5 à 30 mM KCl pendant 5, 10, 20, 30 et 60 min à 37 °C; la haute concentration du KCl induit une

dépolarisation soutenue de la membrane de surface des cellules endothéliales suivi par une augmentation soutenue de la concentration du calcium cytosolique et nucléaire (BKAILY *et al.*, 1997; JACQUES *et al.*, 2000). Par la suite, 600 μ l de milieu de culture est prélevé aux différents temps afin de doser la concentration du NPY secrétée dans le milieu extracellulaire. Afin de déterminer la concentration intracellulaire du NPY dans les CEEs, Les cellules sont lavées avec du PBS 1X, pH 7.4 et ensuite grattées en présence de 600 μ l du milieu M199 sans sérum et sont collectées dans des tubes eppendorfs. Par la suite, les cellules sont brisées afin d'avoir accès au milieu intracellulaire.

En parallèle des échantillons contrôles du milieu de culture ainsi que des lysats cellulaires en absence de 30 mM KCl sont préparés de la même façon que celle décrite ci-haut.

Finalement, les échantillons du milieu de culture ainsi que les lysats cellulaires sont conservés à -20°C jusqu'au moment où le dosage radioimmunologique du NPY est effectué.

2.6.2. Dosage radioimmunologique (RIA) du neuropeptide Y.

La concentration de NPY est mesurée à l'aide d'un Kit RIA acheté de la compagnie ALPCO (New Hampshire). Celui-ci contient toutes les solutions et réactifs nécessaires pour effectuer l'expérience. Le kit comprend un anticorps dirigé contre le NPY, un radioligand (le ^{125}I -NPY), un anticorps secondaire en

phase solide (anti-IgG de lapin couplé à des particules de cellulose), 3000 pmol/L de NPY pour la préparation des standards ainsi que 2 contrôles, (concentration de NPY de 42.5 ± 10.6 pmol/L et 98.5 ± 13.8 pmol/L). Par la suite, tous les constituants du kit de RIA du NPY sont dissous dans un tampon ayant la composition suivante: 0.05 M phosphate pH 7.4 contenant 0.25% d'albumine de sérum humain, 0.25% EDTA, 0.1% Triton X-100 et 0.05% d'azide de sodium.

Les réactivités croisées de l'antisérum NPY avec d'autres peptides de sa famille sont :

<u>Peptide</u>	<u>Réactivité croisée</u>
Neuropeptide Y (humain)	100.0%
Peptide YY (humain)	< 2.0%
Polypeptide pancréatique (humain)	< 1.0%
Neuropeptide Y ₁₋₂₁	< 0.1%
Neuropeptide Y ₂₀₋₃₆	< 0.4%

Le dosage du NPY est effectué selon le protocole fourni par la compagnie. Une courbe standard est effectuée en duplicata aux concentrations de NPY suivantes: 0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 et 300 pmol/L. Des tubes de polystyrène (Sarstedt, Montréal, QC) sont identifiés et préparés en duplicata pour le compte de radioactivité totale (T) et de la liaison non-spécifique (NS). 200µl de standard (0

pmol/L de NPY) est ajouté aux tubes où la liaison non-spécifique (NS) est déterminée et 200µl de chacun des standards (0 à 300 pmol/L de NPY) des échantillons et des contrôles est prélevé et transféré dans leurs tubes respectifs. L'anti-NPY (200µl) est ajouté à chacun des tubes, sauf pour les tubes où la liaison totale (T) et NS est déterminée. Les tubes sont ensuite vortexés et incubés pour 20 à 24 heures à 4°C. Par la suite, 200 µl de ¹²⁵I-NPY est ajouté à tous les tubes. Après agitation, les tubes sont incubés pour une deuxième fois pour une période de 20 à 24 heures à 4°C.

Dans tous les tubes, sauf pour les tubes T, 100 µl du deuxième anticorps (anti-lapin couplé à des particules de cellulose) est ajouté. Les tubes sont vortexés et incubés de 30 à 60 minutes à 4°C. La fraction du NPY liée à l'anticorps est séparée par centrifugation à 1700g pendant 15 minutes à 4°C. Par la suite, le surnageant est éliminé par inversion des tubes. La quantité de radioactivité est déterminée à l'aide d'un compteur d'émission de type gamma (1470 Wizard Gamma Counter Wallac).

2.7. Statistiques.

Les niveaux d'intensité de fluorescence cytosolique, perinucléaire ainsi que nucléaire sont représentés comme des valeurs moyennes d'intensité relative de fluorescence. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± E.S.M (erreur standard moyenne). La signification statistique est déterminée en utilisant le test

ANOVA des mesures répétées pour les valeurs partielles suivi du test Tukey-Kramer ou du test de Student-Newman-Keuls avec la comparaison multiple pour établir la valeur statistique des résultats. Les valeurs de p inférieures à 0.05 sont considérées comme significatives.

III. RÉSULTATS

3.1. Présence et distribution des récepteurs au NPY dans les cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines.

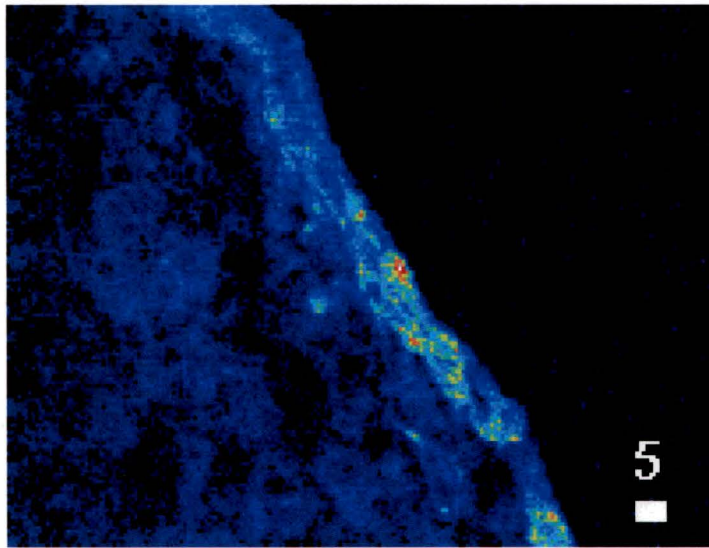
Dans ces séries d'expériences, nous avons étudié la présence et la distribution des récepteurs au NPY dans les cellules endothéliales endocardiques (CEEs) fœtales humaines âgées de 13, 17 et 20 semaines en utilisant les techniques d'immunofluorescence indirecte ainsi que le hPYY couplé à une sonde fluorescente et la microscopie confocale en 3-dimension (3-D).

3.1.1. Présence de récepteurs au NPY au niveau de l'endothélium endocardique fœtal humain.

Dans cette première série d'expériences, nous avons déterminé la présence des récepteurs au NPY au niveau de coupes congelées de 5 μm d'épaisseur du cœur entier fœtal, en utilisant le hPYY couplé à la sonde fluorescente FITC (hPYY-FITC) que nous avons développé dans notre laboratoire ainsi que la microscopie confocale. La figure 14 montre une coupe congelée de cœur fœtal humain âgé de 20 semaines au niveau ventriculaire suite à l'ajout du hPYY-FITC à une concentration de 10^{-7} M. Comme on peut remarquer dans cette figure, un marquage de la sonde hPYY-FITC est visible au niveau de la couche de l'endothélium endocardique suggérant que les CEEs possèdent des récepteurs au

Figure 14 Présence des récepteurs au NPY sur l'endothélium endocardique fœtal humain.

En utilisant la microscopie confocale et la sonde fluorescente, le hPYY couplé à la fluorescéine (hPYY-FITC) sur une coupe congelée de cœur fœtal humain âgé de 20 semaines au niveau ventriculaire, cette figure montre la présence des récepteurs au NPY au niveau de l'endothélium endocardique. Il est à noter que la densité des récepteurs au NPY est plus élevée au niveau des CEEs comparativement aux cardiomyocytes adjacents. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence du hPYY-FITC de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm .



NPY. Il est à noter que la distribution des récepteurs au NPY n'est pas homogène et se regroupent très souvent en amas. Par contre, au niveau des cardiomyocytes adjacents la densité relative des récepteurs au NPY est beaucoup plus faible (figure 14). Ces expériences sont les premières évidences démontrant la présence des récepteurs au NPY au niveau de l'endothélium endocardique fœtal humain.

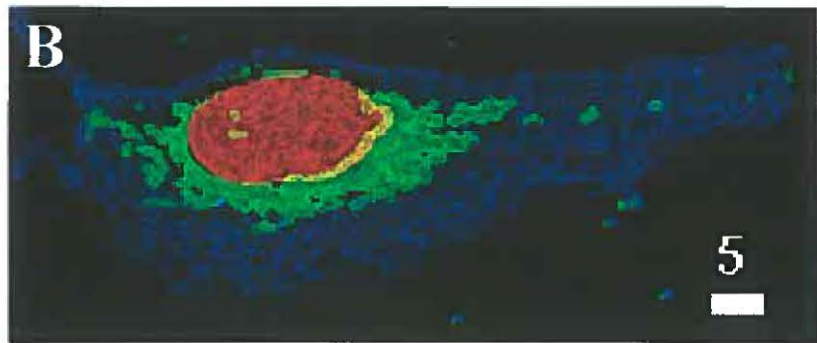
3.1.2. Présence de récepteurs au NPY au niveau des cellules isolées de l'endothélium endocardique fœtal humain.

Plusieurs sondes fluorescentes ont été développées dans le but d'étudier des structures fonctionnelles à l'intérieur des cellules vivantes (BKAILY *et al.*, 1997). L'usage de la microscopie confocale permet de déterminer la distribution en trois dimensions de ces structures biologiques. D'autre part, cette technique couplée au double et au triple marquages permet de corrélérer des événements et des processus dynamiques avec des structures cellulaires bien spécifiques (LEMASTER *et al.*, 1993; BKAILY *et al.*, 1997).

Suite à l'isolation des CEEs, nous avons premièrement examiné la morphologie de ces dernières. Dans nos expériences nous avons utilisé le DiOC₆, le MitoFluor et le syto-11 pour marquer le réticulum endoplasmique, les mitochondries et le noyau respectivement. La figure 15 montre clairement que les CEEs contiennent un réseau bien développé de réticulum endoplasmique et un très grand nombre de mitochondries qui entourent un noyau assez volumineux.

Figure 15 Marquage fluorescent du réticulum endoplasmique, des mitochondries et du noyau dans les cellules isolées de l'endothélium endocardique.

(A): Marquage du réticulum endoplasmique avec la sonde fluorescente, le DiOC₆ (couleur rouge). Les CEEs possèdent un réseau bien développé de réticulum endoplasmique. (B): Marquage des mitochondries avec la sonde fluorescente MitoFluor (couleur verte) et du noyau avec le syto 11 (couleur rouge). Les mitochondries de forme arrondies sont abondantes. L'échelle de mesure en blanc est en μm . Les couleurs n'ont aucune valeur mesurable.

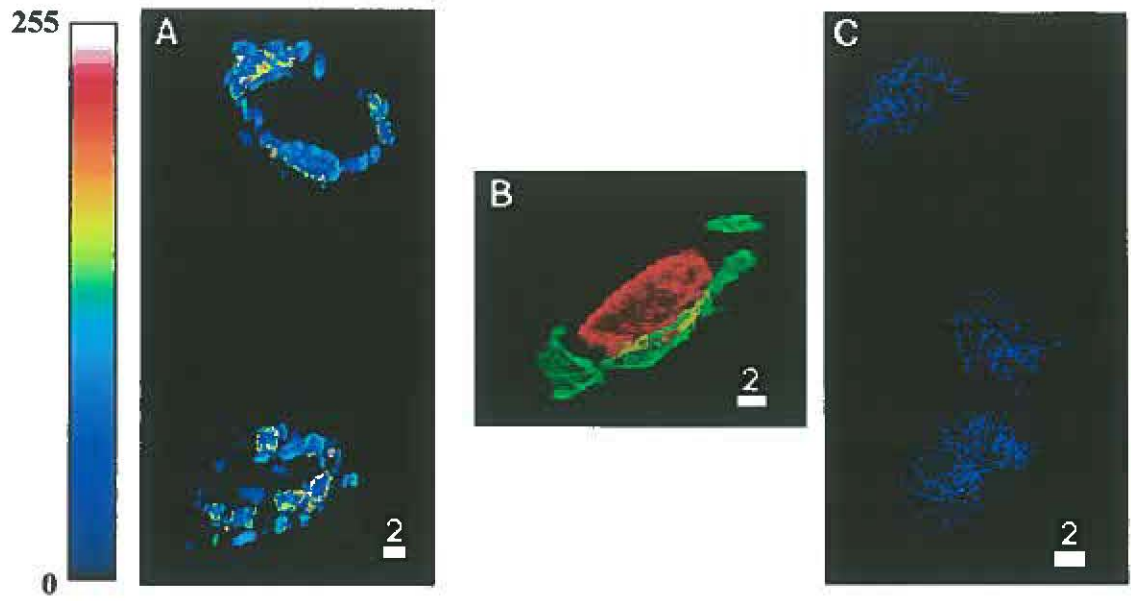


Ces résultats suggèrent donc que les CEEs sont des cellules métaboliquement actives (JACQUES *et al.*, 2000). De plus, après chaque isolation des CEEs et dans le but de déterminer la pureté de notre culture cellulaire, les cellules ont été marquées avec une sonde fluorescente spécifique aux cellules endothéliales, la "Lectin Ulex Europeans Agglutinin-1" conjuguée à la FITC.

Après avoir examiné la morphologie des CEEs ainsi que la pureté de notre culture cellulaire, nous avons, par la suite, déterminé si tout comme au niveau du cœur intact, les cellules isolées à partir du cœur fœtal âgé de 20 semaines possèdent des récepteurs au NPY. Comme pour la section précédente, nous avons utilisé la sonde fluorescente développée dans notre laboratoire, le hPYY-FITC et la microscopie confocale. Les cellules ont été incubées avec la sonde à une concentration de 10^{-7} M et ont été, par la suite, visualisées avec le microscope confocal. Les panneaux A et B de la figure 16 montrent que les CEEs possèdent des récepteurs au NPY qui sont aussi regroupés en amas au niveau de la membrane plasmique. Ensuite, et dans le but de déterminer la spécificité de notre sonde, nous avons préincubé les cellules avec du hPYY non marqué à une concentration de 10^{-5} M avant l'ajout de la sonde fluorescente (hPYY-FITC). Le panneau C de la figure 16 montre clairement que le hPYY non marqué a presque complètement prévenu la liaison du hPYY-FITC de la sonde fluorescente à ses sites.

Figure 16 Présence des récepteurs au NPY au niveau des cellules endothéliales endocardiques isolées du cœur foetal humain âgé de 20 semaines.

(A): Reconstruction en 3-dimensions de cellules endothéliales endocardiques montrant la présence des récepteurs au NPY regroupés en amas au niveau de la membrane plasmique après une incubation 10^{-7} M de hPYY-FITC. Ce panneau montre une distribution hétérogène en "cluster-like" des sites de liaison pour la sonde fluorescente hPYY conjugué à la FITC sur la membrane plasmique des cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines. (B): Reconstruction en trois dimensions d'une cellule endothéliale endocardique montrant la distribution des récepteurs au NPY (couleur verte) et le noyau marqué avec le syto-11 (couleur rouge). (C): Pré-incubation des cellules avec du hPYY non marqué à une concentration de 10^{-5} M avant l'ajout de la sonde fluorescente (10^{-7} M). Le hPYY non marqué inhibe presque complètement la liaison de la sonde hPYY-FITC. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence du hPYY-FITC de 0 à 255. Les couleurs du panneau B n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm .



3.1.3. Localisation et distribution du récepteur Y₁ dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines.

Dans la section précédente, nous avons démontré la présence de récepteurs au NPY au niveau de la membrane de surface des CEEs âgées de 20 semaines. Plusieurs groupes incluant le nôtre ont démontré que le récepteur Y₁ joue un rôle majeur dans le système cardiovasculaire (ALLEN *et al.* 1983a; EDVINSSON *et al.*, 1984; LUNDBERG *et al.*, 1984a; FRANCO-CERECEDA *et al.* 1985; 1987; MICHEL *et al.*, 1988; McLEAN et HILEY, 1990; WEIS *et al.*, 1990; MILLAR *et al.*, 1991; 1994; GRUNDEMAR *et al.*, 1992; McAULEY et WESTFALL, 1992; ZUKOWSKA-GROJEC et WAHLESTEDT, 1993; ENTZEROTH *et al.*, 1994; ABOUNADER *et al.*, 1995; DOODS *et al.*, 1995; MALMSTRÖM et LUNDBERG, 1997; GOLDBERG *et al.*, 1998; ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998; 1998a; JACQUES *et al.*, 2000a). Dans cette série d'expériences nous avons donc voulu vérifier la présence et la distribution du récepteur Y₁ dans les CEEs isolées du ventricule gauche (CEEGs) et du ventricule droit (CEEDs) des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte et un anticorps spécifique pour le récepteur Y₁ (dilution, 1:2000). Le marquage est observé par la microscopie confocale qui nous permet de visualiser en trois dimensions la distribution du récepteur Y₁ au niveau de nos cellules ainsi que d'évaluer d'une façon semi-quantitative l'intensité de fluorescence de l'antisérum du récepteur Y₁.

Comme le montre la figure 17, la densité du récepteur Y_1 augmente en fonction de l'âge autant au niveau des CEEGs que des CEEDs. Comme l'illustre bien cette figure, les récepteurs Y_1 sont présents non seulement au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau du cytosol et du noyau, avec une immunoréactivité bien marquée au niveau de la région périnucléaire (incluant les membranes nucléaires) et ce surtout à l'âge de 20 semaines.

Par la suite, et à l'aide de la microscopie confocale, nous avons pris des mesures semi-quantitatives de l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur Y_1 (conjuguée au FITC) au niveau du cytosol, de la région périnucléaire et du noyau des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines. Les valeurs d'intensité de fluorescence au niveau des trois compartiments cellulaires sont calculées à partir de la distribution tridimensionnelle du récepteur Y_1 dans nos cellules. Nos mesures semi-quantitatives montrent une différence dans la densité du récepteur Y_1 dans les trois compartiments cellulaires, aussi bien au niveau des CEEGs que des CEEDs (Figure 18). Pour les CEEGs isolées à partir du cœur fœtal âgé de 13 semaines, la moyenne de l'intensité de fluorescence du FITC conjugué à l'anticorps du récepteur Y_1 est de 0.9 ± 0.12 dans le cytosol, de 10.8 ± 0.9 dans la région périnucléaire et de 9.9 ± 1.0 dans le noyau ($n=7$). Nos études statistiques montrent que la différence est hautement significative ($p<0.001$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires. Cependant, il n'y a pas une différence significative entre le noyau et la région périnucléaire dans ces cellules. Pour les

Figure 17 Marquage immunofluorescent du récepteur Y_1 dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines.

Reconstruction en 3-D des CEEGs (A, C et E) et des CEEDs (B, D et F) des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines, respectivement montrant l'immunoréactivité du récepteur Y_1 . (G) contrôle négatif où les cellules sont incubées seulement avec l'anticorps secondaire en absence d'anticorps primaire. Ce récepteur est présent au niveau de la membrane plasmique et le cytosol avec une intensité de fluorescence plus élevée au niveau du noyau et plus particulièrement au niveau de la région périnucléaire. Il est à noter que l'immunoréactivité du récepteur Y_1 augmente en fonction de l'âge fœtal pour atteindre un maximum à 20 semaines. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du récepteur Y_1 allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

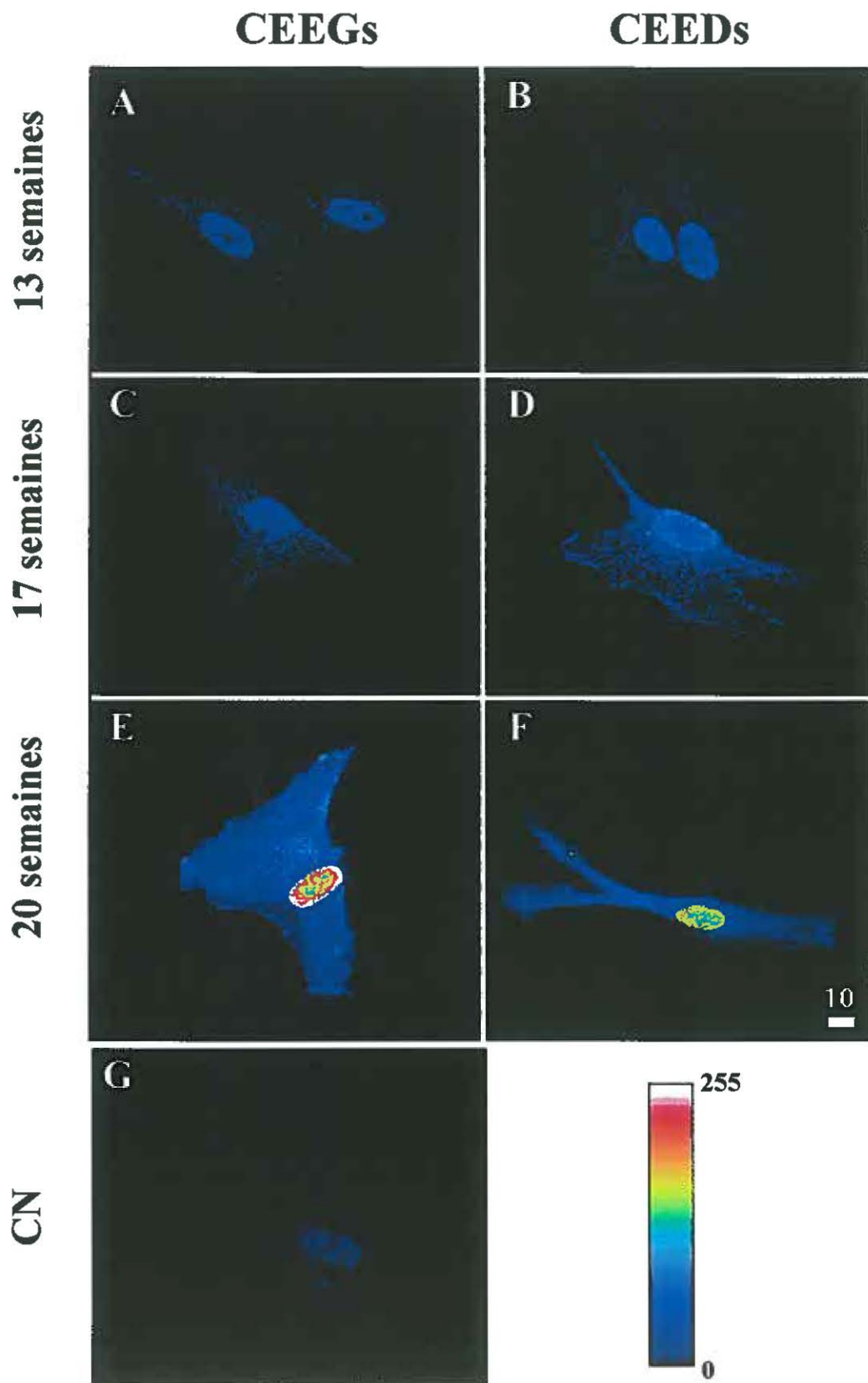
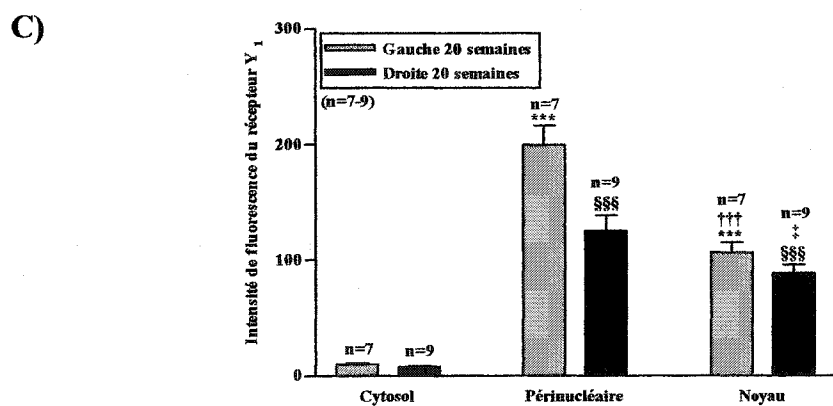
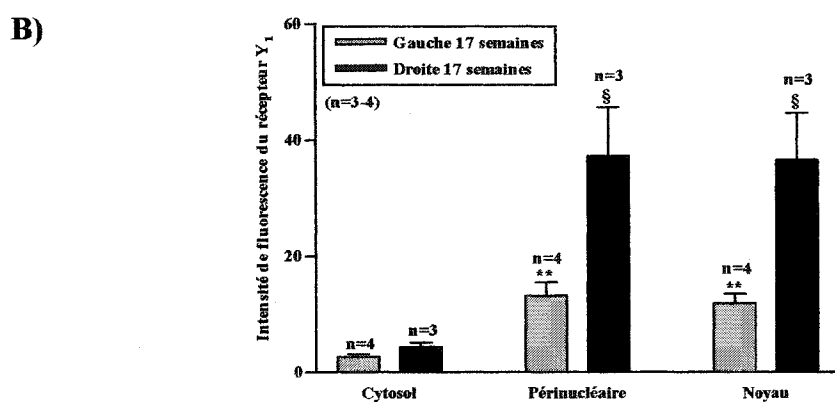
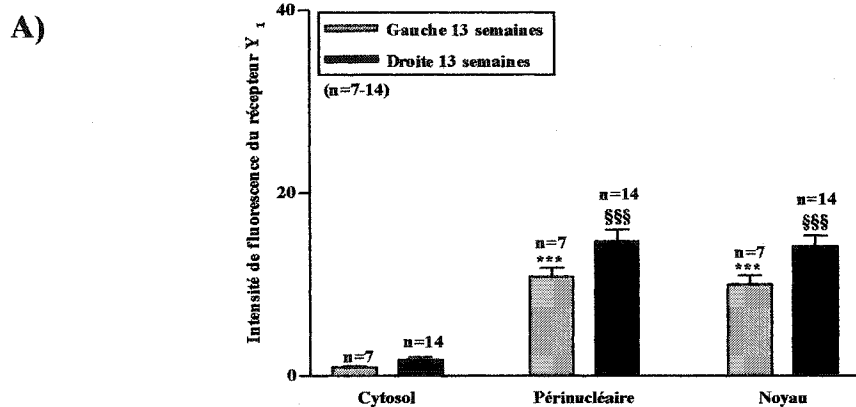


Figure 18 Distribution et densité relative du récepteur Y_1 dans les trois compartiments cellulaires (cytosol, région périnucléaire et noyau) des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines.

L'histogramme A montre la distribution et la densité du récepteur Y_1 dans le cytosol la région périnucléaire (incluant les membranes nucléaires) et le noyau des CEEGs et des CEEDs du cœur fœtal âgé de 13 semaines. L'histogramme B montre la distribution et la densité du récepteur Y_1 dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau des CEEGs et des CEEDs du cœur fœtal âgé de 17 semaines. L'histogramme C montre la distribution et la densité du récepteur Y_1 dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau des CEEGs et des CEEDs du cœur fœtal âgé de 20 semaines. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne. (*) comparaison de la région périnucléaire et noyau vs cytosol au niveau des CEEGs (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), (†) comparaison noyau vs région périnucléaire au niveau des CEEGs (††† $p < 0.001$), (§) comparaison région périnucléaire et noyau vs cytosol au niveau des CEEDs (§ $p < 0.05$; §§§ $p < 0.001$), (‡) comparaison noyau vs région périnucléaire au niveau des CEEDs (‡ $p < 0.05$). «n» est le nombre d'expériences.

Distribution et densité relative du récepteur Y_1 dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau des CEEGs et des CEEDs des coeurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines.



CEEDs isolées à partir du cœur fœtal âgé de 13 semaines, l'intensité de fluorescence est de 1.8 ± 0.2 dans le cytosol, de 14.7 ± 1.2 dans la région périnucléaire et de 14.1 ± 1.2 dans le noyau ($n=14$). La différence est hautement significative ($p<0.001$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires, mais il n'y a pas une différence significative entre le noyau et la région périnucléaire dans ces cellules (Figure 18A).

Pour les CEEGs isolées à partir du cœur fœtal âgé de 17 semaines, la moyenne de l'intensité de fluorescence du FITC conjugué à l'anticorps du récepteur Y_1 est de 2.6 ± 0.5 dans le cytosol, de 13.2 ± 2.3 dans la région périnucléaire et de 11.9 ± 1.6 dans le noyau ($n=4$). Nos études statistiques montrent que la différence est significative ($p<0.01$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires, cependant, il n'y a pas une différence significative entre le noyau et la région périnucléaire dans ces cellules. Pour les CEEDs isolées à partir du cœur fœtal âgé de 17 semaines, l'intensité de fluorescence est de 4.4 ± 0.7 dans le cytosol, de 37.2 ± 8.3 dans la région périnucléaire et de 36.5 ± 8.0 dans le noyau ($n=3$). La différence est significative ($p<0.05$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires, mais il n'y a pas une différence significative entre le noyau et la région périnucléaire dans ces cellules (Figure 18B).

Finalement, à l'âge de 20 semaines, la moyenne de l'intensité de fluorescence du FITC conjugué à l'anticorps du récepteur Y_1 pour les CEEGs est de 9.8 ± 1.6 dans le cytosol, de 199.7 ± 16.6 dans la région périnucléaire et de 106.5 ± 8.7 dans le noyau ($n=7$). Nos études statistiques montrent que la

différence est hautement significative ($p < 0.001$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires, et entre le noyau et la région périnucléaire. Pour les CEEDs isolées à partir du cœur fœtal âgé de 20 semaines, l'intensité de fluorescence est de 7.5 ± 0.9 dans le cytosol, de 125.7 ± 13.5 dans la région périnucléaire et de 88.7 ± 7.2 dans le noyau ($n=9$). La différence est hautement significative ($p < 0.001$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires et significative ($p < 0.05$) entre le noyau et la région périnucléaire (Figure 18C).

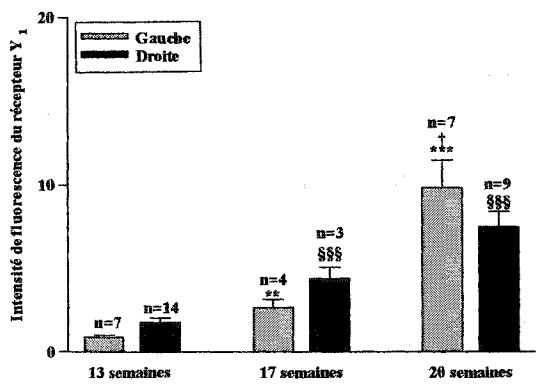
De plus, nos résultats montrent aussi que la densité des récepteurs Y_1 est différente entre les CEEGs et les CEEDs au niveau des trois compartiments cellulaires (cytosol, région périnucléaire et noyau) à l'âge de 13, 17 et 20 semaines. À 13 et 17 semaines d'âge fœtal, la densité du récepteur Y_1 est plus élevée au niveau des CEEDs par rapport au CEEGs. Par contre, à 20 semaines la densité du récepteur Y_1 est plus élevée au niveau des CEEGs par rapport au CEEDs. Les histogrammes A, B et C de la figure 19 montrent la distribution respective du récepteur Y_1 dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau des CEEGs et des CEEDs des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines. Les valeurs exprimées en moyenne de l'intensité de fluorescence avec la comparaison statistique sont illustrées dans le tableau 3. L'histogramme D de la figure 19 montre la somme de l'intensité de fluorescence des trois compartiments cellulaires des CEEGs et des CEEDs des cœurs âgés de 13, 17 et 20 semaines. Cette représentation montre encore une fois que le patron d'expression du récepteur Y_1 des CEEs augmente en fonction de l'âge fœtal aussi bien du côté du

Figure 19 Densité relative du récepteur Y₁ dans les CEEGs et les CEEDs à différents stades du développement cardiaque fœtal humain.

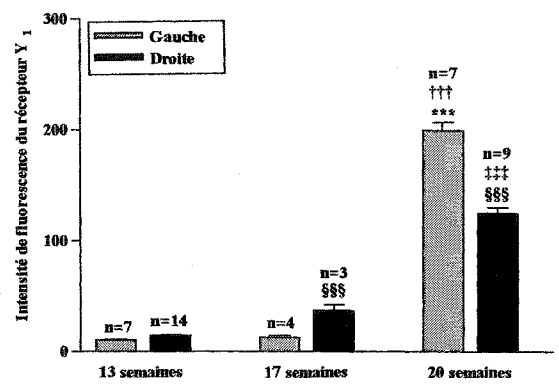
Les histogrammes A, B et C montrent les densités relatives du récepteur Y₁ dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau, respectivement des CEEGs et des CEEDs des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines. L'histogramme D montre la somme des densités relatives du récepteur Y₁ dans les trois compartiments cellulaires des CEEGs et de CEEDs des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines. Les valeurs sont présentées comme moyennes ± erreur standard de la moyenne. (*) comparaison 17 et 20 semaines vs 13 semaines au niveau des CEEGs (**p<0.01; ***p<0.001), (†) comparaison 20 semaines vs 17 semaines au niveau des CEEGs (†p<0.05; ††† p<0.001), (§)comparaison 17 et 20 semaines vs 13 semaines au niveau des CEEDs (§§§p<0.001), (‡)comparaison 20 semaines vs 17 semaines au niveau des CEEDs (‡‡‡ p<0.001). «n» est le nombre d'expériences.

Distribution et densité relative du récepteur Y_1 dans les CEEGs et les CEEDs à différents stades du développement fœtal.

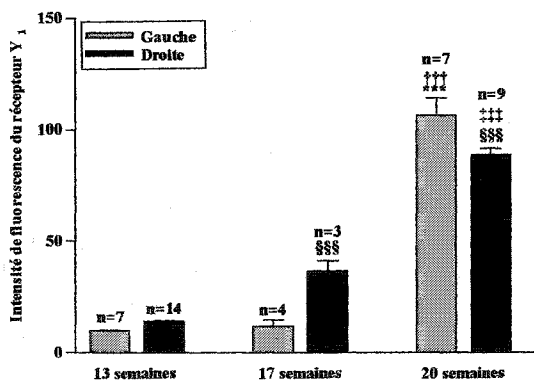
A) Cytosol



B) Région périnucléaire



C) Noyau



D) Somme

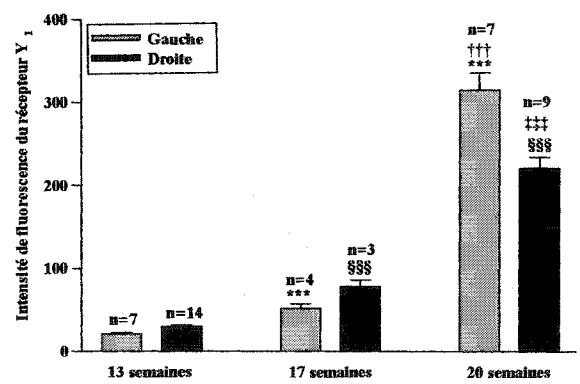


Tableau 3 : Mesure de la densité des récepteurs Y₁ dans les trois différents compartiments cellulaires des CEEGs et des CEEDs des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines.

	13 semaines	17 semaines	20 semaines
CEEGs (C)	0.9 ± 0.12 (n=7)	2.6 ± 0.5 (n=4) **	9.8 ± 1.6 (n=7) *** *
CEEDs (C)	† 1.8 ± 0.2 (n=14)	4.4 ± 0.7 (n=3) ***	7.5 ± 0.9 (n=9) ***
CEEGs (P)	10.8 ± 0.9 (n=7)	13.2 ± 2.3 (n=4) *	199.7 ± 16.6 (n=7) *** **
CEEDs (P)	14.7 ± 1.2 (n=14)	† 37.2 ± 8.3 (n=3) ***	†† 125.7 ± 13.5 (n=9) *** **
CEEGs (N)	9.9 ± 1.0 (n=7)	11.9 ± 1.6 (n=4)	106.5 ± 8.7 (n=7) *** **
CEEDs (N)	††† 14.1 ± 1.2 (n=14)	†† 36.5 ± 8.0 (n=3) ***	† 88.7 ± 7.2 (n=9) *** **

C: Cytosol, P: Région périnucléaire, N: Noyau. Valeurs exprimées sous forme de moyenne ± erreur standard d'au moins trois expériences. (*) Comparaison horizontale, (*)17 semaines vs 13 semaines, (*) 20 semaines vs 17 semaines et (*) 20 semaines vs 13 semaines, des trois compartiments cellulaires, du côté droit ainsi que du coté gauche (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001). (†) Comparaison verticale d'un compartiment cellulaire des CEEDs vs le même compartiment de même âge au niveau des CEEGs (†P<0.05, ††P<0.01, †††P<0.001). «n» est le nombre d'expériences.

ventricule gauche que du côté du ventricule droit. De même, l'expression de ce récepteur semble être différente dans les CEEGs en comparaison avec les CEEDs. À 13 et à 17 semaines, l'expression du récepteur Y_1 dans les CEEDs est plus élevée que dans les CEEGs, tandis qu'à 20 semaines d'âge fœtal l'expression des récepteurs Y_1 devient plus importante dans les CEEGs. Les valeurs exprimées en moyenne de l'intensité de fluorescence avec la comparaison statistique sont illustrées dans le tableau 4.

3.2. Localisation et distribution du NPY dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines.

Il est bien connu que le NPY est principalement synthétisé par les neurones et plus particulièrement les neurones du système nerveux sympathique (LUNDBERG et TATEMOTO, 1982; EKBLAD *et al.*, 1984; SUNDLER *et al.*, 1986; SHEIKH *et al.*, 1988; LUNDBERG *et al.*, 1989a; WAHLESTEDT *et al.*, 1990) ainsi que par la médullo surrénale (ALLEN *et al.*, 1983a ; GROUZMANN *et al.*, 1989). Des études récentes ont démontré que le NPY est présent dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998a). Nous avons donc voulu vérifier si les CEEGs et les CEEDs des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines contiennent du NPY. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte et un anticorps spécifique pour le NPY (dilution, 1:2000). Des contrôles négatifs sont effectués

Tableau 4 : Mesure de la densité totale du récepteur Y₁ dans les CEEGs et les CEEDs des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines.

	13 semaines	17 semaines	20 semaines
CEEGs	21.6 ± 1.0 (n=7)	52.1 ± 5.6 (n=4) ***	315.5 ± 20.7 (n=7) *** ***
CEEDs	†††† 30.5 ± 1.2 (n=14)	† 78.3 ± 8.3 (n=3) ***	†† 221.3 ± 13.5 (n=9) *** ***

Valeurs exprimées sous forme de moyenne ± erreur standard d'au moins trois expériences. (*) Comparaison horizontale, (*) 17 semaines vs 13 semaines, (*) 20 semaines vs 17 semaines et (*) 20 semaines vs 13 semaines, des CEEDs ainsi que des CEEGs (***P<0.001). (†) Comparaison verticale des CEEDs vs le même âge au niveau des CEEGs (†††P<0.001). «n» est le nombre d'expériences.

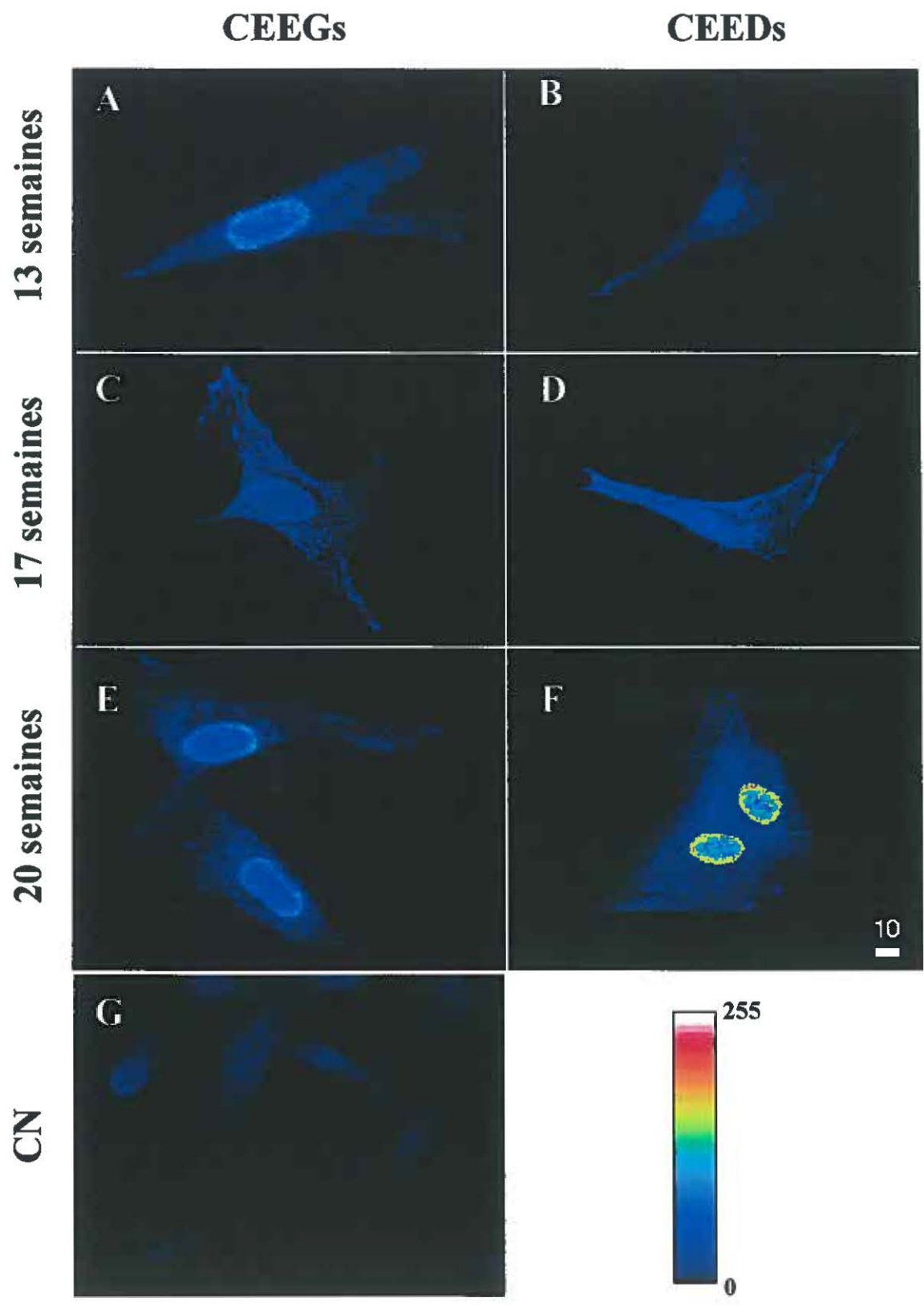
en parallèle en préincubant l'anticorps primaire avec une concentration élevée de hNPY (10^{-5} M) (voir figure 20), ou en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire en absence de l'anticorps primaire. Le marquage est visualisé par la microscopie confocale qui nous permet de déterminer en trois dimensions la distribution du NPY au niveau de nos cellules ainsi que de mesurer d'une façon semi-quantitative, l'intensité de fluorescence de l'anticorps NPY (couplé au FITC).

La figure 20 montre des exemples typiques du marquage du NPY au niveau des CEEGs et des CEEDs des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines. Comme on peut le remarquer, le NPY est présent dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains aux trois stades de développement. Nos résultats montrent qu'au niveau des CEEDs, la densité de NPY augmente en fonction de l'âge fœtal et ceci dans les trois compartiments cellulaires (cytosol, région périnucléaire et noyau). De plus, à 20 semaines, le marquage devient très intense au niveau nucléaire et plus particulièrement au niveau de la région périnucléaire. Cependant, au niveau des CEEGs le patron d'expression du NPY en fonction de l'âge fœtal est complètement différent. La densité du NPY est élevée dans les CEEs isolées à partir du cœur fœtal âgé de 13 semaines, diminue à 17 semaines et augmente de nouveau à 20 semaines (voir figure 20).

Par la suite, et à l'aide de la microscopie confocale, nous avons pris des mesures semi-quantitatives de l'intensité de fluorescence de l'anticorps du NPY (conjugué au FITC) au niveau du cytosol, de la région périnucléaire et du noyau

Figure 20 Marquage immunofluorescent du NPY dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines.

Reconstruction en 3-D des CEEGs (A, C et E) et des CEEDs (B, D et F) isolées à partir des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines, respectivement montrant l'immunoréactivité du NPY. (G) contrôle négatif effectué en préincubant les cellules avec du hNPY froid (10^{-5} M) en présence de l'anticorps primaire. Ce peptide est présent au niveau de la membrane plasmique et le cytosol avec une intensité de fluorescence plus élevée au niveau du noyau et plus particulièrement au niveau de la région périnucléaire. Il est à noter que l'immunoréactivité du peptide au niveau des CEEs augmente en fonction de l'âge fœtal pour atteindre un maximum à 20 semaines. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps du NPY allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm .



des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines. Les valeurs d'intensité de fluorescence de l'anticorps du NPY au niveau des trois compartiments cellulaires sont calculées à partir de la distribution tridimensionnelle du NPY dans nos cellules. Nos mesures semi-quantitatives montrent une différence dans la densité du NPY dans les trois compartiments cellulaires, aussi bien au niveau des CEEGs que des CEEDs (Figure 21). À l'âge fœtal de 13 semaines, la moyenne de l'intensité de fluorescence du FITC conjugué à l'anticorps du NPY pour les CEEGs est de 1.4 ± 0.13 dans le cytosol, de 35.4 ± 2.6 dans la région périnucléaire et de 34.4 ± 2.1 dans le noyau ($n=10$). Nos études statistiques montrent que la différence est hautement significative ($p<0.001$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires. Cependant, il n'y a pas une différence significative entre le noyau et la région périnucléaire dans ces cellules. Pour les CEEDs isolées à partir du cœur fœtal de même âge (13 semaines), l'intensité de fluorescence est de 0.7 ± 0.5 dans le cytosol, de 8.02 ± 0.6 dans la région périnucléaire, et de 8.04 ± 0.5 dans le noyau ($n=8$). La différence est hautement significative ($p<0.001$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires, mais il n'y a pas une différence significative entre le noyau et la région périnucléaire dans ces cellules (Figure 21A).

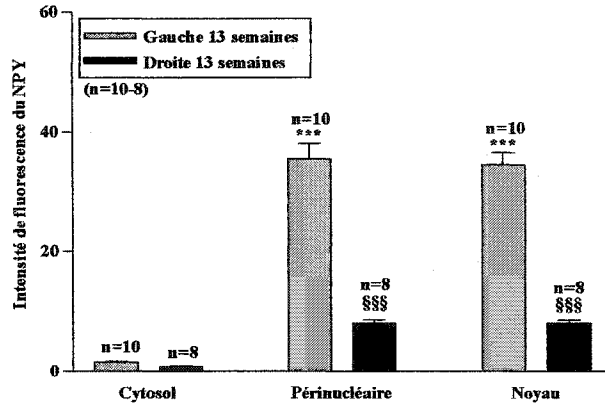
À l'âge fœtal de 17 semaines la moyenne de l'intensité de fluorescence du FITC conjugué à l'anticorps du NPY pour les CEEGs est de 3.2 ± 0.2 dans le cytosol, de 21.6 ± 1.6 dans la région périnucléaire, et de 20.4 ± 1.1 dans le noyau ($n=4$). Nos études statistiques montrent que la différence est significative

Figure 21 Distribution et densité relative du récepteur NPY dans les trois compartiments cellulaires (cytosol, région périnucléaire et noyau) des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines.

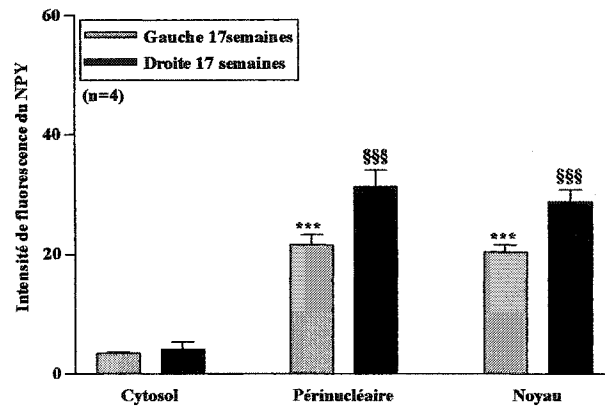
L'histogramme A montre la distribution et la densité du NPY dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau des CEEGs et des CEEDs isolées à partir des cœurs fœtaux âgés de 13 semaines. L'histogramme B montre la distribution et la densité du NPY dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau des CEEGs et des CEEDs isolées à partir des cœurs fœtaux âgés de 17 semaines. L'histogramme C montre la distribution et la densité NPY dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau des CEEGs et des CEEDs isolées à partir des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne. (*) comparaison région périnucléaire et noyau vs cytosol au niveau des CEEGs (** $p < 0.001$), (†) comparaison noyau vs région périnucléaire au niveau des CEEGs (††† $p < 0.001$), (§) comparaison région périnucléaire et noyau vs cytosol au niveau des CEEDs (§§§ $p < 0.001$), (‡) comparaison noyau vs région périnucléaire au niveau des CEEDs (‡ $p < 0.05$, ‡‡‡ $p < 0.001$). «n» est le nombre d'expériences.

Distribution et densité relative du NPY dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau des CEEGs et des CEEDs des coeurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines.

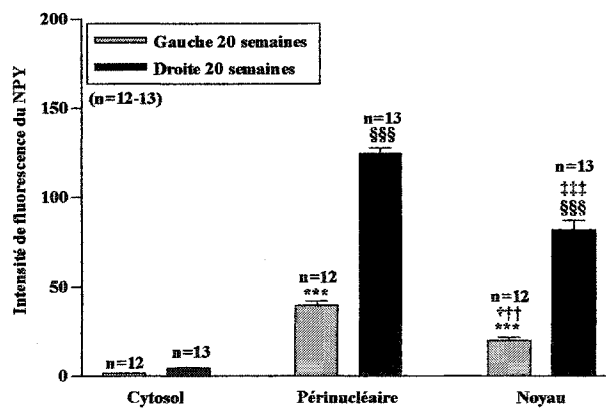
A)



B)



C)



($p < 0.001$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires. Cependant, il n'y a pas de différences significatives entre le noyau et la région périnucléaire dans ces cellules. Pour les CEEDs isolées à partir du cœur de même âge (17 semaines), l'intensité de fluorescence est de 4.1 ± 0.2 dans le cytosol, de 31.4 ± 2.7 dans la région périnucléaire, et de 28.8 ± 1.9 dans le noyau ($n=4$). Les différences sont hautement significatives ($p < 0.001$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires, mais il n'y a pas de différences significatives entre le noyau et la région périnucléaire dans ces cellules (Figure 21B).

Finalement, à l'âge fœtal de 20 semaines, la moyenne de l'intensité de fluorescence du FITC conjugué à l'anticorps du NPY pour les CEEGs est de 1.4 ± 0.9 dans le cytosol, de 39.6 ± 2.5 dans la région périnucléaire, et de 19.6 ± 1.8 dans le noyau ($n=12$). Nos études statistiques montrent que les différences sont hautement significatives ($p < 0.001$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires, et entre le noyau et la région périnucléaire. Pour les CEEDs de même âge fœtal (20 semaines), l'intensité de fluorescence est de 4.4 ± 0.2 dans le cytosol, de 124.8 ± 3.2 dans la région périnucléaire, et de 81.9 ± 5.5 dans le noyau ($n=13$). Les différences sont hautement significatives ($p < 0.001$) entre le cytosol et les régions nucléaires et périnucléaires et entre le noyau et la région périnucléaire (Figure 21C).

De plus, nos résultats montrent que la densité du NPY est différente entre les CEEGs et les CEEDs et ceci dans les trois compartiments cellulaires (cytosol, région périnucléaire et noyau) et ce autant à 13, 17 qu'à 20 semaines d'âge fœtal

(figure 22). Les histogrammes A, B et C de la figure 22 montrent la distribution respective du NPY dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau des CEEGs et des CEEDs des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines. Les valeurs exprimées en moyenne de l'intensité de fluorescence avec la comparaison statistique et le nombre d'expériences sont illustrées dans le tableau 5. L'histogramme D de la figure 22 montre la somme de l'intensité de fluorescence des trois compartiments cellulaires des CEEGs et des CEEDs à différents âges (13, 17 et 20 semaines). Les valeurs exprimées en moyenne de l'intensité de fluorescence avec la comparaison statistique et le nombre d'expériences sont résumées dans le tableau 6.

3.3. Effet de différentes concentrations de hNPY sur le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules endothéliales endocardiques fœtales humaines à différents stades de développement et de rats adultes.

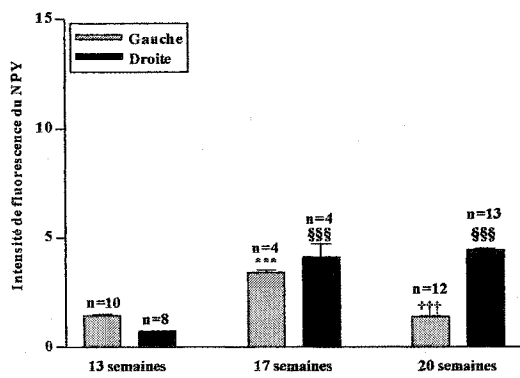
Dans cette série d'expériences, nous avons vérifié si l'ajout de différentes concentrations de hNPY extracellulaire module le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des cellules endothéliales endocardiques isolées à partir des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines et de rats adultes.

Figure 22 Densité relative du NPY dans les CEEGs et les CEEDs à différents stades du développement fœtal.

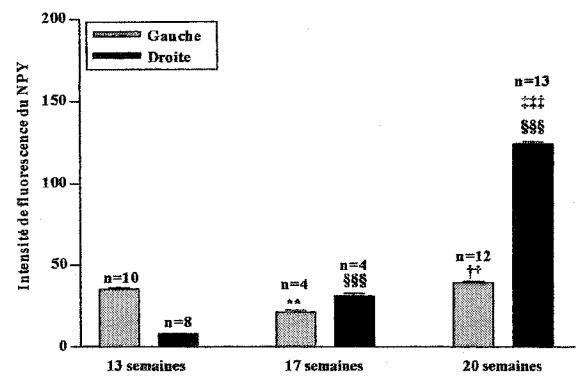
Les histogrammes A, B et C montrent les densités relatives du récepteur NPY dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau, respectivement des CEEGs et des CEEDs des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines. L'histogramme D montre la somme des densités relatives du NPY dans les trois compartiments cellulaires des CEEGs et de CEEDs des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne. (*) Comparaison 17 et 20 semaines vs 13 semaines au niveau des CEEGs (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), (†) comparaison 20 semaines vs 17 semaines au niveau des CEEGs (†† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$), (§) comparaison 17 et 20 semaines vs 13 semaines au niveau des CEEDs (§§§ $p < 0.001$), (‡) comparaison 20 semaines vs 17 semaines au niveau des CEEDs (‡‡‡ $p < 0.001$). «n» est le nombre d'expériences.

Distribution et densité relative du NPY dans les CEEGs et les CEEDs à différents stades du développement fœtal.

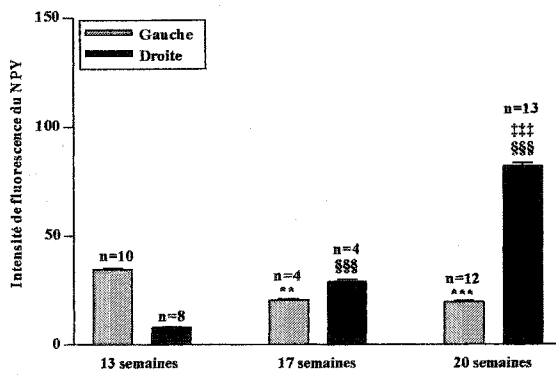
A) Cytosol



B) Région périnucléaire



C) Noyau



D) Somme

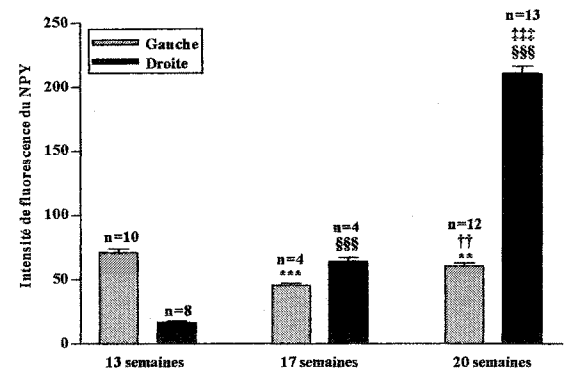


Tableau 5: Mesure de la densité du NPY dans les trois différents compartiments cellulaires des CEEGs et des CEEDs des cœurs fœtaux âgés de 13, 17 et 20 semaines.

	13 semaines	17 semaines	20 semaines
CEEGs (C)	1.4 ± 0.13 (n=10)	3.2 ± 0.2 (n=4) ***	1.4 ± 0.9 (n=12) ***
CEEDs (C)	0.7 ± 0.5 ††† (n=8)	4.1 ± 0.2 (n=4) *** †	4.4 ± 0.2 (n=13) *** †††
CEEGs (P)	35.4 ± 2.6 (n=10)	21.6 ± 1.6 (n=4) **	39.6 ± 2.5 (n=12) **
CEEDs (P)	8.02 ± 0.6 ††† (n=8)	31.4 ± 2.7 (n=4) *** †	124.8 ± 3.2 (n=13) *** †††
CEEGs (N)	34.4 ± 2.1 (n=10)	20.4 ± 1.1 (n=4) **	19.6 ± 1.8 (n=12) ***
CEEDs (N)	8.04 ± 0.5 ††† (n=8)	28.8 ± 1.9 (n=4) *** †	81.9 ± 5.5 (n=13) *** †††

C: Cytosol, P: Région périnucléaire, N: Noyau. Valeurs exprimées sous forme de moyenne ± erreur standard d'au moins trois expériences. (*) Comparaison horizontale, (*) 17 semaines vs 13 semaines, (*) 20 semaines vs 17 semaines et (*) 20 semaines vs 13 semaines, des trois compartiments cellulaires, des CEEDs ainsi que des CEEGs (**P<0.01, ***P<0.001). (†) Comparaison verticale d'un compartiment cellulaire des CEEDs vs le même compartiment de même âge fœtal des CEEGs (†P<0.05, †††P<0.001). «n» est le nombre d'expériences.

Tableau 6 : Mesure de la densité totale du NPY dans les CEEGs et les CEEDs à différents stades du développement foetal.

	13 semaines	17 semaines	20 semaines
CEEGs	71.3 ± 2.6 (n=10)	45.2 ± 1.6 (n=4) ***	60.5 ± 2.4 (n=12) **
CEEDs	16.7 ± 0.6 ††† (n=8)	64.3 ± 2.7 †† (n=4) ***	211.1 ± 5.5 ††† (n=13) ***

Valeurs exprimées sous forme de moyenne ± erreur standard d'au moins trois expériences. (*) Comparaison horizontale, (*) 17 semaines vs 13 semaines, (*) 20 semaines vs 17 semaines et (*) 20 semaines vs 13 semaines, des trois compartiments cellulaires, des CEEDs ainsi que des CEEGs (**P<0.01, ***P<0.001). (†) Comparaison verticale des CEEDs vs le même âge des CEEGs (††P<0.01, †††P<0.001). «n» est le nombre d'expériences.

3.3.1. Effet de concentrations croissantes de hNPY sur le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 13 semaines.

Dans cette série d'expériences, nous avons testé l'effet de concentrations croissantes de hNPY extracellulaire (10^{-17} à 10^{-5} M) sur le niveau calcique basal cytosolique et nucléaire des CEEGs et des CEEDs isolées à partir des cœurs fœtaux âgés de 13 semaines. La figure 23 illustre un exemple type pour chaque type cellulaire et la figure 24 montre la compilation des résultats.

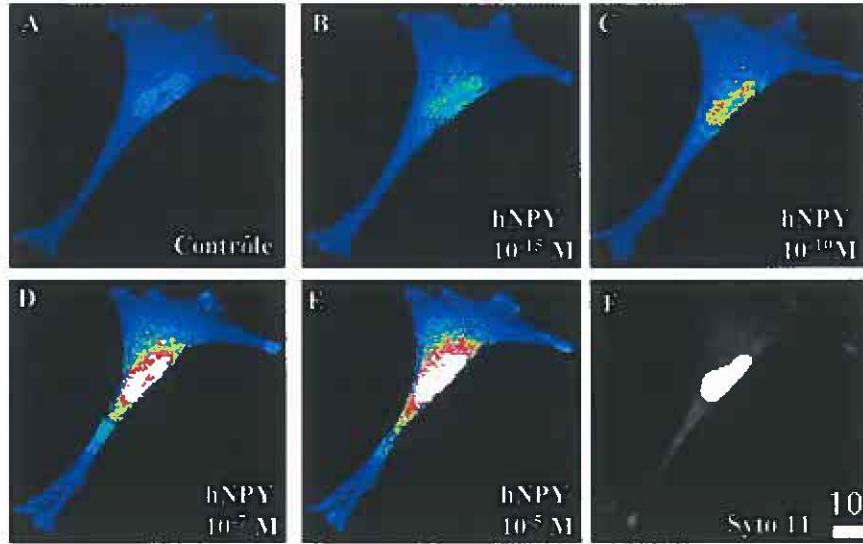
La figure 23 montre l'effet dose-dépendant du hNPY sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ d'une CEEG (A, B, C, D et E) et d'une CEED (G, H, I, J et K). Nous pouvons distinguer dans cette figure, la distribution calcique cytosolique et nucléaire au niveau contrôle et suite à la stimulation par le hNPY à des concentrations de 10^{-15} , 10^{-10} , 10^{-7} et 10^{-5} M. Au niveau contrôle et suite à l'ajout des différentes concentrations de hNPY, la concentration du Ca^{2+} libre est plus élevée au niveau du noyau par rapport au cytosol. À noter que l'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3- Ca^{2+} est indiquée selon une échelle en pseudo-couleur, où la couleur noire représente l'intensité zéro de la concentration du Ca^{2+} , alors que la couleur blanche représente l'intensité maximale. À la fin de chaque expérience, le noyau des cellules est marqué par la sonde des acides nucléiques, le syto-11, (figures 23F et 23L) afin de déterminer l'attribution de la réponse calcique au

Figure 23 Expérience représentative de l'effet de différentes concentrations du hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des coeurs foetaux humains âgés de 13 semaines étudié en microscopie confocale.

(A) La distribution et l'intensité de fluorescence basale cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en absence du hNPY dans une CEEGs du cœur foetal humain âgé de 13 semaines. (B, C, D et E) La distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en présence de différentes concentrations de hNPY i.e 10^{-15} , 10^{-10} , 10^{-7} et 10^{-5} M, respectivement. (F) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. (G) La distribution et l'intensité de fluorescence basale cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en absence du hNPY dans une CEEDs du cœur foetal humain âgé de 13 semaines. (H, I, J et K) La distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en présence de différentes concentrations de hNPY i.e 10^{-15} , 10^{-10} , 10^{-7} et 10^{-5} M, respectivement. (L) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudo-couleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} de 0 à 255. Les couleurs des panneaux F et L n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

13 Semaines

CEEGs



CEEDs

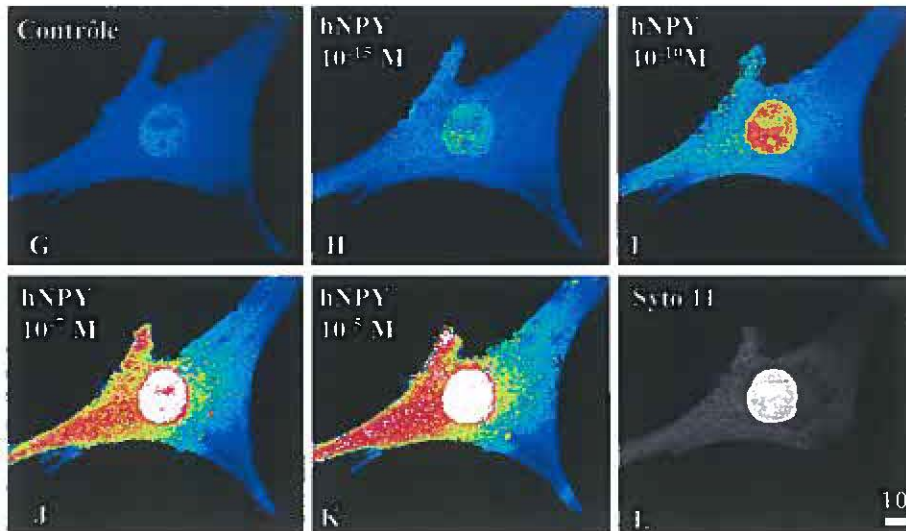
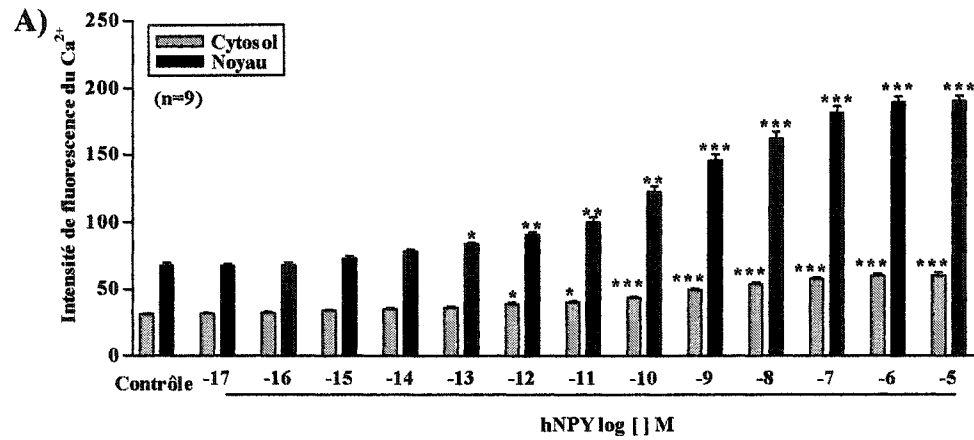


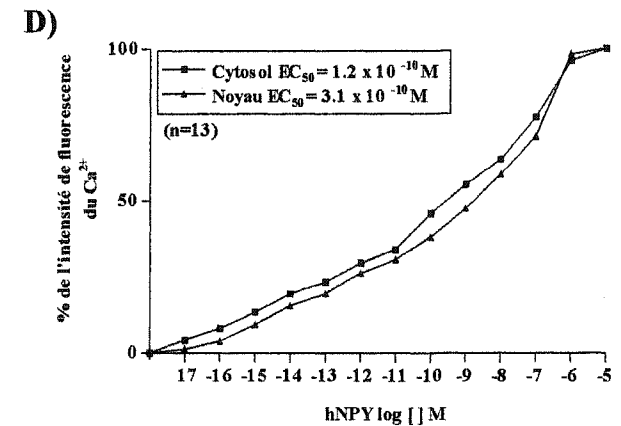
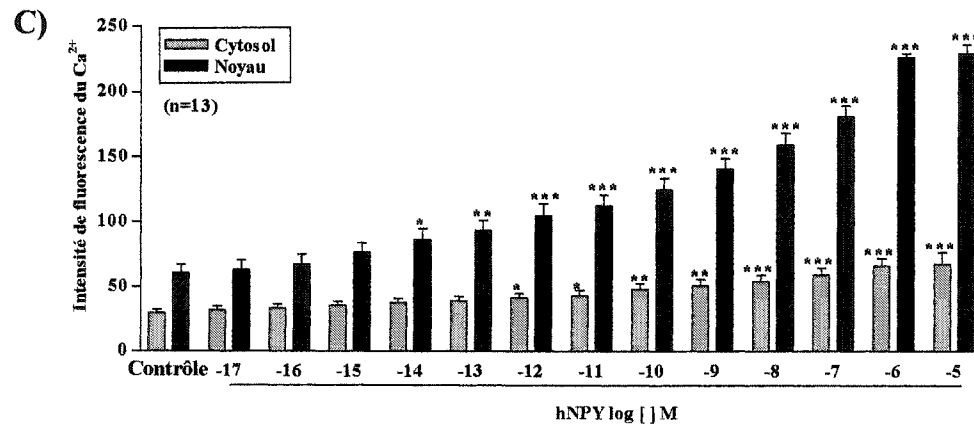
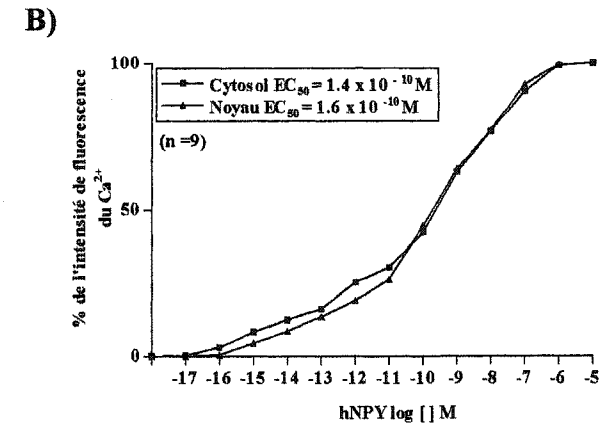
Figure 24 Effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13 semaines.

Dans les panneaux A et B, le hNPY à des concentrations entre 10^{-17} M et 10^{-5} M induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ libre dans les CEEGs du cœur fœtal humain âgé de 13 semaines. (A) Une augmentation significative du niveau $[Ca]_c$ est obtenue à une concentration de 10^{-13} M. À partir d'une concentration de 10^{-12} M, l'augmentation devient significative dans le cytosol et le noyau. L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ libre atteint un maximum à une concentration de 10^{-5} M de hNPY. (B) Les valeurs de EC_{50} sont de 1.4×10^{-10} M pour le cytosol et de 1.6×10^{-10} M pour le noyau. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 9 expériences. Dans les panneaux C et D, le hNPY à des concentrations entre 10^{-17} M et 10^{-5} M induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ libre dans les CEEDs du cœur fœtal humain âgé de 13 semaines. (C) Une augmentation significative du niveau $[Ca]_n$ est obtenue à des concentrations de 10^{-14} M et 10^{-13} M. À partir d'une concentration de 10^{-12} M, l'augmentation devient significative dans le cytosol et le noyau. L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ libre atteint un maximum à une concentration de 10^{-5} M de hNPY. (D) Les valeurs de EC_{50} sont de 1.2×10^{-10} M pour le cytosol et de 3.1×10^{-10} M pour le noyau. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 13 expériences. «n» est le nombre d'expériences. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Effet de concentrations croissantes de hNPY sur le niveau du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs du cœur foetal âgé de 13 semaines (A, C)



Courbe dose-réponse de l'effet du hNPY sur le niveau calcique des CEEGs et des CEEDs du cœur foetal âgé de 13 semaines (B, D)



niveau nucléaire. De plus, ce marquage permet par la suite d'analyser l'intensité de la fluorescence calcique libre à l'intérieur du noyau.

À noter que, les mesures d'intensité de fluorescence du complexe Fluo 3- Ca^{2+} sont obtenues grâce à l'analyse de la distribution tridimensionnelle effectuée à partir d'images optiques sériées générées par la microscopie confocale.

Les figures 24A et 24C montrent la compilation des résultats obtenus en microscopie confocale de l'effet des doses croissantes de hNPY extracellulaire sur les niveaux calciques cytosolique et nucléaire dans les CEEGs (figure 24A) et les CEEDs (figure 24C) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13 semaines. Les figures 24B et 24D montrent les courbes dose-réponse de l'effet du hNPY sur le calcium cytosolique et nucléaire dans les CEEGs (figure 24B) et les CEEDs (figure 24D) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13 semaines. Comme nous pouvons remarquer sur la figure 24A, l'intensité de fluorescence du Ca^{2+} libre nucléaire basal en absence de hNPY (67.5 ± 4.9 ; $n=9$) est supérieure à celle du calcium libre cytosolique (31.3 ± 1.5 ; $n=9$). Cette différence est maintenue en présence de toutes les concentrations de hNPY utilisées. Des concentrations de hNPY de 10^{-17} M et 10^{-16} M n'affectent presque pas les niveaux du $[\text{Ca}]_c$ et du $[\text{Ca}]_n$. Des concentrations de 10^{-15} M et de 10^{-14} M de hNPY induisent une légère augmentation du $[\text{Ca}]_c$ et $[\text{Ca}]_n$ mais qui n'est pas encore significative par rapport au contrôle (au niveau du cytosol à 10^{-15} M: 33.7 ± 2.6 ; au niveau du noyau à 10^{-15} M: 72.9 ± 3.7 ; cytosol à 10^{-14} M: 34.8 ± 2.1 ; au niveau du noyau à 10^{-14} M: 78.1 ± 2.9 ; $n=9$). Une concentration de 10^{-13} M de hNPY induit une augmentation

significative du $[Ca]_n$ (84.0 ± 2.5 ; $p < 0.05$) mais pas du $[Ca]_c$ (35.9 ± 2.3); $n=9$. Une concentration de 10^{-12} M de hNPY induit une augmentation significative du calcium à la fois dans le cytosol et dans le noyau (38.6 ± 2.5 ; $p < 0.05$ et 90.9 ± 4.0 ; $p < 0.01$; respectivement). De plus, une concentration de 10^{-11} M de hNPY induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ (40.0 ± 2.3 ; $p < 0.05$) et $[Ca]_n$ (99.7 ± 7.2 ; $p < 0.01$); $n=9$. L'ajout du hNPY à une concentration de 10^{-10} M induit une augmentation hautement significative du $[Ca]_c$ (43.5 ± 1.9 ; $p < 0.001$) et significative du $[Ca]_n$ (122.1 ± 13.5 ; $p < 0.01$); $n=9$. À partir d'une concentration de 10^{-9} M de hNPY, l'augmentation du $[Ca]_i$ devient hautement significative ($p < 0.001$) dans le cytosol et dans le noyau. L'effet maximal est observé à une concentration de 10^{-5} M de hNPY où l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ est de 60.2 ± 5.1 et du $[Ca]_n$ est de 190.1 ± 10.7 ; $n=9$.

La figure 24C montre l'effet des doses croissantes de hNPY sur les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13 semaines. L'intensité de fluorescence du Ca^{2+} libre nucléaire basal en absence de hNPY est de 29.8 ± 2.5 ($n=13$) dans le cytosol et de 60.4 ± 6.2 ($n=13$) dans le noyau. Des concentrations de 10^{-16} M et de 10^{-15} M de hNPY, induisent une légère augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ mais qui n'est pas encore significative par rapport au contrôle (au niveau du cytosol à 10^{-16} M: 32.7 ± 3.3 ; au niveau du noyau à 10^{-16} M: 66.8 ± 7.9 ; au niveau du cytosol à 10^{-15} M: 34.6 ± 3.4 ; au niveau du noyau à 10^{-15} M: 75.9 ± 7.8 ; $n=13$). Des concentrations de hNPY de 10^{-14} M et 10^{-13} M induisent des augmentations significatives du $[Ca]_n$

(au niveau du noyau à 10^{-14} M: 86.4 ± 7.9 ; $p < 0.05$; au niveau du noyau à 10^{-13} M: 93.0 ± 8.1 ; $p < 0.01$) mais pas du $[Ca]_c$ (au niveau du cytosol à 10^{-14} M: 36.9 ± 3.4 ; au niveau du cytosol à 10^{-13} M: 38.3 ± 3.4); $n=13$. Une concentration de hNPY de 10^{-12} M induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ (40.7 ± 3.8 ; $p < 0.05$) et hautement significative du $[Ca]_n$ (104.3 ± 9.2 ; $p < 0.001$); $n=13$. De même, une concentration de hNPY de 10^{-11} M induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ (42.4 ± 4.3 ; $p < 0.05$) et hautement significative du $[Ca]_n$ (111.9 ± 8.4 ; $p < 0.001$); $n=13$. Des concentrations de hNPY de 10^{-10} M et 10^{-9} M, induisent des augmentations significatives du $[Ca]_c$ (au niveau du cytosol à 10^{-10} M: 47.1 ± 4.7 ; $p < 0.01$; au niveau du cytosol à 10^{-9} M: 50.2 ± 4.9 ; $p < 0.01$) et hautement significative du $[Ca]_n$ (au niveau du noyau à 10^{-10} M: 124.1 ± 8.4 ; $p < 0.001$; au niveau du noyau à 10^{-9} M: 140.1 ± 8.0 ; $p < 0.001$); $n=13$. À partir d'une concentration de 10^{-8} M, l'augmentation du $[Ca]_i$ devient hautement significative ($p < 0.001$) dans le cytosol et dans le noyau. L'effet maximal est observé à une concentration de 10^{-5} M de hNPY où l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ est de 66.8 ± 8.5 et du $[Ca]_n$ est de 228.3 ± 7.7 ; $n=13$.

Les figures 24B et 24D montrent les courbes dose-réponses de l'effet du NPY sur le Ca^{2+} cytosolique et nucléaire des CEEGs (figure 24B) et des CEEDs (figure 24D) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13 semaines. Comme nous pouvons remarquer, des concentrations de 10^{-17} M à 10^{-5} M de hNPY induisent des augmentations dose-dépendantes du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Dans les CEEGs l' EC_{50} est de 1.4×10^{-10} M pour le cytosol et de 1.6×10^{-10} M pour le noyau ($n=9$),

alors que, dans les CEEDs l' EC_{50} est de 1.2×10^{-10} M pour le cytosol et de 3.1×10^{-10} M pour le noyau ($n=13$) (voir tableau 7).

En conclusion, ces résultats montrent que le hNPY induit une augmentation du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ d'une façon concentration-dépendante dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13 semaines avec des EC_{50} de l'ordre de 10^{-10} M dans les CEEGs et les CEEDs. De plus, nos résultats démontrent que les EC_{50} au niveau cytosolique sont similaires à ceux obtenus au niveau nucléaire, ceci suggère que l'augmentation calcique nucléaire induite par le hNPY est due à l'augmentation du calcium cytosolique.

3.3.2. Effet de concentrations croissantes de hNPY sur le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 17 semaines.

Dans cette série d'expériences, nous avons testé l'effet de concentrations croissantes de hNPY extracellulaire (10^{-16} à 10^{-5} M) sur le niveau calcique basal cytosolique et nucléaire des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 17 semaines. La figure 25 illustre un exemple typique pour chaque type cellulaire et la figure 26 montre la compilation des résultats.

La figure 25 montre l'effet dose-dépendant du hNPY sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ d'une CEEG (A, B, C, D et E) et d'une CEED (G, H, I, J et K). Nous pouvons distinguer dans cette figure, la distribution calcique cytosolique et nucléaire au

Tableau 7 : EC₅₀ du hNPY modulant le calcium cytosolique et nucléaire des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines ainsi que de rats adultes.

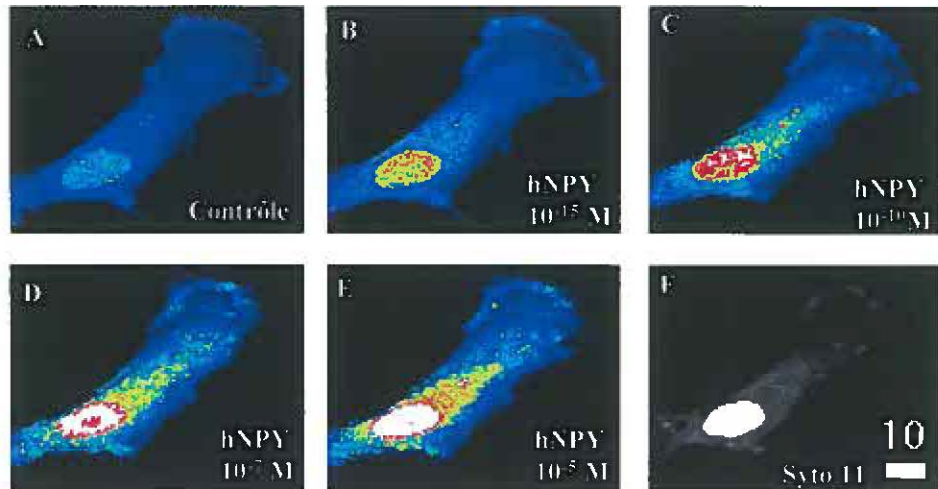
Âge	CEEGs		CEEDs	
	EC ₅₀		EC ₅₀	
	Cytosol	Noyau	Cytosol	Noyau
13 semaines	1.4x10 ⁻¹⁰ M	1.6x10 ⁻¹⁰ M	1.2x10 ⁻¹⁰ M	3.1x10 ⁻¹⁰ M
17 semaines	3.8x10 ⁻¹⁰ M	3.0x10 ⁻¹⁰ M	1.8x10 ⁻¹⁰ M	1.1x10 ⁻¹⁰ M
20 semaines	3.6x10 ⁻¹¹ M	5.8x10 ⁻¹¹ M	1.1x10 ⁻¹⁰ M	2.4x10 ⁻¹⁰ M
Rat adulte	2.3x10 ⁻¹¹ M	5.9x10 ⁻¹¹ M	1.0x10 ⁻¹⁰ M	1.7x10 ⁻¹⁰ M

Figure 25 Expérience représentative de l'effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 17 semaines étudié en microscopie confocale.

(A) La distribution et l'intensité de fluorescence basale cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en absence du hNPY dans une CEEG du cœur fœtal humain âgé de 17 semaines. (B, C, D et E) La distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en présence de différentes concentrations de hNPY i.e 10^{-15} , 10^{-10} , 10^{-7} et 10^{-5} M, respectivement. (F) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. (G) La distribution et l'intensité de fluorescence basale cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en absence du hNPY dans deux CEEDs du cœur fœtal humain âgé de 17 semaines. (H, I, J et K) La distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en présence de différentes concentrations de hNPY i.e 10^{-15} , 10^{-10} , 10^{-7} et 10^{-5} M, respectivement. (L) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudo-couleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} de 0 à 255. Les couleurs des panneaux F et L n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

17 Semaines

CEEGs



CEEDs

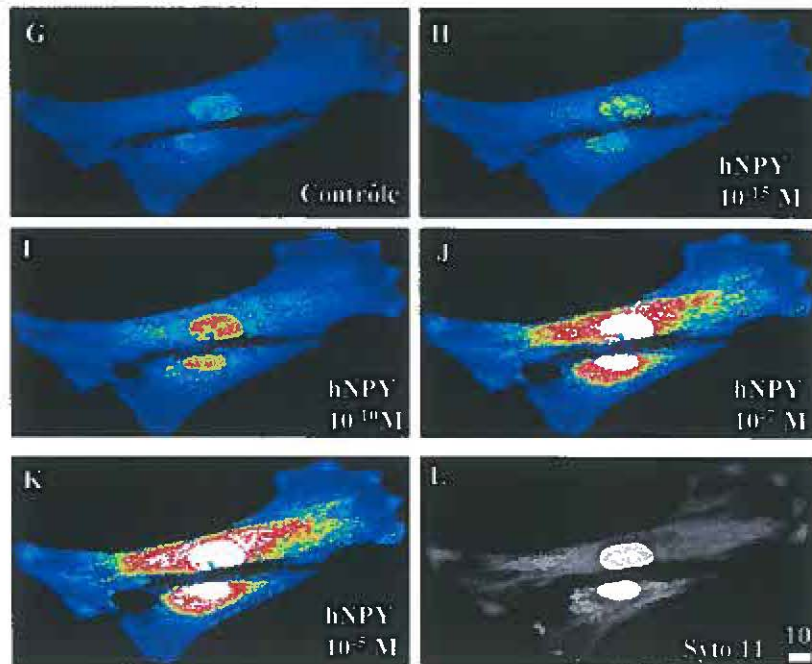
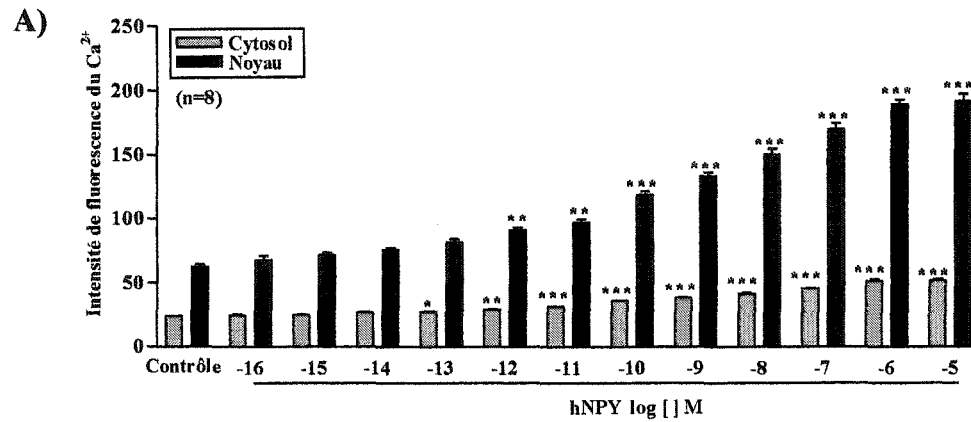


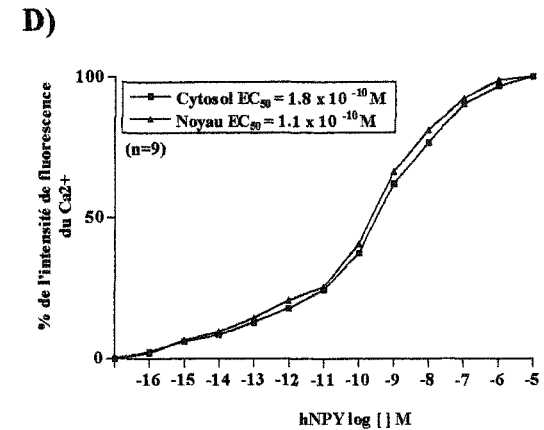
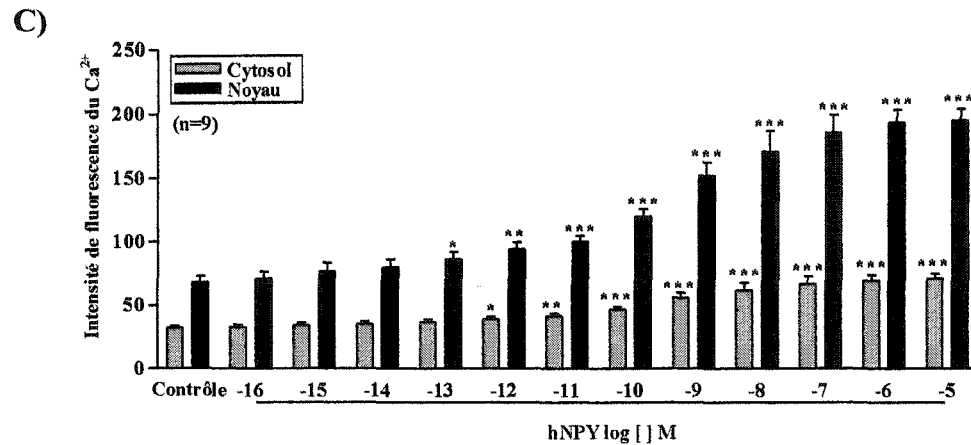
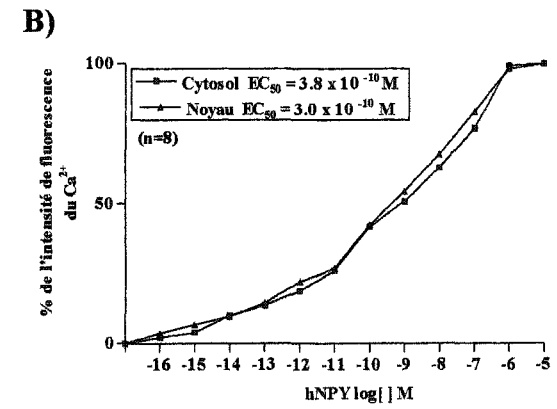
Figure 26 Effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 17 semaines.

Dans les panneaux A et B, le hNPY à des concentrations entre 10^{-16} M et 10^{-5} M induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ libre dans les CEEGs du cœur fœtal humain âgé de 17 semaines. (A) Une augmentation significative du niveau $[Ca]_c$ est obtenue à une concentration de 10^{-13} M. À partir d'une concentration de 10^{-12} M, l'augmentation devient significative dans le cytosol et le noyau. L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ libre atteint un maximum à une concentration de 10^{-5} M de hNPY. (B): Les valeurs de EC_{50} sont de 3.8×10^{-10} M pour le cytosol et de 3.0×10^{-10} M pour le noyau. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 8 expériences. Dans les panneaux C et D, le hNPY à des concentrations entre 10^{-16} M et 10^{-5} M induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ libre dans les CEEDs du cœur fœtal humain âgé de 17 semaines. (C) Une augmentation significative du niveau $[Ca]_n$ est obtenue à une concentration de 10^{-13} M. À partir d'une concentration de 10^{-12} M, l'augmentation devient significative dans le cytosol et le noyau. L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ libre atteint un maximum à une concentration de 10^{-5} M de hNPY. D: Les valeurs de EC_{50} sont de 1.8×10^{-10} M pour le cytosol et de 1.1×10^{-10} M pour le noyau. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 9 expériences. «n» est le nombre d'expériences. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

Effet de concentrations croissantes de hNPY sur le niveau du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs du cœur fœtal âgé de 17 semaines (A, C)



Courbe dose-réponse de l'effet du hNPY sur le niveau calcique des CEEGs et des CEEDs du cœur fœtal âgé de 17 semaines (B, D)



niveau contrôle et suite à la stimulation par le hNPY à des concentrations de 10^{-15} , 10^{-10} , 10^{-7} et 10^{-5} M. Au niveau contrôle et suite à l'ajout des différentes concentrations de hNPY, la concentration du Ca^{2+} est plus élevée au niveau du noyau par rapport au cytosol. À la fin de chaque expérience, le noyau des cellules était marqué par la sonde des acides nucléiques, le syto-11, (figures 25F et 25L).

Les figures 26A et 26C montrent l'effet des doses croissantes de hNPY extracellulaire sur les niveaux calciques cytosolique et nucléaire dans les CEEGs (figure 26A) et les CEEDs (figure 26C) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 17 semaines tel qu'obtenus en microscopie confocale. Les figures 26B et 26D montrent les courbes dose-réponse de l'effet du hNPY sur le calcium cytosolique et nucléaire dans les CEEGs (figure 26B) et les CEEDs (figure 26D) du cœur âgé de 17 semaines. Comme nous pouvons remarquer sur le panneau A de la figure 26, l'intensité de fluorescence du Ca^{2+} libre nucléaire basal en absence de hNPY (62.4 ± 6.1 ; $n=8$) est supérieure à celle du calcium libre cytosolique (24.1 ± 0.7 ; $n=8$). Cette différence est maintenue avec toutes les concentrations de hNPY utilisées. Le hNPY à une concentration de 10^{-16} M n'affecte presque pas les niveaux du $[\text{Ca}]_c$ et $[\text{Ca}]_n$. À des concentrations de 10^{-15} M et de 10^{-14} M de hNPY, nous observons une légère augmentation du $[\text{Ca}]_c$ et $[\text{Ca}]_n$ mais qui n'est pas encore significative par rapport au contrôle (au niveau du cytosol à 10^{-15} M: 25.2 ± 1.1 ; au niveau du noyau à 10^{-15} M: 71.5 ± 6.0 ; au niveau du cytosol à 10^{-14} M: 26.9 ± 1.1 ; au niveau du noyau à 10^{-14} M: 75.3 ± 5.7 ; $n=8$). Une concentration de 10^{-13} M de hNPY induit une augmentation significative du $[\text{Ca}]_c$ (27.9 ± 1.2 ;

$p < 0.05$) mais pas du $[Ca]_n$ (81.3 ± 7.5); $n=8$. Une concentration de 10^{-12} M de hNPY induit une augmentation significative du calcium à la fois dans le cytosol et dans le noyau (29.2 ± 1.3 ; et 91.1 ± 6.1 , respectivement, $p < 0.01$). Une concentration de 10^{-11} M de hNPY induit une augmentation hautement significative du $[Ca]_c$ (31.3 ± 1.1 ; $p < 0.001$) et significative du $[Ca]_n$ (97.2 ± 6.4 ; $p < 0.01$); $n=8$. À partir d'une concentration de 10^{-10} M, l'augmentation du $[Ca]_i$ devient hautement significative ($p < 0.001$) dans le cytosol et dans le noyau. L'effet maximal est observé à une concentration de 10^{-5} M de hNPY où l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ est de 51.5 ± 2.1 et du $[Ca]_n$ est de 192.2 ± 12.8 , $n=8$.

La figure 26C montre l'effet des doses croissantes de hNPY sur les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires des CEEDs isolées des cœurs foetaux humains âgés de 17 semaines. L'intensité de fluorescence du Ca^{2+} libre nucléaire basal en absence de hNPY est de 31.9 ± 1.9 ; ($n=9$) dans le cytosol et de 67.8 ± 4.8 ($n=9$) dans le noyau. Des concentrations de 10^{-15} M et de 10^{-14} M de hNPY, induisent une légère augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ mais qui n'est pas encore significative par rapport au contrôle (au niveau du cytosol à 10^{-15} M: 34.2 ± 2.1 ; au niveau du noyau à 10^{-15} M: 76.1 ± 7.1 ; au niveau du cytosol à 10^{-14} M: 35.1 ± 2.0 ; au niveau du noyau à 10^{-14} M: 79.8 ± 6.2 ; $n=9$). Une concentration de 10^{-13} M de hNPY induit une augmentation significative du $[Ca]_n$ (85.9 ± 5.8 ; $p < 0.05$) mais pas du $[Ca]_c$ (36.7 ± 2.1); $n=9$. Une concentration de 10^{-12} M de hNPY induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ ($38.7.7 \pm 2.1$; $p < 0.05$) et du $[Ca]_n$ (93.9 ± 5.6 ; $p < 0.01$) $n=9$. À une concentration de 10^{-11} M de hNPY, l'augmentation devient

hautement significative au niveau nucléaire (100.0 ± 4.5 ; $p < 0.001$) et significative au niveau cytosolique (41.2 ± 2.2 ; $p < 0.01$); $n=9$. À partir d'une concentration de 10^{-10} M, l'augmentation du $[Ca]_i$ devient hautement significative ($p < 0.001$) dans le cytosol et dans le noyau. L'effet maximal est observé à une concentration de 10^{-5} M de hNPY où l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ est de 70.1 ± 3.9 et du $[Ca]_n$ est de 194.3 ± 9.2 ; $n=9$.

Les figures 26B et 26D montrent les courbes dose-réponses de l'effet du hNPY sur le Ca^{2+} cytosolique et nucléaire des CEEGs (figure 26B) et des CEEDs (figure 26D) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 17 semaines. Comme nous pouvons remarquer, des concentrations de 10^{-16} M à 10^{-5} M de hNPY induisent des augmentations dose-dépendantes du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Dans les CEEGs, l' EC_{50} est de 3.8×10^{-10} M au niveau du cytosol et de 3.0×10^{-10} M au niveau du noyau ($n=8$), alors que, dans les CEEDs, l' EC_{50} est de 1.8×10^{-10} M pour le cytosol et de 1.1×10^{-10} M pour le noyau ($n=9$) (voir tableau 7).

En conclusion, ces résultats montrent que le hNPY induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ d'une façon concentration-dépendante dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 17 semaines avec des EC_{50} de l'ordre de 10^{-10} M dans les CEEGs et les CEEDs. De plus, nos résultats démontrent que les EC_{50} au niveau cytosolique sont similaires à ceux obtenus au niveau nucléaire. Ceci suggère que l'augmentation calcique nucléaire induite par le hNPY est due à l'augmentation du calcium cytosolique.

3.3.3. Effet de concentrations croissantes de hNPY sur le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines et de rats adultes.

Dans cette série d'expériences, nous avons testé l'effet de concentrations croissantes de hNPY extracellulaire (10^{-17} à 10^{-5} M) sur le niveau calcique basal cytosolique et nucléaire des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines et de rats adultes.

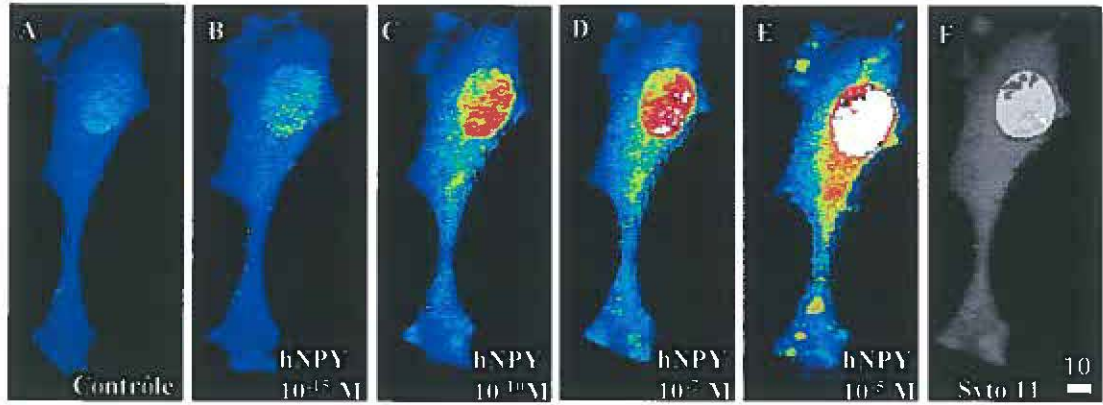
La figure 27 montre l'effet de doses croissantes de hNPY sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ d'une CEEG (A, B, C, D et E) et d'une CEED (G, H, I, J et K) du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. Nous pouvons distinguer dans cette figure, la distribution calcique cytosolique et nucléaire au niveau contrôle et suite à la stimulation par le hNPY à des concentrations de 10^{-15} , 10^{-10} , 10^{-7} et 10^{-5} M, respectivement. Au niveau contrôle et suite à l'ajout des différentes concentrations de hNPY, la concentration du Ca^{2+} est plus élevée au niveau du noyau par rapport au cytosol. À la fin de chaque expérience, le noyau des cellules est marqué par la sonde des acides nucléiques, le syto-11, (figures 27F et 27L).

Figure 27 Expérience représentative de l'effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines étudiées en microscopie confocale.

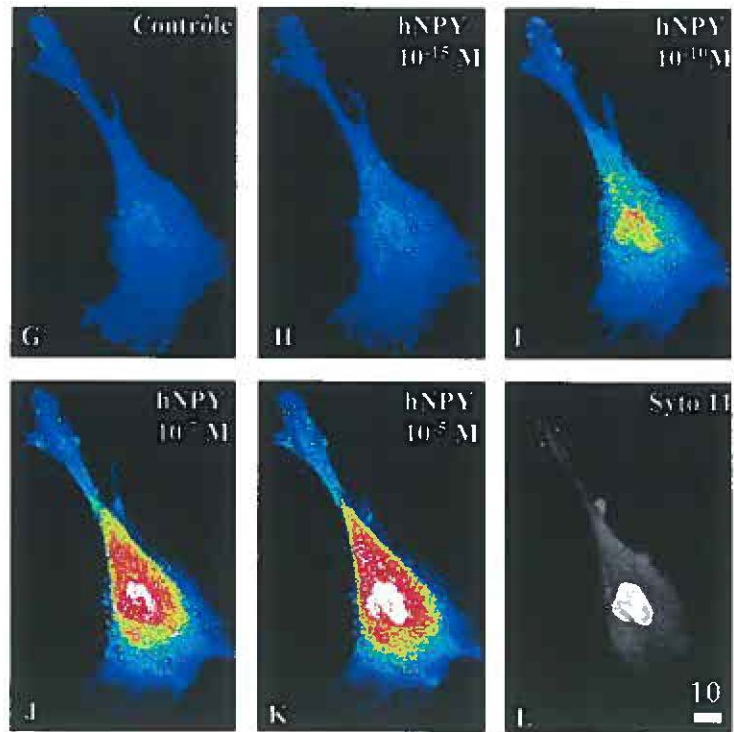
(A) La distribution et l'intensité de fluorescence basale cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en absence du hNPY dans une CEEG du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. (B, C, D et E) La distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en présence de différentes concentrations de hNPY i.e 10^{-15} , 10^{-10} , 10^{-7} et 10^{-5} M, respectivement. (F) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. (G) La distribution et l'intensité de fluorescence basale cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en absence du hNPY dans une CEED du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. (H, I, J et K) La distribution et l'intensité de fluorescence cytosolique et nucléaire du complexe Fluo-3- Ca^{2+} en présence de différentes concentrations de hNPY i.e 10^{-15} , 10^{-10} , 10^{-7} et 10^{-5} M, respectivement. (L) Délimitation du noyau à la fin de l'expérience à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudo-couleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} de 0 à 255. Les couleurs des panneaux F et L n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

20 Semaines

CEEGs



CEEDs

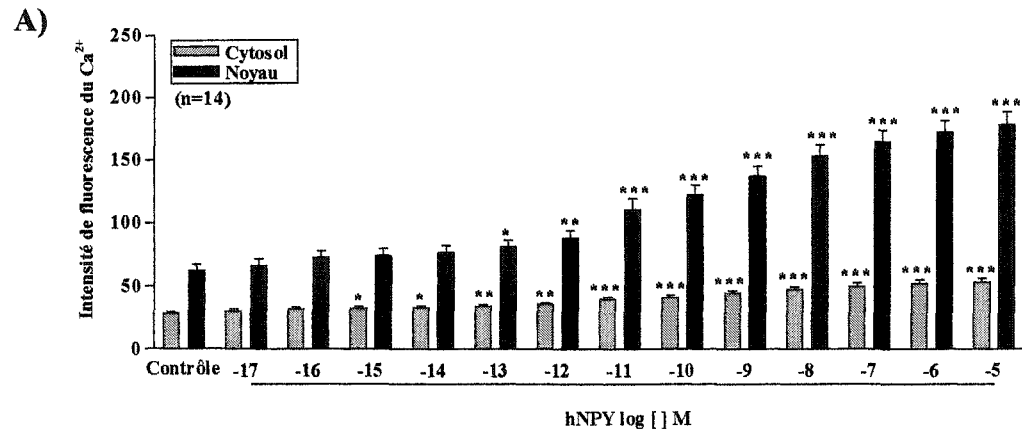


Les panneaux A et C de la figure 28 montrent l'effet des doses croissantes de hNPY sur les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires dans les CEEGs (figure 28A) et les CEEDs (figure 28C) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines tel qu'obtenus en microscopie confocale. Les panneaux B et D de la figure 28 montrent les courbes dose-réponses de l'effet de hNPY sur le calcium cytosolique et nucléaire dans les CEEGs (figure 28B) et les CEEDs (figure 28D) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Comme nous pouvons remarquer sur la figure 28A, l'intensité de fluorescence du Ca^{2+} libre nucléaire basal en absence de hNPY (62.1 ± 5.3 ; $n=14$) est supérieure à celle du calcium libre cytosolique (28.5 ± 1.2 ; $n=14$). Cette différence est maintenue en présence de toutes les concentrations de hNPY utilisées. À des concentrations très faibles de hNPY de l'ordre de 10^{-17} M et de 10^{-16} M, nous observons une légère augmentation du $[\text{Ca}]_c$ et du $[\text{Ca}]_n$ mais qui n'est pas encore significative par rapport au contrôle (au niveau du cytosol à 10^{-17} M: 30.3 ± 1.3 ; au niveau du noyau à 10^{-17} M: 66.3 ± 5.2 ; au niveau du cytosol à 10^{-16} M: 31.6 ± 1.2 ; au niveau du noyau à 10^{-16} M: 72.8 ± 5.5 ; $n=14$). Des concentrations de 10^{-15} M et 10^{-14} M de hNPY induisent une augmentation significative du $[\text{Ca}]_c$ (au niveau du cytosol à 10^{-15} M: 32.4 ± 1.4 ; $p<0.05$; au niveau du cytosol à 10^{-14} M: 32.7 ± 1.3 ; $p<0.05$) mais pas du $[\text{Ca}]_n$ (au niveau du noyau à 10^{-15} M: 74.5 ± 5.6 ; au niveau du noyau à 10^{-14} M: 77.1 ± 5.6); $n=14$. Une concentration de 10^{-13} M de hNPY induit une augmentation significative du calcium à la fois dans le cytosol et dans le noyau

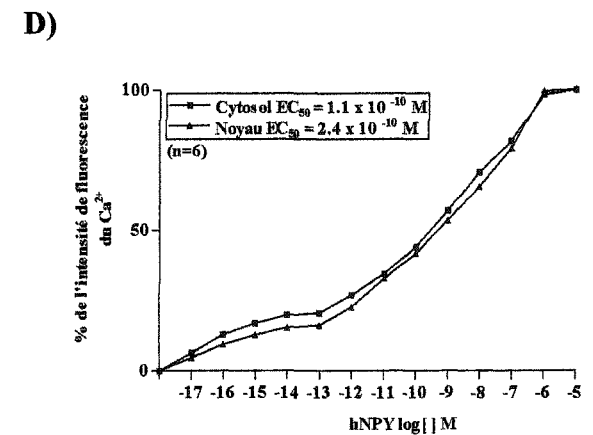
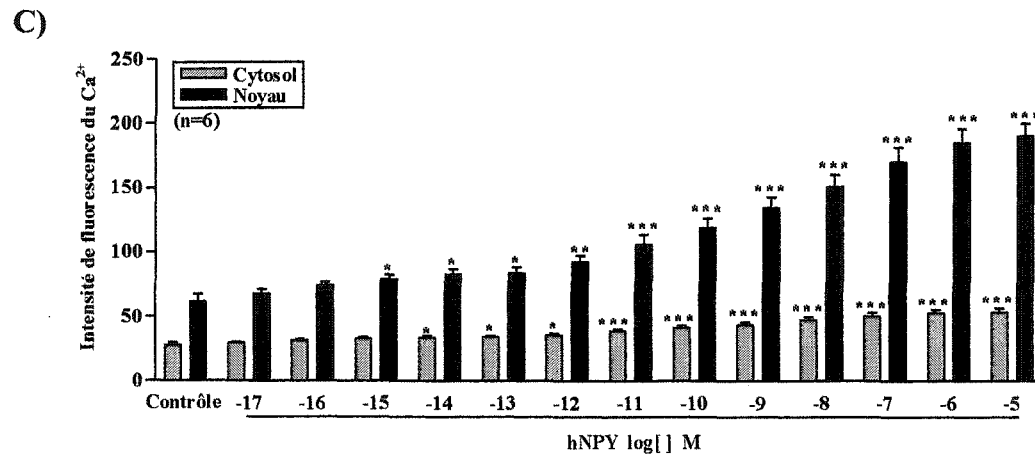
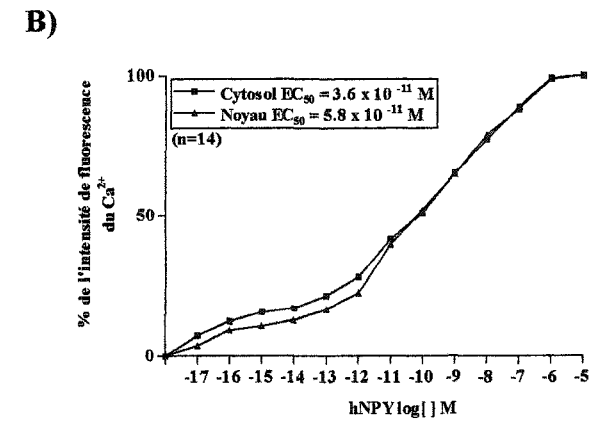
Figure 28 Effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Dans les panneaux A et B, le hNPY à des concentrations entre 10^{-17} M et 10^{-5} M induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ libre dans les CEEGs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. (A) Une augmentation significative du niveau $[Ca]_c$ est obtenue à des concentrations de 10^{-15} M et 10^{-14} M. À partir d'une concentration de 10^{-13} M, l'augmentation devient significative dans le cytosol et le noyau. L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ libre atteint un maximum à une concentration de 10^{-5} M de hNPY. (B) Les valeurs de EC_{50} sont de 3.6×10^{-11} M pour le cytosol et de 5.8×10^{-11} M pour le noyau. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 14 expériences. Dans les panneaux C et D, le hNPY à des concentrations entre 10^{-17} M et 10^{-5} M induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ libre dans les CEEDs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. (C) Une augmentation significative du niveau $[Ca]_n$ est obtenue à des concentrations de 10^{-15} M et 10^{-14} M. À partir d'une concentration de 10^{-13} M, l'augmentation devient significative dans le cytosol et le noyau. L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ libre atteint un maximum à une concentration de 10^{-5} M de hNPY. (D) Les valeurs de EC_{50} sont de 1.1×10^{-10} M pour le cytosol et de 2.4×10^{-10} M pour le noyau. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne de 6 expériences. «n» est le nombre d'expériences. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Effet de concentrations croissantes de hNPY sur le niveau du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs du cœur fœtal âgé de 20 semaines (A, C)



Courbe dose-réponse de l'effet du hNPY sur le niveau calcique des CEEGs et des CEEDs du cœur fœtal âgé de 20 semaines (B, D)



(33.8 ± 1.3 ; $p < 0.01$ et 81.4 ± 5.5 ; $p < 0.05$; respectivement). De même, une concentration de 10^{-12} M de hNPY induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ (35.5 ± 1.4 ; $p < 0.01$, 88.2 ± 6.2 ; $p < 0.01$ respectivement); $n=14$. À partir d'une concentration de 10^{-11} M, l'augmentation du $[Ca]_i$ devient hautement significative ($p < 0.001$) dans le cytosol et dans le noyau. L'effet maximal est observé à une concentration de 10^{-5} M de hNPY où l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ est de 53.4 ± 3.0 et du $[Ca]_n$ est de 178.6 ± 10.6 ; $n=14$.

La figure 28C montre l'effet des doses croissantes de hNPY sur les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. L'intensité de fluorescence du Ca^{2+} libre nucléaire basal en absence de hNPY est de 28.2 ± 1.6 ; ($n=6$) dans le cytosol et de 61.4 ± 5.9 ($n=6$) dans le noyau. Des faibles concentrations de hNPY (10^{-17} M et de 10^{-16} M) induisent de légères augmentations du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ mais qui ne sont pas encore significatives par rapport au niveau contrôle (au niveau du cytosol à 10^{-17} M: 29.9 ± 0.7 ; au niveau du noyau à 10^{-17} M: 67.8 ± 3.7 ; au niveau du cytosol à 10^{-16} M: 31.7 ± 0.6 ; au niveau du noyau 10^{-16} M: 74.3 ± 2.6 ; $n=6$). Une concentration de 10^{-15} M de hNPY induit une augmentation significative du $[Ca]_n$ (78.8 ± 3.8 ; $p < 0.05$) mais pas du $[Ca]_c$ (32.7 ± 1.2); $n=6$. Des concentrations de 10^{-14} M, 10^{-13} M et 10^{-12} M de hNPY induisent des augmentations significatives du $[Ca]_c$ (à 10^{-14} M: 33.6 ± 1.5 ; $p < 0.05$; à 10^{-13} M: 33.8 ± 1.6 ; $p < 0.05$; à 10^{-12} M: 35.5 ± 1.7 ; $p < 0.05$, respectivement) et du $[Ca]_n$ (à 10^{-14} M: 82.4 ± 4.7 ; $p < 0.05$; à 10^{-13} M: 83.5 ± 5.0 ; $p < 0.05$; à 10^{-12} M: 92.4 ± 5.2 ; $p < 0.01$, respectivement) $n=6$.

À partir d'une concentration de 10^{-11} M, l'augmentation du $[Ca]_i$ devient hautement significative ($p < 0.001$) dans le cytosol et dans le noyau. L'effet maximal est observé à une concentration de 10^{-5} M de hNPY où l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ est de 53.3 ± 3.0 et du $[Ca]_n$ est de 190.2 ± 9.4 ; $n=6$.

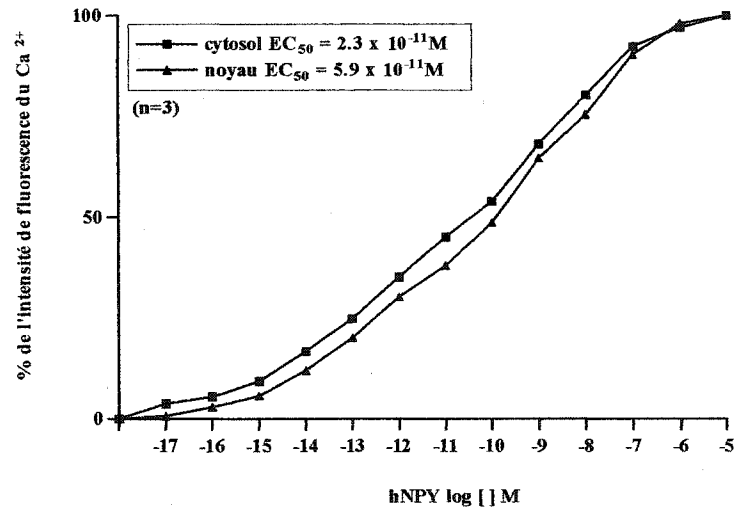
Les figures 28B et 28D montrent les courbes dose-réponses de l'effet du NPY sur le Ca^{2+} cytosolique et nucléaire des CEEGs (figure 28B) et des CEEDs (figure 28D) isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Comme nous pouvons remarquer, des concentrations de 10^{-17} M à 10^{-5} M de hNPY induisent des augmentations dose-dépendantes du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Dans les CEEGs, l' EC_{50} est de 3.6×10^{-11} M pour le cytosol et de 5.8×10^{-11} M pour le noyau, ($n=14$) alors que, dans les CEEDs, l' EC_{50} est de 1.1×10^{-10} M pour le cytosol et de 2.4×10^{-10} M pour le noyau ($n=6$) (voir tableau 7). Ces résultats suggèrent que chez le fœtus humain âgé de 20 semaines, les CEEGs deviennent plus sensibles au hNPY que les CEEDs.

De plus, le fait que nous n'avons pas accès à des tissus fœtaux plus âgés que 20 semaines et vu qu'il est presque impossible d'avoir des CEEs d'origine adulte humaine, nous avons utilisé des CEEs de rats adultes. Les cellules isolées des côtés ventriculaires droit et gauche ont été utilisées afin de tester l'effet de concentrations croissantes de hNPY extracellulaire (10^{-17} à 10^{-5} M) sur le niveau calcique basal cytosolique et nucléaire. Nos résultats ont démontré que le hNPY induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ dans les CEEGs et les CEEDs de rat adulte (figures 29A et 29B). Après le calcul des EC_{50} (CEEGs

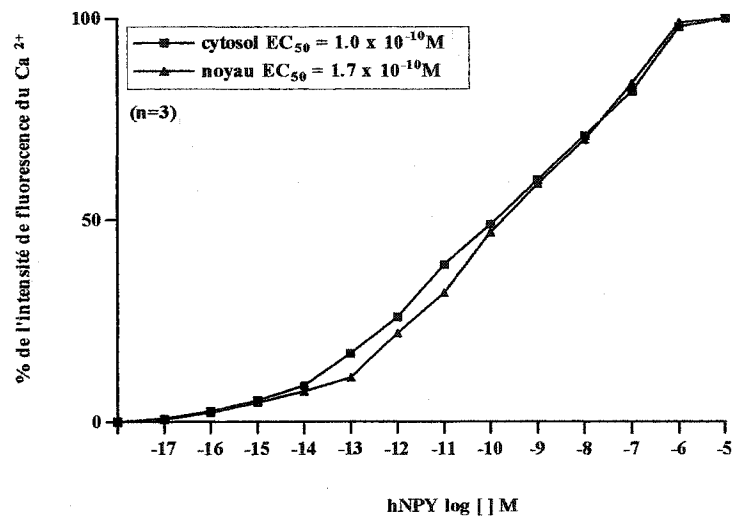
Figure 29 Effet de différentes concentrations de hNPY sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs et des CEEDs de rats adultes.

(A) Courbe dose-réponse de l'effet du hNPY sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs de rat adulte. L'ajout de doses croissantes de hNPY (10^{-17} M à 10^{-5} M) induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ avec un EC_{50} de 2.3×10^{-11} M pour le cytosol et de 5.9×10^{-11} M pour le noyau. (B) Courbe dose-réponse de l'effet du hNPY sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEDs de rat adulte. L'ajout de doses croissantes de hNPY (10^{-17} M à 10^{-5} M) induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ avec un EC_{50} de 1.0×10^{-10} M pour le cytosol et de 1.7×10^{-10} M pour le noyau. «n» est le nombre d'expériences. À noter qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux courbes des panneaux A ou B.

A) Courbe dose-réponse de l'effet du hNPY sur le niveau calcique des CEEGs de rat adulte



B) Courbe dose-réponse de l'effet du hNPY sur le niveau calcique des CEEDs de rat adulte



cytosol: 2.3×10^{-11} M; CEEGs noyau: 5.9×10^{-11} M (n=3); CEEDs cytosol: 1.0×10^{-10} M; CEEDs noyau: 1.7×10^{-10} M; (n=3)), nos résultats ont démontré aussi que chez le rat adulte les CEEGs sont plus sensibles au hNPY que les CEEDs avec des valeurs similaires à celles obtenues pour les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs foetaux humains âgés de 20 semaines (voir tableau 7).

En conclusion, ces résultats montrent que le hNPY induit une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ d'une façon dose-dépendante. Le tableau 7 résume les résultats présentés dans cette section. Comme on peut le remarquer, les EC_{50} obtenues pour les CEEDs isolées des cœurs foetaux humains âgés de 13, 17, 20 semaines et de rats adultes, au niveau cytosolique et nucléaire, sont du même ordre i.e. 10^{-10} M. Cependant, les EC_{50} obtenues pour les CEEGs montrent une diminution en fonction de l'âge et ce au niveau cytosolique et nucléaire. Par contre, à l'âge foetal de 20 semaines, les valeurs sont très similaires à celles obtenues pour les CEEGs de rat adulte aussi bien au niveau cytosolique que nucléaire et sont de l'ordre de 10^{-11} M. Ceci suggère que les CEEDs et les CEEGs isolées des cœurs foetaux humains âgés de 20 semaines sont un bon modèle de cellules adultes afin d'étudier les effets du NPY, vu que les cellules humaines adultes ne sont pas disponibles.

3.4. Effet de l'administration des antagonistes des récepteurs Y_1 et Y_2 sur l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

Dans cette série d'expériences, nous avons vérifié si les récepteurs Y_1 et/ou Y_2 sont impliqués dans l'augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le NPY dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. La concentration du NPY choisie pour effectuer ces expériences est de 10^{-9} M, une concentration près de l' EC_{50} et qui est capable de produire une augmentation soutenue, mais non saturante, du calcium cytosolique et nucléaire.

3.4.1. Effet préventif de l'administration de l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

En utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte et la microscopie confocale, nous avons démontré la présence du récepteur Y_1 dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines (voir la section 3.1.3). Afin d'étudier le rôle du récepteur Y_1 dans la réponse calcique induite par le hNPY dans ces cellules, nous avons utilisé un antagoniste non-peptidique, le

BIBO3304, un bloqueur hautement sélectif du récepteur Y_1 (WIELAND *et al.*, 1998; DUMONT *et al.* 2000 ; 2000b).

En utilisant la microscopie confocale et la sonde calcique, le Fluo 3-AM, les cellules sont enregistrées au début de chaque expérience afin de déterminer le niveau basal du calcium cytosolique et nucléaire. Des coupes optiques sériées sont générées afin de reconstruire la distribution intracellulaire du Ca^{2+} libre en 3-D dans un milieu dépourvu contrôle. Pour toutes les expériences en mode préventif, les cellules sont stimulées d'une façon préalable par une concentration de 10^{-9} M de hNPY. La figure 30 montre un exemple typique du niveau du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines et la figure 31 illustre la moyenne des mesures de l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ (n=4). Comme on peut remarquer à la figure 31, au niveau contrôle, les cellules démontrent un niveau calcique nucléaire supérieur à celui du cytosol (66.5 ± 2.7 et 25.1 ± 1.1 (n=4), respectivement). Cette distribution du Ca^{2+} a déjà été rapportée par BKAILY *et al* (1996). Suite à l'addition du hNPY, nous observons, comme prévu, une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ (cytosol: 34.1 ± 2.0 ; noyau: 91.8 ± 4.3 ; n=4; $p < 0.01$). Une fois l'augmentation des niveaux de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ est soutenue, le hNPY est lavé du milieu extracellulaire et comme le montre les figures 30 et 31, on observe un retour du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ au

Figure 30 Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304, sur l'augmentation du niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

(A) En milieu contrôle, la cellule montre un niveau de $[Ca]_i$ légèrement plus élevé dans le noyau en comparaison avec le cytosol. (B) L'ajout du hNPY à une concentration de 10^{-9} M induit une augmentation significative des niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (C) Lavage du hNPY du milieu extracellulaire ramène le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ presque au niveau contrôle. (D) L'ajout de l'antagoniste du récepteur Y_1 (le BIBO3304, 10^{-6} M), n'a pas d'effet sur les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (E) En présence du BIBO3304, l'addition du hNPY, à une concentration de 10^{-9} M, n'affecte pas les niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (F) Délimitation du noyau à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. La représentation des images est indiquée selon une échelle de pseudo-couleur représentant l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} allant de 0 à 255. Les couleurs du panneau F n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

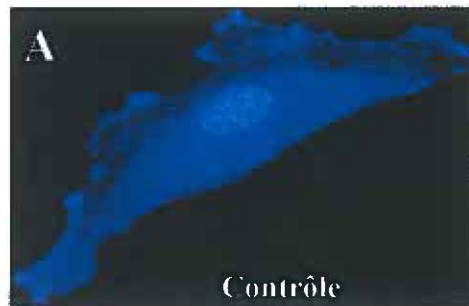
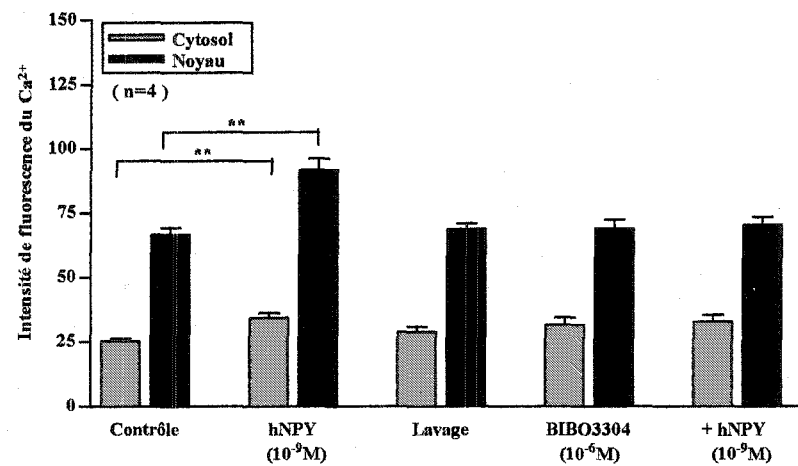


Figure 31 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_1 (BIBO3304) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

Cet histogramme représente la mesure de l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs du cœur fœtal âgé de 20 semaines. L'ajout du hNPY (10^{-9} M) induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ par rapport à leur niveau basal. Le lavage du hNPY du milieu extracellulaire ramène les niveaux calciques cytosolique et nucléaire presque aux valeurs contrôles. L'ajout de l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304 (10^{-6} M), n'induit pas une augmentation du $[Ca]_i$. En présence du BIBO3304, l'addition du hNPY (10^{-9} M) n'induit pas une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Les valeurs sont représentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne avec le nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. ** $p < 0.01$. Pour les mesures du calcium en 3-D, les valeurs de l'intensité de fluorescence calcique cytosolique et nucléaire sont obtenues à partir de cellules reconstruites en 3-D, suite à l'enregistrement d'images optiques sériées.

Effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_1 (BIBO3304) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs du cœur foetal âgé de 20 semaines



niveau basal. Par la suite, l'antagoniste sélectif du récepteur Y_1 , le BIBO3304, est ajouté à une concentration de 10^{-6} M connue pour bloquer complètement ce type de récepteur (DUMONT *et al.*, 2000; 2000a). L'ajout de cet antagoniste n'induit pas d'augmentation du calcium intracellulaire (cytosol: 31.5 ± 2.9 ; noyau: 69.0 ± 3.5 ; n=4). En présence du BIBO3304, l'addition subséquente d'une concentration de 10^{-9} M de hNPY n'affecte pas le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ (cytosol 32.6 ± 2.7 ; noyau: 70.6 ± 2.8 ; n=4). Ces résultats montrent que l'effet du hNPY sur le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ est complètement réversible et que l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304, est capable de prévenir complètement l'effet du hNPY sur la réponse calcique cytosolique et nucléaire des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines, suggérant ainsi une implication du récepteur Y_1 dans la réponse calcique induite par le hNPY au niveau de ces cellules.

3.4.2. Effet préventif de l'administration de l'antagoniste du récepteur Y_2 , le BIIE0246, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

Dans cette série d'expériences, nous avons vérifié si le récepteur Y_2 participe également à l'effet du hNPY sur les CEEGs du cœur fœtal âgé de 20 semaines. Nous avons donc utilisé un antagoniste sélectif du récepteur Y_2 , le

BIIE0246, à une concentration de 10^{-6} M connue pour bloquer complètement ce type de récepteur (DOODS *et al.*, 1999; DUMONT *et al.*, 2000a ; 2000b).

En utilisant la microscopie confocale et la sonde Fluo 3-AM sensible au Ca^{2+} , nous avons déterminé le niveau de $[\text{Ca}]_c$ et $[\text{Ca}]_n$ des cellules. La figure 32 illustre un exemple type du niveau de $[\text{Ca}]_c$ et $[\text{Ca}]_n$ d'une CEEG et la figure 33 montre la compilation des mesures d'intensité de fluorescence du $[\text{Ca}]_c$ et $[\text{Ca}]_n$ de ces cellules (n=4). Comme la série d'expériences précédente, nous avons stimulé les cellules avec une concentration de 10^{-9} M de hNPY, et comme le montre la figure 33, nous observons une augmentation significative du $[\text{Ca}]_c$ et $[\text{Ca}]_n$ (cytosol: 32.9 ± 1.2 ; noyau: 96.4 ± 4.8 ; n=4; $p < 0.01$) par rapport au contrôle (cytosol: 24.3 ± 1.5 ; noyau: 63.8 ± 3.3 ; n=4). Le lavage du hNPY du milieu extracellulaire ramène le calcium intracellulaire au niveau basal (cytosol: 26.2 ± 1.3 ; noyau: 68.2 ± 3.1 ; n=4). L'ajout du BIIE0246 n'affecte pas les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires (cytosol: 27.6 ± 0.7 ; noyau: 69.8 ± 3.6 ; n=4). Cependant, l'ajout du hNPY (10^{-9} M) en présence de l'antagoniste sélectif du récepteur Y_2 , amène une élévation significative du Ca^{2+} dans le cytosol et dans le noyau (cytosol: 32.7 ± 0.8 ; noyau: 95.4 ± 3.0 ; n=4; $p < 0.01$).

Ces résultats suggèrent donc que les récepteurs Y_2 ne semblent pas être impliqués dans la réponse calcique cytosolique et nucléaire induite par le hNPY dans les CEEGs âgées de 20 semaines. Ces résultats confirment ceux obtenus en utilisant l'antagoniste du récepteur Y_1 et démontrent que l'effet du NPY sur les CEEGs est uniquement médié via les récepteurs Y_1 .

Figure 32 Absence d'effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_2 , le BIIE0246, sur l'augmentation du niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

(A) En milieu contrôle, la cellule montre un niveau de $[Ca]_i$ légèrement plus élevé dans le noyau en comparaison avec le cytosol. (B) L'ajout du hNPY à une concentration de 10^{-9} M induit une augmentation significative du niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (C) Lavage du hNPY du milieu extracellulaire ramène le $[Ca]_c$ et le $[Ca]_n$ presque au niveau contrôle. (D) L'ajout de l'antagoniste du récepteur Y_2 (le BIIE0246, 10^{-6} M) n'a pas d'effet sur le niveau du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (E) En présence du BIIE0246, l'addition du hNPY à une concentration de 10^{-9} M induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (F) Délimitation du noyau à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudo-couleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} allant de 0 à 255. Les couleurs du panneau F n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

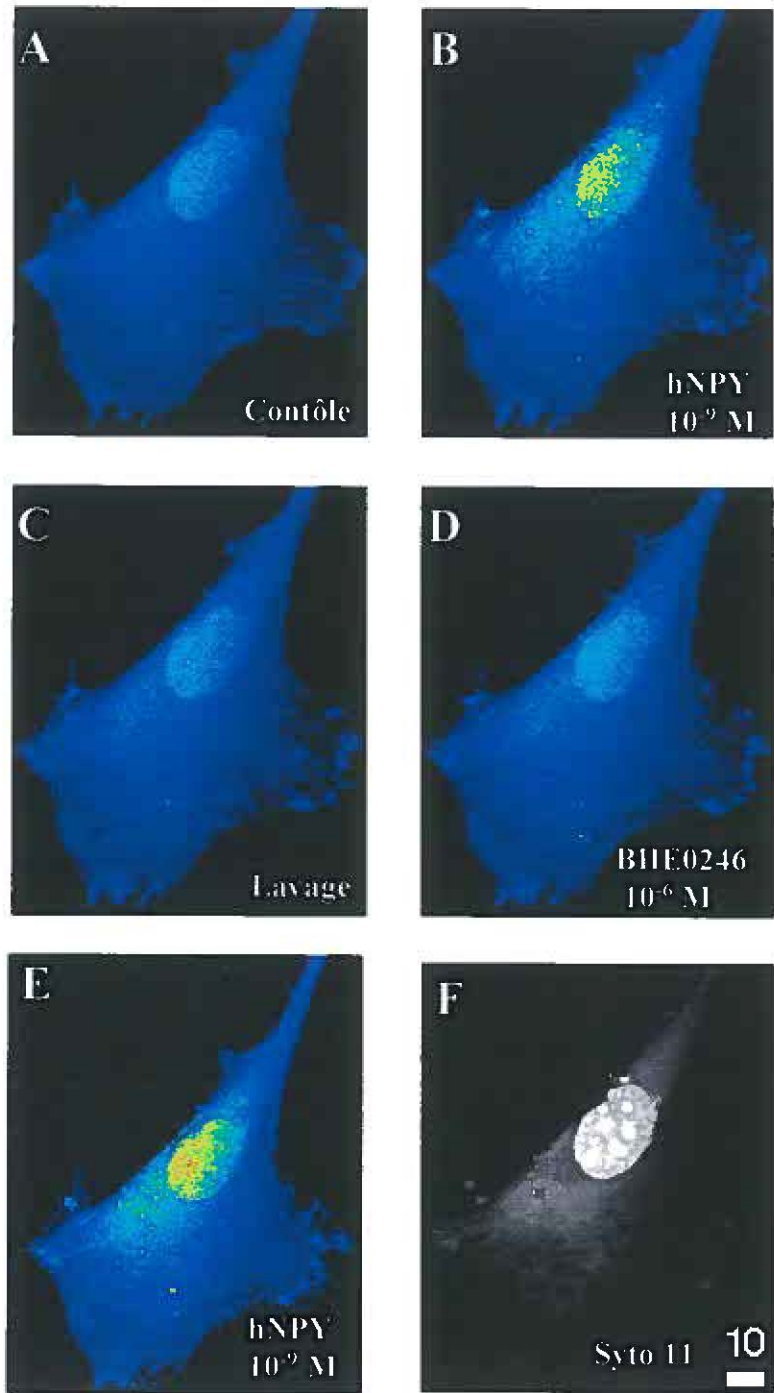
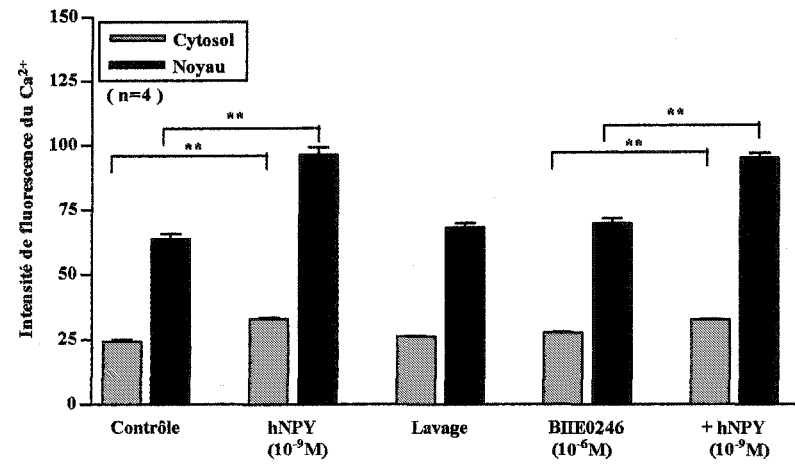


Figure 33 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_2 (BIIE0246) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

Cet histogramme représente la mesure de l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEGs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. L'ajout du hNPY (10^{-9} M) induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ par rapport à leur niveau basal. Le lavage du hNPY du milieu extracellulaire ramène les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires presque aux valeurs contrôles. L'ajout de l'antagoniste du récepteur Y_2 , le BIIE0246 (10^{-6} M) n'induit pas une augmentation du $[Ca]_i$. En présence du BIIE0246, l'addition du hNPY (10^{-9} M) produit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Les valeurs sont représentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne avec le nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. ** $p < 0.01$. Pour les mesures du calcium en 3-D, les valeurs de l'intensité de fluorescence calcique cytosolique et nucléaire sont obtenues à partir de cellules reconstruites en 3-D, suite à l'enregistrement d'images optiques sériées.

Effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_2 (BHE0246) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEGs du cœur foetal âgé de 20 semaines



3.4.3. Effet préventif de l'administration de l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le NPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

Comme démontré précédemment, le récepteur Y_1 est aussi exprimé dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines, mais la densité de ce récepteur est plus faible au niveau des CEEs isolées à partir du ventricule droit par rapport à celles isolées à partir du ventricule gauche (voir la section 3.1.3 pour détails). Dans cette série d'expériences, nous avons étudié l'implication du récepteur Y_1 dans la réponse calcique induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

Toujours en utilisant la microscopie confocale et la sonde Fluo 3-AM sensible au calcium, nous avons enregistré le niveau contrôle du $[Ca]_i$ afin de déterminer le niveau basal du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Par la suite, nous avons stimulé les cellules avec une concentration de 10^{-9} M de hNPY. La figure 34 montre un exemple typique du niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ au niveau des CEEDs du cœur fœtal âgé de 20 semaines et la figure 35 montre la compilation des mesures d'intensité de fluorescence correspondantes. Dans ces cellules le hNPY induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ (cytosol: 30.5 ± 0.5 ; noyau: 81.1 ± 1.2 ; $n=3$; $p<0.01$) par rapport au niveau contrôle (cytosol: 25.5 ± 0.7 ; noyau: 65.2 ± 2.2 ; $n=3$). Une fois le hNPY est lavé du milieu extracellulaire, les niveaux du

Figure 34 Effet préventif partiel de l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304, sur l'augmentation du niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

(A) En milieu contrôle, la cellule montre un niveau de $[Ca]_i$ légèrement plus élevé dans le noyau en comparaison avec le cytosol. (B) L'ajout du hNPY à une concentration de 10^{-9} M induit une augmentation significative du niveau du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (C) Lavage du hNPY du milieu extracellulaire ramène le $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ presque au niveau contrôle. (D) L'ajout de l'antagoniste du récepteur Y_1 (le BIBO3304, 10^{-6} M) n'a pas d'effet sur le niveau de $[Ca]_c$ et de $[Ca]_n$. (E) En présence du BIBO3304, l'addition du hNPY à une concentration de 10^{-9} M induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (F) Délimitation du noyau à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudo-couleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} allant de 0 à 255. Les couleurs du panneau F n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

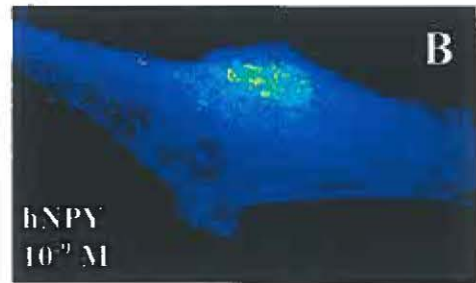
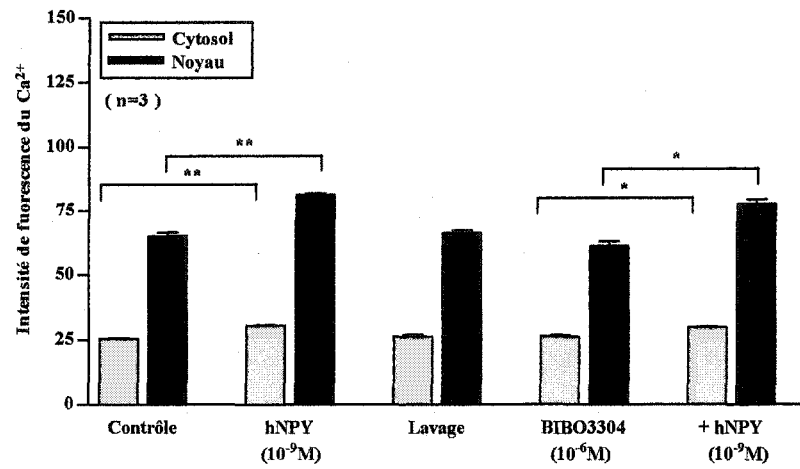


Figure 35 Effet préventif partiel de l'antagoniste du récepteur Y_1 (BIBO3304) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

Cet histogramme représente la mesure de l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEDs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. L'ajout du hNPY (10^{-9} M) induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ par rapport à leur niveau basal. Le lavage du hNPY du milieu extracellulaire ramène les niveaux calciques cytosolique et nucléaire presque aux valeurs contrôles. L'ajout de l'antagoniste du récepteur Y_1 , le BIBO3304 (10^{-6} M) n'induit pas une augmentation du $[Ca]_i$. En présence du BIBO3304, l'addition du hNPY (10^{-9} M) induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Les valeurs sont représentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne avec le nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Pour les mesures du calcium en 3-D, les valeurs de l'intensité de fluorescence calcique cytosoliques et nucléaires sont obtenues à partir de cellules reconstruites en 3-D.

Effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_1 (BIBO3304) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs du cœur foetal âgé de 20 semaines



[Ca]_c et [Ca]_n retournent au niveau basal (cytosol: 26.3 ± 1.0 ; noyau: 66.2 ± 1.9 ; n=3). En absence du NPY l'ajout du BIBO3304 (10^{-6} M) n'affecte pas le niveau du calcium intracellulaire (cytosol: 26.2 ± 1.0 ; noyau: 61.1 ± 3.3 ; n=3). Cependant, en présence de l'antagoniste des récepteurs Y₁ l'ajout d'une concentration de 10^{-9} M de hNPY à induit une augmentation significative du [Ca]_c et [Ca]_n (cytosol: 29.7 ± 0.9 ; noyau: 77.6 ± 3.1 ; n=3; p<0.05) mais qui est moindre que celle induite par le hNPY en absence de l'antagoniste.

En conclusion, ces résultats suggèrent que le récepteur Y₁ est impliqué en partie dans l'effet du hNPY sur le [Ca]_c et [Ca]_n dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés 20 semaines.

3.4.4. Effet de l'antagoniste du récepteur Y₂, le BIIE0246, sur l'augmentation soutenue du niveau basal du [Ca]_c et [Ca]_n induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

Dû au fait que le récepteur Y₁ semble être partiellement impliqué dans l'augmentation du [Ca]_c et [Ca]_n au niveau des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines, dans cette partie de l'étude, nous avons vérifié si le récepteur Y₂ participe à l'effet du hNPY sur l'augmentation du calcium intracellulaire au niveau de ces cellules. Comme précédemment, nous avons

utilisé le BIIE0246, un antagoniste sélectif du récepteur Y_2 , à une concentration de 10^{-6} M.

Nous avons déterminé les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires à l'intérieur des CEEDs, grâce à l'enregistrement d'images obtenues à partir de coupes optiques sériées des cellules. De cette façon, à l'aide de la microscopie confocale et la sonde calcique Fluo 3-AM, il a été possible de procéder à l'analyse de la distribution tridimensionnelle du Ca^{2+} intracellulaire, ainsi qu'à la visualisation du complexe Fluo 3/ Ca^{2+} à l'intérieur du cytosol et du noyau des au niveau contrôle et suite à la stimulation par différentes substances pharmacologiques.

Après avoir enregistré le $[Ca]_i$ des cellules au niveau contrôle, nous avons tout d'abord stimulé les cellules avec le hNPY (10^{-9} M). La figure 36 montre un exemple typique du niveau du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ dans les CEEDs d'origine foetale humaine âgées de 20 semaines. La figure 37 illustre la compilation des mesures d'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ correspondantes. Comme le montre les figures 36 et 37, le hNPY induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ (cytosol: 30.4 ± 0.9 ; noyau: 82.6 ± 2.3 ; $n=4$; $p<0.01$) par rapport au contrôle (cytosol: 25.5 ± 0.6 ; noyau: 59.7 ± 3.1 ; $n=4$). Suite au lavage du hNPY du milieu extracellulaire, le niveau du calcium intracellulaire retourne au niveau basal (cytosol: 25.2 ± 0.8 ; noyau: 60.5 ± 6.0 ; $n=4$). L'ajout du BIIE0246 (10^{-6} M) n'induit pas une augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ (cytosol: 25.3 ± 0.7 ; noyau: 65.4 ± 2.9 ; $n=4$). Cependant, en présence de cet antagoniste, l'ajout d'une

Figure 36 Expérience représentative de l'effet préventif partiel de l'antagoniste du récepteur Y_2 , le BIIE0246, en mode préventif sur l'augmentation du niveau de $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

(A) En milieu contrôle, la cellule montre un niveau de $[Ca]_i$ légèrement plus élevé dans le noyau en comparaison avec le cytosol. (B) L'ajout du hNPY à une concentration de 10^{-9} M induit une augmentation significative des niveaux du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (C) Le lavage du hNPY du milieu extracellulaire ramène le $[Ca]_c$ et le $[Ca]_n$ presque au niveau contrôle. (D) L'ajout de l'antagoniste du récepteur Y_2 (le BIIE0246, 10^{-6} M) n'a pas d'effet sur le niveau du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (E) En présence du BIIE0246, l'addition du hNPY à une concentration de 10^{-9} M, produit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. (F) Délimitation du noyau à l'aide de la sonde des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudo-couleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Fluo-3- Ca^{2+} allant de 0 à 255. Les couleurs du panneau F n'ont aucune valeur mesurable. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

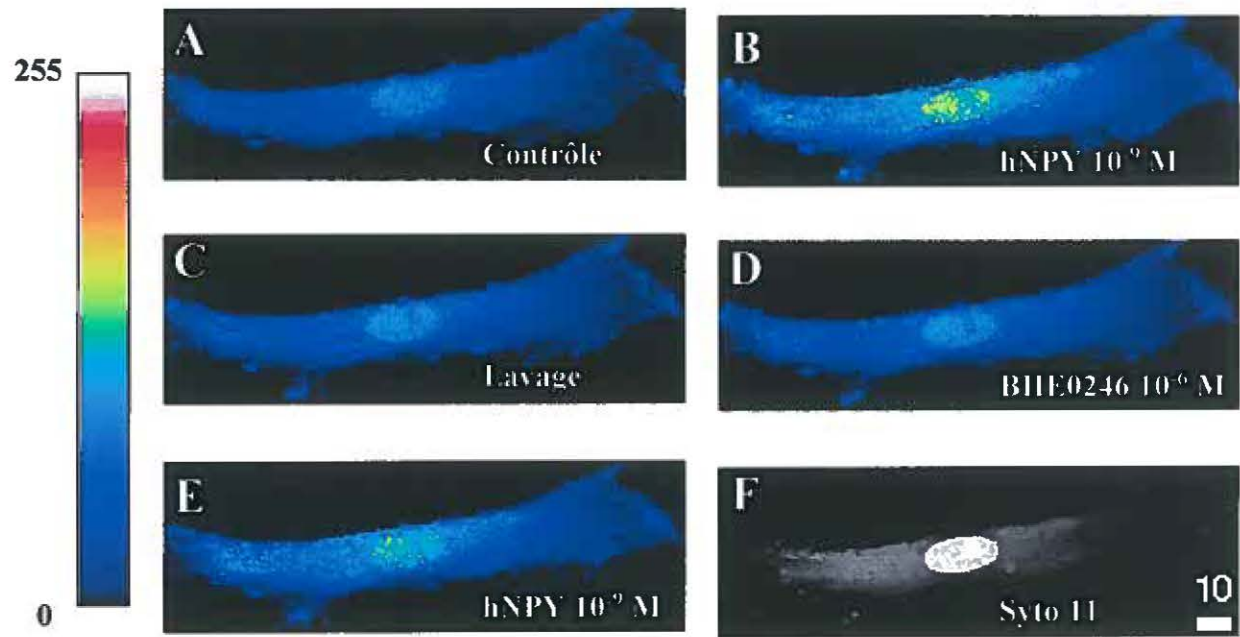
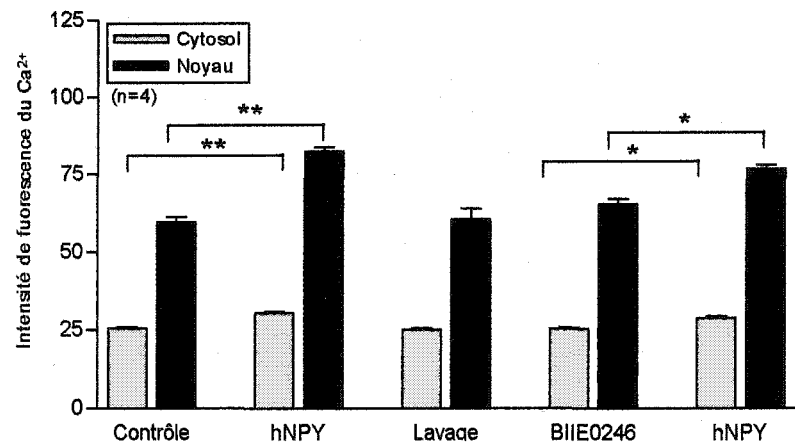


Figure 37 Effet préventif partiel de l'antagoniste du récepteur Y_2 (BIIIE0246) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

Cet histogramme représente la mesure de l'intensité de fluorescence du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ des CEEDs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. L'ajout du hNPY (10^{-9} M) induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ par rapport à leur niveau basal. Le lavage du hNPY du milieu extracellulaire ramène les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires presque aux valeurs contrôles. L'ajout de l'antagoniste du récepteur Y_2 , le BIIIE0246 (10^{-6} M), n'induit pas une augmentation du $[Ca]_i$. En présence du BIIIE0246, l'addition du hNPY (10^{-9} M) induit une augmentation significative du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Les valeurs sont représentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne avec le nombre d'expériences indiqué entre parenthèses. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Pour les mesures du calcium en 3-D, les valeurs de l'intensité de fluorescence calcique cytosolique et nucléaire sont obtenues à partir de cellules reconstruites en 3-D, suite à l'enregistrement d'images optiques sériées.

Effet préventif de l'antagoniste du récepteur Y_2 (BIE0246) sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ induite par le hNPY dans les CEEDs du cœur foetal âgé de 20 semaines



concentration de 10^{-9} M de hNPY induit une augmentation significative du niveau de calcium cytosolique et nucléaire (cytosol: 28.9 ± 0.9 ; noyau: 76.8 ± 2.2 ; $n=4$; $p<0.05$) mais qui reste inférieure à l'augmentation induite par le hNPY en absence de l'antagoniste.

Ces résultats suggèrent que le récepteur Y_2 est impliqué en partie dans la réponse calcique induite par le hNPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines.

3.5. Synthèse et sécrétion du NPY par les CEEs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

La synthèse et la sécrétion du NPY ont été étudiées surtout au niveau des neurones sympathiques (ZUKOWSKA-GROJEC et WAHLESTDET, 1993). Plusieurs études ont rapporté que ces deux phénomènes nécessitent une activité nerveuse très élevée suivie par une augmentation significative du calcium intracellulaire via l'activation des canaux calciques dépendants du voltage de type N. Dans la section 3.2, nos résultats montrent que le NPY est présent dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines; l'immunoréactivité du NPY étant plus élevée dans les CEEs isolées du ventricule droit par rapport au ventricule gauche. En tenant compte de ces données, dans cette série d'expériences, nous avons vérifié si nos cellules sont capables de sécréter ce NPY dans le milieu extracellulaire suite à une augmentation du

calcium intracellulaire. Pour ce faire, nous avons augmenté le $[K]_o$ de 5 à 30 mM, connue pour induire une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ due à la dépolarisation de la membrane plasmique et à l'activation des canaux calciques dépendants du voltage de type R (BKAILY *et al.*, 1997; JACQUES *et al.*, 2000).

Dans une première série d'expériences, nous avons examiné le marquage du NPY au niveau des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines, au niveau contrôle et suite à la dépolarisation de la membrane avec 30 mM KCl. L'utilisation de la technique d'immunofluorescence indirecte et de la microscopie confocale nous a permis de visualiser en trois dimensions la distribution du NPY dans nos cellules. Comme le montre la figure 38, au niveau des CEEGs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines, l'anticorps dirigé contre le NPY montre une faible immunoréactivité au niveau contrôle (figure 38A). Suite à la dépolarisation de la membrane avec 30 mM KCl, l'intensité de fluorescence du NPY augmente dans le noyau et s'étend au cytosol et ce, en fonction du temps (voir panneaux B, C, D, E de la figure 38) pour atteindre un niveau maximal après 60 minutes d'incubation (panneau F de la figure 38). 24 heures après le lavage de la haute concentration de KCl du milieu extracellulaire, l'intensité de fluorescence du NPY retourne au niveau contrôle (panneau G de la figure 38). Par contre, l'effet de la dépolarisation de la membrane sur l'immunoréactivité du NPY au niveau des CEEDs semble être complètement différent. La figure 39 illustre l'immunoréactivité du NPY dans les CEEDs au niveau contrôle (figure 39A) ainsi qu'après 5, 10, 20, 30 et 60 minutes

Figure 38 Effet de la dépolarisation de la membrane à l'aide d'une haute concentration de KCl sur le marquage immunofluorescent du NPY dans les CEEGs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

Le panneau A montre le marquage du NPY dans les CEEGs du cœur fœtal âgé de 20 semaines au niveau contrôle. Les panneaux B, C, D, E et F montrent le marquage du NPY suite à 5, 10, 20, 30 et 60 d'incubation en présence d'une haute concentration de KCl (30 mM). Il est à noter qu'il y a une augmentation de l'immunoréactivité du NPY en fonction du temps. Le panneau G montre le marquage immunofluorescent du NPY 24 heures après le lavage de la haute concentration de KCl du milieu extracellulaire. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

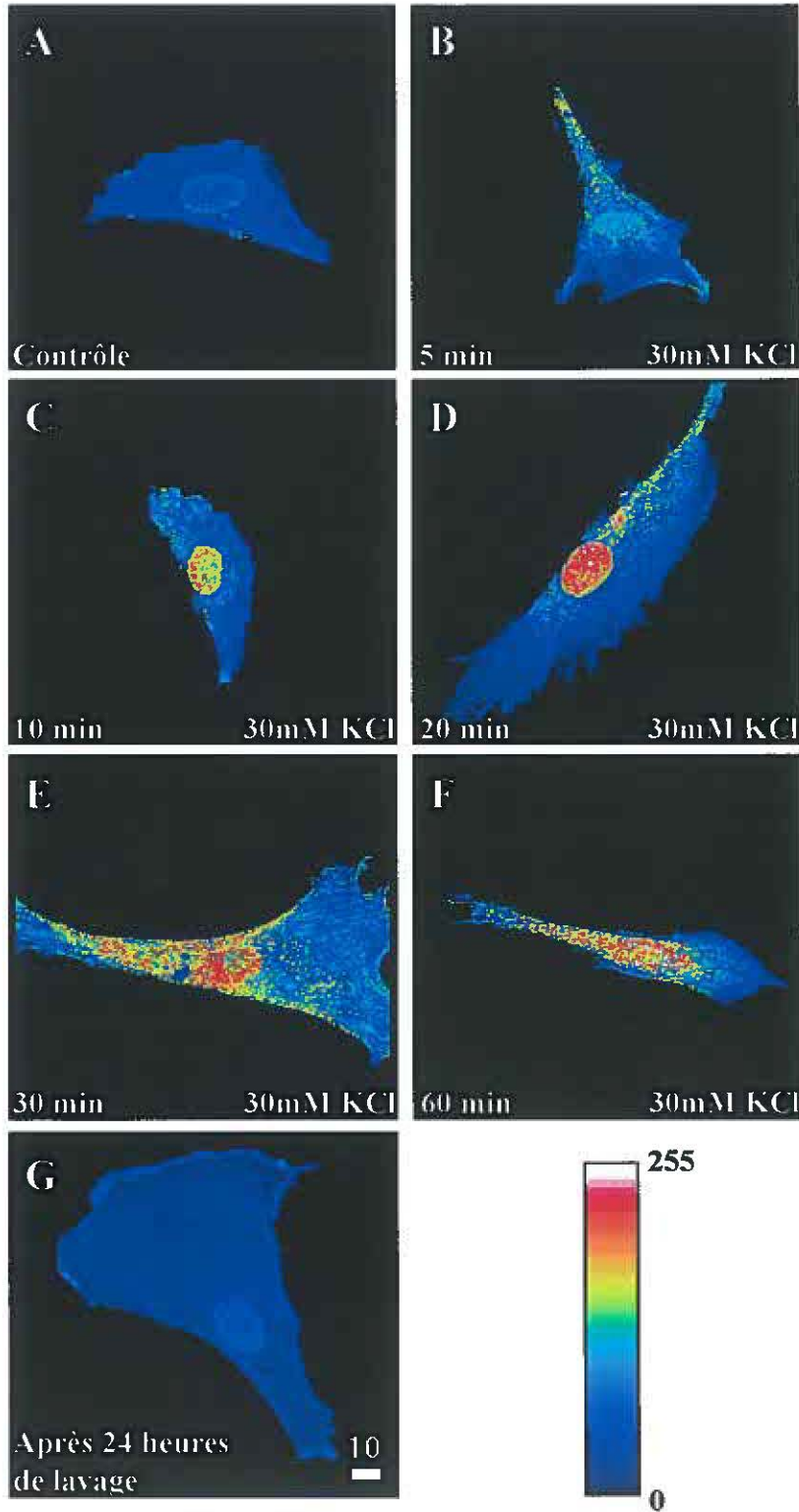
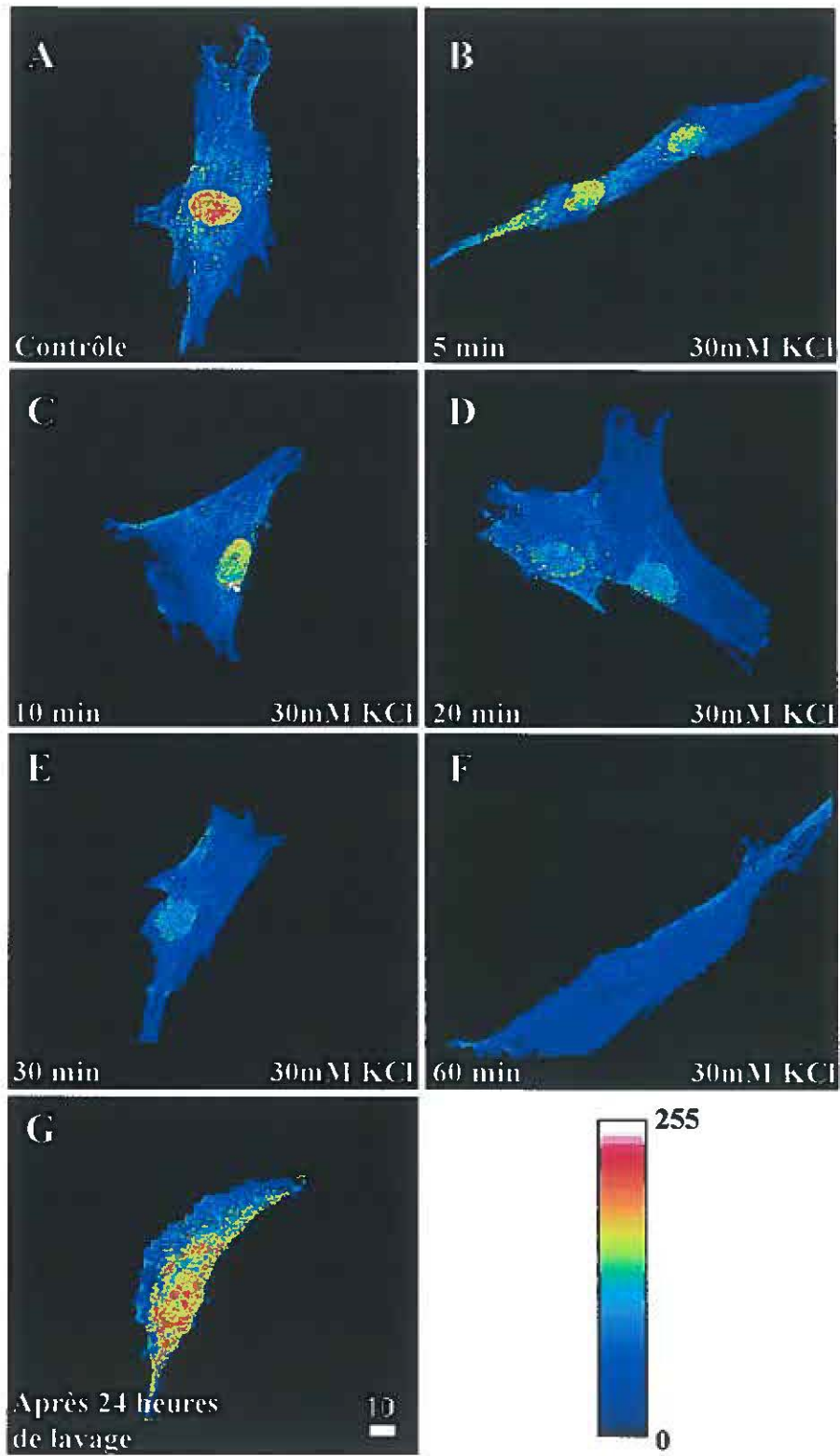


Figure 39 Effet de la dépolarisation de la membrane à l'aide d'une haute concentration de KCl sur le marquage immunofluorescent du NPY dans les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines.

Le panneau A montre le marquage du NPY dans les CEEDs du cœur fœtal âgé de 20 semaines au niveau contrôle (5 mM KCl). Les panneaux B, C, D, E et F montrent le marquage du NPY après 5, 10, 20, 30 et 60 minutes d'incubation en présence de 30 mM KCl. Le marquage du NPY diminue en fonction du temps. Le panneau G montre le marquage immunofluorescent du NPY 24 heures après le lavage de la haute concentration de KCl du milieu extracellulaire. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

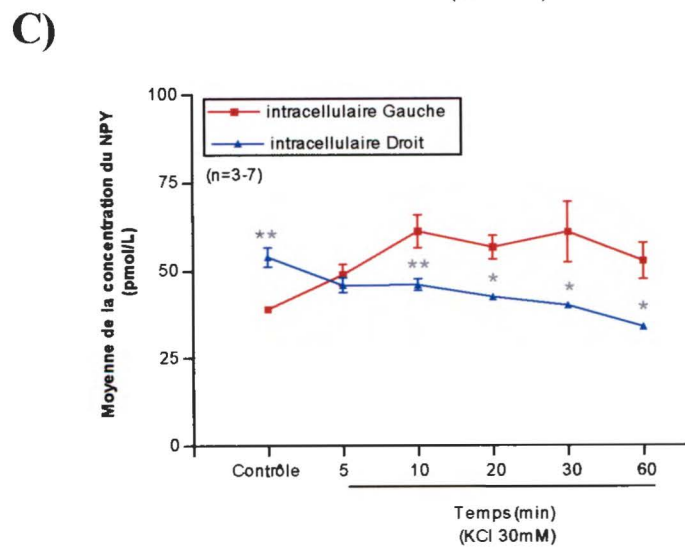
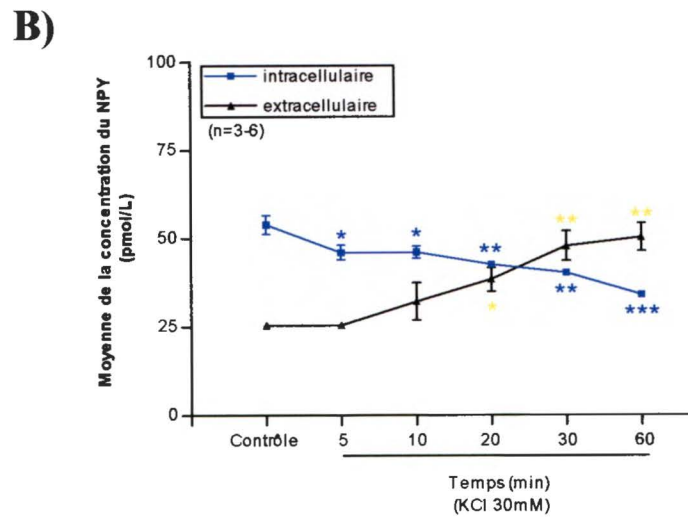
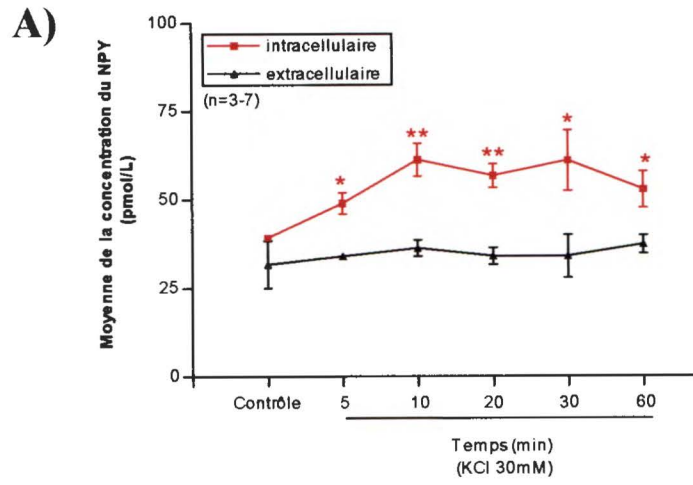


d'incubation avec une haute concentration de KCl (30 mM) (panneaux B, C, D, E et F de la figure 39). Comme le montre cette figure, l'intensité de fluorescence du NPY au niveau du cytosol et du noyau diminue après 5 minutes d'incubation avec 30mM KCl pour atteindre un niveau très faible à 60 minutes. 24 heures après le lavage de la haute concentration de KCl du milieu extracellulaire, l'intensité de fluorescence du NPY réaugmente de nouveau à un niveau près du contrôle (figure 39G).

Dans la deuxième partie de cette étude nous avons déterminé la concentration du NPY dans le milieu intracellulaire et dans le milieu extracellulaire au niveau contrôle et après différents temps d'incubation en présence d'une haute concentration de KCl (30 mM) en utilisant la méthode de radioimmunos dosage (RIA). Les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines sont mises en culture dans des boîtes de pétris de 100 mm de diamètre. À confluence, les cellules sont incubées à différents temps (5, 10, 20, 30 et 60 minutes) en absence et en présence d'une haute concentration de KCl (30 mM). Les échantillons du milieu extracellulaire et du milieu intracellulaire sont collectés simultanément. Par la suite, en utilisant la technique du RIA, nous avons mesuré la concentration du NPY dans le milieu intracellulaire et extracellulaire. La figure 40 illustre la cinétique de synthèse et de sécrétion du NPY dans les CEEGs et ses CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines en réponse à une haute concentration de KCl. Nos résultats montrent (figure 40 A) qu'au niveau des CEEGs du cœur fœtal âgé de 20 semaines, la

Figure 40 Détermination de la concentration intracellulaire et extracellulaire de NPY dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux âgés de 20 semaines suite à un traitement avec une haute concentration de KCl.

Le panneau A montre les niveaux intracellulaires et extracellulaires du NPY (exprimés en pmol/L/ 3×10^6 cellules) dans les CEEGs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines en milieu contrôle (5mM KCl) et après 5, 10, 20, 30 et 60 minutes en présence de 30 mM KCl. Le panneau B montre les niveaux intracellulaires et extracellulaires du NPY (exprimés en pmol/L/ 3×10^6 cellules) dans les CEEDs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines en milieu contrôle et après 5, 10, 20, 30 et 60 minutes en présence de 30 mM KCl. Le panneau C illustre la comparaison du niveau intracellulaire du NPY entre les CEEGs et les CEEDs milieu contrôle (non stimulé, 5mM KCl) et après 5, 10, 20, 30 et 60 minutes de traitement avec 30 mM KCl. (*) Comparaison statistique du niveau intracellulaire du NPY après différents temps de traitement en présence de 30 mM KCl vs le milieu contrôle (5 mM KCl) au niveau des CEEGs. (*) Comparaison statistique du niveau intracellulaire du NPY après différents temps de traitement en présence de 30 mM KCl vs le milieu contrôle (5 mM KCl) au niveau des CEEDs. () Comparaison statistique du niveau extracellulaire du NPY après différents temps de traitement en présence de 30 mM KCl vs le milieu contrôle (5 mM KCl) au niveau des CEEDs. (*) Comparaison statistique de la concentration intracellulaire du NPY en milieu contrôle et suite aux différents temps de traitement avec 30 mM KCl entre les CEEGs et les CEEDs du cœur fœtal âgé de 20 semaines. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. «n» est le nombre d'expériences.



concentration du NPY intracellulaire des cellules au niveau contrôle est de 39.2 ± 0.5 pmol/L/ 3×10^6 cellules. Après 5, 10, 20, 30 et 60 minutes en présence de la haute concentration de KCl (30 mM) on observe une augmentation significative de la concentration du NPY intracellulaire par rapport au contrôle (49.0 ± 2.9 pmol/L/ 3×10^6 cellules; $n=4$; $p<0.05$, de 61.3 ± 4.6 pmol/L/ 3×10^6 cellules; $n=3$; $p<0.01$, 56.7 ± 3.3 pmol/L/ 3×10^6 cellules $n=7$; $p<0.01$, 61.0 ± 8.5 pmol/L/ 3×10^6 cellules; $n=3$; $p<0.05$ et 52.7 ± 5.1 pmol/L/ 3×10^6 cellules $n=4$; $p<0.05$, respectivement). Dans le milieu extracellulaire, la concentration du NPY ne varie pas beaucoup. À 60 minutes, elle est de l'ordre de 37.3 ± 2.6 pmol/L/ 3×10^6 cellules vs contrôle : 31.6 ± 6.6 pmol/L/ 3×10^6 cellules ($n=3-6$).

Au niveau des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines (figure 40B), nos résultats montrent que la concentration de NPY à intracellulaire au niveau contrôle est de 54.0 ± 2.7 pmol/L/ 3×10^6 cellules ($n=5$) et que 5, 10, 20, 30 et 60 minutes suite à la dépolarisation de la membrane à l'aide d'une haute concentration de KCl (30 mM), la concentration intracellulaire de NPY diminue d'une façon significative par rapport au contrôle (à 5min: 46.0 ± 2.1 pmol/L/ 3×10^6 cellules; $n=6$; $p<0.05$, à 10 min: 46.1 ± 1.6 pmol/L/ 3×10^6 cellules; $n=6$; $p<0.05$, à 20 min: 42.6 ± 0.7 pmol/L/ 3×10^6 cellules; $n=4$; $p<0.01$, à 30 min: 40.2 ± 0.3 pmol/L/ 3×10^6 cellules; $n=4$; $p<0.01$ et à 60 min: 34.0 ± 0.3 pmol/L/ 3×10^6 cellules; $n=4$; $p<0.001$). De façon opposée dans le milieu extracellulaire des CEEDs, la concentration du NPY augmente d'une façon significative par rapport au contrôle (25.4 ± 0.5 pmol/L/ 3×10^6 cellules) à partir de 20 minutes (38.3 ± 3.4

pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=6; p<0.05) et continue à augmenter après 30 minutes (47.8 ± 4.2 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=6; p<0.01) pour atteindre son maximum après 60 minutes d'incubation avec 30 mM KCl (50.2 ± 4.0 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=6; p<0.01).

La figure 40C montre la concentration intracellulaire de NPY dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines au niveau contrôle et après 5, 10, 20, 30 et 60 minutes en présence de 30 mM KCl. Comme l'illustre le panneau C, la concentration du NPY au niveau contrôle est significativement plus élevée dans les CEEDs par rapport aux CEEGs (54.0 ± 2.7 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=5, 39.2 ± 0.5 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=4; p<0.01, respectivement). Par contre, après 5, 10, 20, 30 et 60 minutes de traitement avec 30 mM KCl, la concentration du NPY diminue dans les CEEDs alors qu'elle augmente dans les CEEGs. La différence dans la concentration intracellulaire de NPY entre les deux types cellulaires devient significative après 10 minutes d'incubation avec 30 mM KCl (10 minutes 30 mM KCl CEEGs: 61.3 ± 4.6 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=3, 10 minutes 30 mM KCl CEEDs: 46.1 ± 1.6 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=6; p<0.01; 20 minutes 30 mM KCl CEEGs: 56.7 ± 3.3 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=7; 20 minutes 30 mM KCl CEEDs: 42.6 ± 0.7 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=4; p<0.05; 30 minutes 30 mM KCl CEEGs: 61.0 ± 8.5 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=3; 30 minutes 30 mM KCl CEEDs: 40.2 ± 0.3 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=4; p<0.05; 60 minutes 30 mM KCl CEEGs: 52.7 ± 5.1

pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=4; 60 minutes 30 mM KCl CEEDs: 34.0 ± 0.3 pmol/L/ 3×10^6 cellules; n=4; $p < 0.05$).

Ces résultats suggèrent qu'en milieu contrôle, les CEEDs contiennent plus de NPY que les CEEGs et que suite à une élévation soutenue du $[Ca]_i$ due à l'activation des canaux calcique voltage-dépendant, les CEEDs secrètent du NPY dans le milieu extracellulaire, par contre, les CEEGs sont incapables. Cette différence de propriété sécrétrice des CEEDs par rapport aux CEEGs peut-être due, en partie, au niveau du NPY qui est plus élevé dans les CEEDs par rapport aux CEEGs. Par contre, même si suite à l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$, le niveau de NPY des CEEGs augmente à un niveau équivalent ou légèrement supérieur à celui des CEEDs en milieu contrôle, les CEEGs ne semblent pas sécréter le NPY d'une façon significative. Ces résultats peuvent donc suggérer la présence, dans les CEEDs, et l'absence, dans les CEEGs, d'un facteur autre que l'augmentation calcique soutenue qui serait nécessaire pour induire la sécrétion du NPY par les CEEs. La nature de ce facteur qui est probablement Ca^{2+} -dépendant doit être vérifiée dans le futur. De plus, nos résultats ont montré qu'une élévation soutenue du $[Ca]_i$ diminue le $[NPY]_i$ dans les CEEDs et cet effet est réversible après l'arrêt de cette augmentation soutenue du $[Ca]_i$. Ces résultats suggèrent que ces cellules sont capables de synthétiser *de novo* le NPY. D'autre part, nos résultats ont aussi démontré que même si les CEEGs ne secrètent pas le NPY suite à une augmentation soutenue du $[Ca]_i$, par contre, ce stimulus semble induire une synthèse *de novo* du NPY. Donc, il est possible de postuler que la diminution du

NPY mesurée dans les CEEDs, suite à l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$, est probablement le résultat du NPY sécrété, et en même temps, synthétisé par les cellules. Ces hypothèses doivent être vérifiées dans le futur.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'endothélium a été considéré pendant longtemps comme étant une couche de cellules inerte séparant le sang circulant du muscle lisse sous-jacent. Cependant, depuis l'observation de FURCHGOTT et ZAWADISKI (1980) concernant l'importance du rôle de l'endothélium, cette couche de cellules a suscité l'intérêt de la communauté scientifique. Ces études ont démontré que l'endothélium vasculaire peut avoir plusieurs rôles importants, non seulement dans la régulation du tonus vasculaire via le relâchement d'une variété d'agents vasoactifs (MONCADA *et al.*, 1976; FURCHGOTT et ZAWADISKI, 1980; VANHOUTTE, 1987; PALMER *et al.*, 1988; YANAGISAWA *et al.*, 1988, HIRATA *et al.*, 1991), mais aussi dans la réponse immunitaire, la coagulation sanguine, la croissance des cellules du muscle lisse vasculaire et bien d'autres fonctions (pour plus de détail, voir de CINES *et al.*, 1998).

Bien que l'endothélium vasculaire a été étudié de façon extensive, une faible attention a été donnée à l'endothélium endocardique, une monocouche de cellules endothéliales qui tapisse les cavités du cœur. En 1988, BRUTSAERT et ses collaborateurs ont démontré pour la première fois que l'endothélium endocardique peut influencer la fonction contractile du muscle cardiaque papillaire de rat et de chat. Ces auteurs ont rapporté que suite à l'enlèvement de l'endothélium endocardique du tissu cardiaque, la durée de la contraction isométrique du muscle devient plus courte et est accompagnée par une diminution de la force contractile par rapport aux tissus intacts. Par la suite, plusieurs groupes ont confirmé ces résultats par des études *in vitro* et *in vivo* sur différentes

préparations et espèces animales (GILLEBERT *et al.*, 1992; De HERT *et al.*, 1993). De plus, d'autres groupes ont rapporté que les CEEs peuvent modifier l'effet inotrope de certains agents sur le muscle cardiaque papillaire via l'activation de différents récepteurs présents sur la surface membranaire des CEEs (SHAH *et al.*, 1989; 1989a; MEULEMMANS *et al.*, 1990; LI *et al.*, 1991). Il a été également démontré que les CEEs peuvent avoir un effet paracrine sur le muscle cardiaque et ce via le relâchement de plusieurs agents cardioactifs incluant l'oxyde nitrique, l'endothéline-1, les prostanoïdes, les adénylpurines et autres substances dont la nature chimique n'est pas encore déterminée (SCHULZ *et al.*, 1991; MEBAZAA *et al.*, 1993; 1993a). Les effets des facteurs relâchés par les CEEs sur la fonction contractile du muscle cardiaque ont été aussi confirmés *in vivo* chez des sujets humains (PAULUS *et al.*, 1994; 1995).

L'endothélium endocardique joue donc un rôle très important dans la régulation de la fonction cardiaque, cependant, les études dans le domaine sont encore très limitées et des recherches plus avancées sont nécessaires afin de mieux comprendre ce système.

Le NPY est un peptide de 36 acides aminés dont la séquence est hautement conservée au cours de l'évolution (LARHAMMAR, 1996) et qui joue un rôle très important dans plusieurs processus physiologiques (SHEIKH, 1991; COLMERS et BLEAKMAN, 1994; WANG *et al.*, 1994; WETTSTEIN *et al.*, 1995; MICHEL et RASCHER, 1995; LUNDBERG *et al.*, 1996; PLAYFORD et COX, 1996). Les effets du NPY sur le système cardiovasculaire ont été largement

étudiés (EDVINSSON *et al.*, 1987; ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1987; 1998; 1998a; MILLAR *et al.*, 1994; GOLDBERG *et al.*, 1998; JACQUES *et al.*, 2000a). Cependant, son effet sur l'endothélium endocardique n'a jamais été rapporté. Les résultats de cette thèse montrent, pour la première fois, la présence du NPY et de ses récepteurs dans les cellules endothéliales endocardiques d'origine fœtale humaine à différents stades de développement ainsi que du rat adulte. De plus, nos résultats montrent que le NPY module les niveaux du calcium cytosolique et nucléaire de ces cellules.

Dans la première partie de notre étude, nous avons démontré la présence de récepteurs au NPY sur l'endothélium endocardique au niveau du coeur intact. Nos résultats sont donc la première preuve démontrant la présence des récepteurs pour le NPY sur l'endothélium endocardique fœtal humain. En tenant compte de ces résultats nous avons poursuivi nos études au niveau cellulaire afin de vérifier la présence des récepteurs du NPY au niveau des cellules isolées de l'endothélium endocardique du cœur fœtal humain.

Les cellules endothéliales endocardiques ont été isolées des ventricules gauches et droits des coeurs fœtaux humains âgés de 13, 17, et 20 semaines. La méthode et les conditions de culture sont similaires à ceux déjà publié par JACQUES *et al* (2000) et BKAILY *et al* (1999). Nos résultats ont démontré, en utilisant des sondes fluorescentes pour différentes organelles cellulaires et la microscopie confocale, que nos cellules sont caractérisées par la présence d'un grand nombres de mitochondries et d'un réseau bien développé de réticulum

endoplasmique qui entourent un large noyau (JACQUES *et al.*, 2000). D'autres études ont aussi démontré que les cellules endothéliales endocardiques sont caractérisées par la présence d'un appareil de Golgi bien développé (BRUTSAERT et ANDRIES, 1992; ANDRIES 1994). Tous ces résultats suggèrent que les cellules endothéliales endocardiques sont des cellules métaboliquement actives.

Ces cellules ont donc été utilisées dans tous nos protocoles expérimentaux. De façon subséquente, nos premières expériences sur les cellules isolées ont démontré, tout comme au niveau du cœur intact, la présence de récepteurs au niveau de la membrane plasmique des CEEs. L'utilisation de la microscopie confocale dans cette étude a permis de visualiser en 3-D la distribution de ces récepteurs sur la membrane de surface des cellules endothéliales endocardiques. Nos résultats montrent que ces récepteurs sont distribués d'une façon très hétérogène et une partie de ces récepteurs sont regroupés en amas. Ce patron de distribution des récepteurs a également été rapporté par notre groupe pour les récepteurs de l'ET-1 et de l'AngII au niveau des cellules cardiaques d'embryons de poulet et des cellules endothéliales aortiques humaines (BKAILY *et al.*, 1997).

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* et chez différentes espèces ont démontré que le récepteur Y₁ et le NPY jouent un rôle important dans le système cardiovasculaire (DOODS *et al.*, 1995; ABOUNADER *et al.*, 1995; ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1995; MODIN *et al.*, 1995; JACQUES *et al.*, 2000a). De plus, des études récentes ont démontré que le NPY est présent dans les

cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998a). En se basant sur ces données, nous avons étudié la présence et la distribution du NPY et du récepteur Y_1 dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines. L'utilisation de l'immunofluorescence indirecte et de la microscopie confocale nous a permis de visualiser en 3-D la distribution du peptide et de son récepteur et de mesurer l'intensité de fluorescence du marquage du NPY et du récepteur Y_1 dans les différents compartiments cellulaires.

Nos résultats ont démontré que l'expression du récepteur Y_1 augmente en fonction de l'âge dans les CEEGs et les CEEDs. À 13 et 17 semaines, la densité du récepteur Y_1 est plus élevée au niveau des CEEDs par rapport au CEEGs. Cependant, à 20 semaines, la densité de ce récepteur devient plus élevée au niveau des CEEGs par rapport au CEEDs. De même, en utilisant les mêmes approches expérimentales, nos résultats démontrent que l'expression du NPY varie en fonction de l'âge fœtal et que cette variation est différente au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs. Au niveau des CEEDs, l'expression du NPY augmente en fonction de l'âge fœtal pour atteindre un maximum d'intensité à 20 semaines. Par contre, au niveau des CEEGs, le maximum d'immunoréactivité du NPY est observé à 13 semaines, diminue à 17 semaines et augmente de nouveau à 20 semaines pour atteindre un niveau moindre par rapport à celui observé à 13 semaines. Nos résultats démontrent donc, la présence du NPY et du récepteur Y_1 dans les cellules endothéliales endocardiques du cœur fœtal humain à différents

stades de développement. De plus, nos résultats montrent une différence marquée dans l'immunoréactivité du NPY et du récepteur Y_1 entre les CEEGs et les CEEDs. En comparaison avec nos résultats, MARRON et ses collaborateurs (1994) ont démontré que chez l'homme adulte, le NPY ainsi que d'autres neurotransmetteurs comme la norépinéphrine, la somatostatine, le VIP, la substance P et l'acétylcholine sont présents dans le plexus neuronal de la matrice sous-endothéliale endocardique avec une immunoréactivité pour le NPY plus marquée par rapport aux autres neurotransmetteurs. Leurs résultats démontrent également que la densité du NPY est plus élevée dans ce plexus neuronal du côté droit par rapport au côté gauche du cœur et au niveau ventriculaire par rapport au niveau auriculaire. Tous ces résultats ainsi que les résultats de cette thèse suggèrent que le NPY et le récepteur Y_1 jouent un rôle dans le développement et le bon fonctionnement du cœur fœtal et que déjà à 13 semaines des différences marquées existent entre les CEEs isolées du ventricule droit par rapport au ventricule gauche.

En accord avec nos résultats, plusieurs études ont démontré que les neurotransmetteurs comme la sérotonine, la noradrénaline et l'acétylcholine jouent un rôle très important dans le contrôle de la différenciation cellulaire ainsi que dans l'organisation structurale des tissus des mammifères (VERNADAKIS et GIBSON, 1974; LAUDER et KREBS, 1978; LOVELL, 1982; NAVARO *et al.*, 1989). Chez le rat, ainsi que chez d'autres espèces, le développement des projections sympathiques dans les tissus périphériques comme le cœur, le foie et

les reins ne se fait qu'après la naissance (PAPPANO, 1981; SLOTKIN, 1986; 1986a). Si les neurotransmetteurs sympathiques jouent un rôle dans la régulation du développement fœtal de ces tissus, comment ce phénomène peut-il avoir lieu?

Des études récentes ont démontré qu'à un stade très précoce de la vie embryonnaire, le cœur de mammifère peut être une source de catécholamines (EBERT *et al.*, 1996; HUANG *et al.*, 1996). De plus, les enzymes impliqués dans la biosynthèse des catécholamines ont été détectés dans le cœur embryonnaire bien longtemps avant l'établissement de l'innervation sympathique et la production des catécholamines par les cellules chromaffines de la medullo surrénale (EBERT *et al.*, 1996; HUANG *et al.*, 1996). En 2001, EBERT et THOMPSON ont démontré qu'à des stades précoces de la vie embryonnaire, les cellules produisant les catécholamines dans le cœur de rat n'ont pas une origine neuronale mais sont plutôt dérivées du myocarde primitif. Il est bien connu que le NPY est un neurotransmetteur qui est colocalisé avec la noradrénaline dans les neurones sympathiques (LUNDBERG *et al.*, 1982a; 1983) et qui est aussi abondant dans les cellules chromaffines de la medullo surrénale (ALLEN *et al.*, 1983). De plus, des études récentes ont démontré que le NPY peut avoir un effet angiogène sur les cellules endothéliales vasculaires, un effet mitogène sur les cellules du muscle lisse vasculaire ainsi qu'un effet hypertrophique sur les cellules cardiaques (ZUKOWSKA-GROJEC *et al.*, 1998; 1998a; MILLAR *et al.*, 1994; GOLDBERG *et al.*, 1998). En tenant compte de toutes ces données et des résultats que nous avons obtenu, nous pouvons suggérer qu'au cours du

développement embryonnaire du cœur fœtal humain, les cellules endothéliales endocardiques peuvent être aussi une source potentielle de NPY. Ainsi, ce neuropeptide pourrait être impliqué dans la maturation et le bon fonctionnement du cœur fœtal humain. Ces résultats suggèrent aussi que la densité des récepteurs Y_1 augmente durant la différenciation des CEEs et ce type de récepteur peut jouer un rôle important dans la régulation de la fonction de ces cellules.

Plusieurs groupes ont étudié le profil ontogénique du NPY et du récepteur Y_1 , dans différents systèmes et plus particulièrement au niveau du système nerveux central (McDONALD *et al.*, 1982; DiMAGGIO *et al.*, 1985; TONG *et al.*, 1997). Au niveau du cerveau de rat, l'immunoréactivité du NPY commence à apparaître au treizième jour de gestation (FOSTER et SHULTZBERG, 1984; WOODHAMS *et al.*, 1985). Cependant, l'apparition de l'immunoréactivité du NPY varie d'une région du cerveau à une autre. Par exemple, au niveau du tronc cérébral, l'immunoréactivité du NPY est détectée à partir du treizième jour de gestation mais au niveau du tubercule olfactif et les noyaux du thalamus, l'immunoréactivité du NPY est observé au jour quinze de la vie embryonnaire (FOSTER et SHULTZBERG, 1984; WOODHAMS *et al.*, 1985), alors qu'au niveau du cortex, le NPY est détecté seulement au dix-septième jour de gestation (FOSTER et SHULTZBERG, 1984; WOODHAMS *et al.*, 1985; CHUN *et al.*, 1987; CAVANAGH et PARNAVELAS, 1990). Par la suite, le NPY augmente graduellement dans les différentes régions du cerveau et ce jusqu'après la naissance (FOSTER et SHULTZBERG, 1984; WOODHAMS *et al.*, 1985; CHUN

et al., 1987; CAVANAGH et PARNAVELAS, 1990). En ce qui concerne l'expression du récepteur Y_1 durant le développement, TONG et ses collaborateurs (1997) ont démontré que l'ARNm du récepteur Y_1 est exprimé dans le cerveau de rat dès le douzième jour de gestation. Cependant, en utilisant le [125 I][Leu 31 , Pro 34]PYY (un agoniste des récepteurs Y_1 , Y_4 et Y_5) et la technique d'autoradiographie quantitative, ils ont démontré la présence de récepteurs Y_1 , Y_4 et Y_5 à partir du quatorzième jour de gestation. Les auteurs ont également rapporté que l'ARNm du récepteur Y_1 augmente en fonction de l'âge pour atteindre un plateau à la naissance et qu'il reste élevé au cours des deux premières semaines après la naissance pour atteindre un niveau comparable à celui de l'adulte vers la fin de la troisième semaine postnatale. En parallèle, la liaison du [125 I][Leu 31 , Pro 34]PYY augmente durant le développement du cerveau pour atteindre un plateau vers la fin de la troisième semaine postnatale. Dans certaines régions du cerveau, comme par exemple dans le cortex cérébral, la liaison spécifique du [125 I][Leu 31 , Pro 34]PYY diminue légèrement avant d'atteindre un patron de distribution comparable à l'adulte. Ces résultats montrant une augmentation de l'expression du récepteur Y_1 en fonction de l'âge, sont en accord avec nos présents résultats obtenus avec les cellules endothéliales endocardiques du cœur fœtal humain. Il est à noter que le patron et les niveaux d'expression du NPY et du récepteur Y_1 durant le développement du cerveau de rat sont assez similaires (FOSTER et SHULTZBERG, 1984; WOODHAMS *et al.*, 1985; TONG *et al.*, 1997). En accord avec ces études, nos résultats montrent qu'au niveau des CEEGs

et des CEEDs, l'expression du récepteur Y_1 augmente progressivement durant l'embryogenèse pour atteindre un niveau maximal à 20 semaines. Cependant, contrairement aux études rapportées, l'expression du NPY au niveau des CEEGs ne suit pas le même patron d'expression que le récepteur Y_1 ; celui-ci étant très élevé à 13 semaines, diminuant à 17 semaines et ré-augmentant à 20 semaines mais atteignant un niveau moindre qu'à 13 semaines. L'expression précoce du NPY et du récepteur Y_1 suggère qu'ils jouent un rôle important dans le développement normal du cœur humain.

D'autre part, nos résultats démontrent que le NPY et le récepteur Y_1 sont présents non seulement au niveau de la membrane plasmique des CEEGs et des CEEDs mais aussi au niveau du cytosol et plus particulièrement au niveau nucléaire et surtout dans la région périnucléaire et ceci à 13, 17 et 20 semaines. Récemment, plusieurs groupes incluant le nôtre, ont démontré la présence de récepteurs couplés aux protéines G au niveau nucléaire (HOSHER *et al.*, 1992; BOOZ *et al.*, 1992; BKAILY *et al.*, 1997; 2000; 2002; BHATTACHARYA *et al.*, 1999; GOBEIL *et al.*, 2002). L'activation de ces récepteurs de l'enveloppe nucléaire peut donc avoir un effet direct sur le noyau. Par exemple, l'activation des récepteurs ET_B de l'endothéline-1 et AT_1 de l'angiotensine II au niveau nucléaire est capable d'induire une augmentation du $[Ca]_n$ (BKAILY *et al.*, 1997, 2002, CHOUFANI, 2002). De plus, ces études ont démontré que les récepteurs de l'ET-1 au niveau nucléaire sont 10 fois plus sensibles à l'ET-1 que les récepteurs présents au niveau de la membrane de surface. Ces auteurs ont également rapporté

que l'augmentation du $[Ca]_n$, suite à l'activation de ces récepteurs, peut-être due à l'activation du canal calcique de type R présent au niveau du noyau (BKAILY, 1994). D'autre part, GOBEIL et ses collaborateurs (2002) ont rapporté que le récepteur EP₃ de la prostaglandine E₂ est présent au niveau de la membrane nucléaire des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux et que l'activation de ce récepteur induit l'expression de la eNOS dans ces cellules. Ils ont démontré aussi que les effets médiés par l'activation du récepteur EP₃ au niveau nucléaire sont différents de ceux observés par l'activation de ce même récepteur au niveau de la membrane de surface (GOBEIL *et al.*, 2002).

Plusieurs groupes ont étudié l'effet du NPY sur le calcium intracellulaire de différentes préparations cellulaires comme les cellules cardiaques d'embryons de poulet, les cellules du muscle lisse aortique humaine et de porc ainsi qu'au niveau des lignés des cellules HEL et CHO-K1 (MOTULSKY et MICHEL, 1988; MIHARA *et al.*, 1990; HERZOG *et al.*, 1992; JACQUES *et al.*, 2000a). Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons examiné l'effet du NPY sur les niveaux calciques cytosoliques et nucléaires des CEEGs et des CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 13, 17 et 20 semaines et de rats adultes. Nos résultats montrent que le NPY induit une augmentation dose-dépendante du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$. Dans les CEEDs âgées de 13, 17 et 20 semaines, les EC₅₀ obtenus sont de l'ordre de 10⁻¹⁰ M dans le cytosol et le noyau. De plus, au niveau des CEEGs âgées de 13 et 17 semaines, les EC₅₀ sont aussi de l'ordre de 10⁻¹⁰ M dans le cytosol et le noyau. Cependant, à 20 semaines et chez le rat adulte, les CEEGs

deviennent plus sensibles au NPY avec des EC_{50} de l'ordre de 10^{-11} M dans le cytosol et le noyau. D'autre part, que ce soit à 13, 17 ou 20 semaines les EC_{50} sont similaires au niveau du noyau et du cytosol, suggérant que l'augmentation du $[Ca]_n$ est la conséquence directe de l'élévation du $[Ca]_c$ (BKAILY *et al.*, 1996; 1997). Il semble donc que les CEEDs sont hautement différenciées du point de vue pharmacologique dès l'âge fœtal de 13 semaines. Cependant, au niveau des CEEGs, la pharmacologie des récepteurs au NPY devient similaire à celle de l'adulte seulement à l'âge fœtal de 20 semaines. Ces résultats suggèrent comme il a été démontré pour les myocytes cardiaques que les CEEs isolées à partir du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines sont déjà complètement différenciées (BKAILY *et al.*, 1995). Nos résultats démontrent également qu'à 20 semaines et chez le rat adulte, les EC_{50} des CEEGs sont plus faibles que celles obtenues au niveau des CEEDs, suggérant encore une fois l'existence d'une différence entre les CEEGs et les CEEDs. Une telle différence a été aussi rapportée par notre groupe pour l'effet de l'ET-1 sur les CEEGs et les CEEDs du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines (JACQUES *et al.*, 2000). Les résultats de cette étude ont démontré qu'au niveau des CEEGs, les valeurs des EC_{50} cytosoliques et nucléaires sont de l'ordre de 10^{-11} M, cependant, au niveau des CEEDs les valeurs sont de l'ordre de 10^{-10} M. Nos résultats démontrent également qu'une très faible concentration de NPY i.e 10^{-17} M est capable d'induire une augmentation du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ à la fois dans les CEEGs et les CEEDs âgées de 20 semaines, suggérant ainsi que ces cellules sont très sensibles au NPY et que ce peptide

semble jouer un rôle important dans la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire des CEEs au repos. De plus, nos résultats suggèrent que l'augmentation du $[Ca]_i$ par le NPY peut contribuer au relâchement de médiateurs cardioactifs pouvant affecter non seulement la contractilité du myocarde (BRUTSAET et ANDRIES, 1992; SHAH, 1996) mais aussi l'excitation sécrétion des cellules sécrétrices telles que les CEEs.

Suite à ces résultats nous avons vérifié quels sont les types de récepteurs impliqués dans l'effet du NPY sur l'augmentation du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ dans les CEEGs et les CEEDs isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. En utilisant des antagonistes sélectifs du récepteur Y_1 , le BIBO3304 et du récepteur Y_2 , le BIIE0246, nos résultats démontrent que dans les CEEGs, l'effet du NPY sur l'augmentation du $[Ca]_i$ est surtout médié via l'activation du récepteur Y_1 tandis qu'au niveau des CEEDs, l'effet du NPY est médié via l'activation du récepteur Y_1 et Y_2 . Ces résultats suggèrent, encore une fois, la présence d'une différence entre les CEEGs et les CEEDs en ce qui concerne la densité et le type de récepteurs présents dans ces deux types de CEEs.

Dans la dernière partie de notre étude, nous avons déterminé si l'augmentation du $[Ca]_i$ dans les CEEGs et les CEEDs pouvait avoir un effet sur la synthèse et la sécrétion du NPY par ces cellules. Plusieurs études ont rapporté que ces deux phénomènes nécessitent une activité nerveuse très élevée suivit par une augmentation significative du calcium intracellulaire via l'activation des canaux calciques dépendants du voltage de type N (HAASS *et al.*, 1990;

SCHALLING *et al.*,1991). Très récemment, notre groupe a démontré que l'activation soutenue des canaux calciques dépendants du voltage de type R des CEEs par une dépolarisation soutenue à l'aide d'une haute concentration de KCl (30 mM), induit une augmentation soutenue du $[Ca]_c$ et du $[Ca]_n$ (JACQUES *et al.*, 2000). Nos résultats démontrent, en utilisant différentes approches techniques, qu'au niveau contrôle, la concentration du NPY dans les CEEDs est beaucoup plus élevée que dans les CEEGs. Suite à la stimulation des CEEDs avec une dépolarisation soutenue de la membrane (30 mM KCl), nos résultats démontrent que ces cellules sont capables de sécréter le NPY dans le milieu extracellulaire 10 minutes après la dépolarisation soutenue. De plus, la concentration du NPY dans le milieu extracellulaire augmente pour atteindre un niveau maximal après 60 minutes de dépolarisation soutenue. Ces résultats suggèrent que le NPY relâché par ces cellules peut agir d'une façon autocrine et paracrine au niveau du plexus neuronal ou des cardiomyocytes adjacents ainsi que sur les CEEs elles mêmes. Au niveau des CEEGs, l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$ n'induit pas le relâchement du NPY dans le milieu extracellulaire même après 60 minutes de dépolarisation membranaire. Par contre, suite à la dépolarisation soutenue, on observe une augmentation de la concentration du NPY à l'intérieur de ces cellules suggérant que l'augmentation soutenue du $[Ca]_i$ induit la synthèse *de novo* du NPY dans les CEEs isolées du ventricule gauche mais pas au niveau de celles isolées à partir du ventricule droit. L'augmentation de la concentration intracellulaire du NPY dans les CEEGs et l'incapacité de ces cellules à sécréter ce peptide peut être expliqué

de deux façons : 1) l'augmentation du NPY dans le milieu intracellulaire des CEEGs peut servir à activer les récepteurs Y_1 au niveau nucléaire et périnucléaire; 2) les CEEs isolées du ventricule gauche nécessitent une dépolarisation soutenue plus longue que les CEEDS afin qu'elles puissent accumuler assez de NPY pour accomplir sa fonction de base et pouvoir en sécréter par la suite. Que ce soit l'une ou l'autre de ces possibilités, celles-ci devront être vérifiées dans le futur. De plus, ces résultats démontrent encore une fois, une différence entre les CEEGs et les CEEDs.

En conclusion, nos résultats démontrent: 1) que les cellules endothéliales endocardiques sont des cellules métaboliquement actives; 2) que soit à 13, 17 et 20 semaines, les CEEs contiennent du NPY et possèdent des récepteurs au NPY et plus particulièrement le type Y_1 ; 3) que la distribution et la densité relative du récepteur Y_1 et du NPY sont très différents dans les CEEGs par rapport aux CEEDs. L'expression du récepteur Y_1 augmente en fonction de l'âge dans les CEEGs et les CEEDs. À 13 et 17 semaines, la densité du récepteur Y_1 est plus élevée au niveau des CEEDs par rapport au CEEGs. Cependant, à 20 semaines, la densité de ce récepteur devient plus élevée au niveau des CEEGs par rapport au CEEDs. En ce qui concerne le NPY, au niveau des CEEDs, son expression augmente en fonction de l'âge pour atteindre un maximum à 20 semaines. Par contre, au niveau des CEEGs, le maximum d'immunoréactivité du NPY est observé à 13 semaines, diminue à 17 semaines et augmente de nouveau à 20 semaines pour atteindre un niveau moindre par rapport à celui observé à 13

semaines.; 4) que le NPY et le récepteur Y_1 sont présents non seulement au niveau de la membrane plasmique des CEEGs et des CEEDs mais aussi au niveau du cytosol et plus particulièrement au niveau nucléaire et surtout dans la région périnucléaire et ceci à 13, 17 et 20 semaines; 5) que le NPY induit une augmentation dose-dépendante de la concentration du $[Ca]_c$ et $[Ca]_n$ à la fois dans les CEEGs et les CEEDs âgées de 13, 17 et 20 semaines; 6) que la pharmacologie des récepteurs au NPY au niveau des CEEDs fœtales humaines est semblable à celle observée au niveau des CEEDs de rats adultes et ce dès l'âge de 13 semaines; 7) que l'homologie entre les cellules d'origine fœtale et adulte est observée au niveau des CEEGs à l'âge de 20 semaines; 8) à 20 semaines les CEEGs et les CEEDs fœtales humaines constituent un excellent modèle pour les études pharmacologiques des récepteurs NPY chez l'adulte; 9) que l'effet du NPY dans les CEEGs est relayé via l'activation du récepteur Y_1 tandis que, l'effet du NPY dans les CEEDs est dû à l'activation des récepteurs Y_1 et Y_2 , et finalement 10) que l'augmentation du $[Ca]_i$ dans les CEEDs induit la sécrétion du NPY dans le milieu extracellulaire tandis que, dans les CEEGs, l'augmentation du $[Ca]_i$ induit la synthèse *de novo* du NPY.

V. REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier chaleureusement le Dr. Danielle Jacques qui m'a accueilli à bras ouvert dans son laboratoire. Sa confiance, la liberté mais aussi l'encadrement qu'elle m'a donné, m'ont permis d'effectuer mes études doctorales dans un milieu enrichissant. Je lui dois ma profonde gratitude et tout mon respect.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance à mon co-directeur, le Dr. Ghassan Bkaily, qui a été toujours présent tout le long de ma formation en recherche. Je le remercie pour son support et ses précieux conseils qui m'ont beaucoup aidé tout le long de mes études.

Je tiens à remercier sincèrement mes collègues de laboratoire, Joe, Nelly, Sama, Nesrine, Hadia, Rami, Claudine, Ghada Kurban, Maud, Johnny, Magda, Moni, Mirna et plus particulièrement Sanaa et Ghada Hassan, qui ont contribué, au cours des années de maintenir un climat de travail où régnait l'entraide et la collaboration. Je remercie aussi Pierre Pothier, Ghassan Bkaily jr. et Dani Bkaily pour leur assistance technique.

De plus, je tiens à remercier tous les membres du département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire incluant les professeurs, les étudiants, les assistants de recherche et les secrétaires pour leur aide et leur support.

Finalement, je remercie sincèrement les Docteurs Mohamed Chahine, Pierre Sirois, Jacques Bérard, Danielle Jacques et Ghassan Bkaily pour avoir accepté de corriger cette thèse.

Le support financier de ce travail a été assuré par les subventions de recherche de l'institut de recherche en santé du Canada (IRSC) pour Dr. Danielle Jacques. No: MOP-42472.

VI. BIBLIOGRAPHIE

ABOUNADER R., VILLEMURE JG. et HAMEL E. (1995). Characterization of neuropeptide Y (NPY) receptors in human cerebral arteries with selective agonists and the new Y1 antagonist BIBP 3226. *Br. J. Pharmacol.* **116**: 245-50.

AIZAWA Y., NIWANO S., AIZAWA M., TAMURA M. et SHIBATA A. (1989). Attenuation of the vasoconstrictor action of neuropeptide-Y by calcium-channel blockers. *Angiology.* **40**: 890-4.

ALLEN J., NOVOTNY J., MARTIN J. et HEINRICH G. (1987). Molecular structure of mammalian neuropeptide Y: analysis by molecular cloning and computer-aided comparison with crystal structure of avian homologue. *Proc. Nat. Acad. Sci.(USA).* **84**: 2532-6.

ALLEN JM., ADRIAN TE., POLAK JM. et BLOOM SR. (1983). Neuropeptide Y (NPY) in the adrenal gland. *J. Auton. Nerv. Syst.* **9**: 559-63.

ALLEN JM., BIRCHAM PM., BLOOM SR. et EDWARDS AV. (1984). Release of neuropeptide Y in response to splanchnic nerve stimulation in the conscious calf. *J. Physiol.* **357**: 401-8.

ALLEN JM., BIRCHAM PM., EDWARDS AV., TATEMOTO K. et BLOOM SR. (1983a). Neuropeptide Y (NPY) reduces myocardial perfusion and inhibits the force of contraction of the isolated perfused rabbit heart. *Regul. Pept.* **6**: 247-53.

ALLEN JM. et BALBI D. (1993). Structure and expression of the neuropeptide Y gene. In: *Colmers WF, Wahlestedt C (Eds). The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides.* Totowa, NJ: Humana Press, pp 41-64.

ALLEN JM., GJORSTRUP P., BJORKMAN JA., EK L., ABRAHAMSSON T. et BLOOM SR. (1986). Studies on cardiac distribution and function of neuropeptide Y. *Acta Physiol. Scand.* **126**: 405-11.

ALLEN JM., POLAK JM., RODRIGO J., DARCY K. et BLOOM SR. (1985). Localisation of neuropeptide Y in nerves of the rat cardiovascular system and the effect of 6-hydroxydopamine. *Cardiovasc. Res.* **19**: 570-7.

ALLEN LG., KALRA PS., CROWLEY WR. et KALRA SP. (1985a). Comparison of the effects of neuropeptide Y and adrenergic transmitters on LH release and food intake in male rats. *Life Sci.* **37**: 617-23.

ALUMETS J., HAKANSON R. et SUNDLER F. (1978). Distribution, ontogeny and ultrastructure of pancreatic polypeptide (PP) cells in the pancreas and gut of the chicken. *Cell. Tissue Res.* **194**: 377-86.

ANDRIES LJ. (1994). In: *Endocardial endothelium : Functional Morphology*. Austin, TX, Landes, p. 143.

ANDRIES LJ. et BRUTSAERT DL. (1990). Differences in functional structure between endocardial endothelium and vascular endothelium (abstract). *Eur. Heart. J.* **11**: 78.

ANDRIES LJ. et BRUTSAERT DL. (1991). Differences in functional structure between endocardial endothelium and vascular endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **3**: S243-46.

ANDRIES LJ. et BRUTSAERT DL. (1994). Endocardial endothelium in the rat: junctional organization and permeability. *Cell. Tissue Res.* **277**: 391-400.

ANVERSA P., GIACOMELLI J. et WIENER J. (1975). Intercellular junctions of rat endocardium. *Anat. Rec.* **183**: 477-83.

BAKER PF., HODGKIN AL. et RIDGWAY EB. (1971). Depolarisation and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol. (London)* **218**: 709-755.

BALASUBRAMANIAM A., SHERIFF S., FERGUSON DG., STEIN M. et RIGEL DF. (1990). N-alpha-biotinylated-neuropeptide Y analogs: syntheses, cardiovascular properties, and application to cardiac NPY receptor visualization. *Peptides.* **11**: 1151-6.

BARD JA., WALKER MW., BRANCHEK TA. et WEINSHANK RL. (1995). Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y, and peptide YY. *J. Biol. Chem.* **270**: 26762-5.

BECK-SICKINGER, A. (1997): The importance of various part of the NPY molecule for receptor recognition. In: Grundemar, L., Bloom, SR. (Eds), *Neuropeptide Y and Drug Development*. London: Academic Press, pp. 107-126.

BECK-SICKINGER, A. (1999): Molecular characterization of Y receptors. Conf Proc, 5th Int NPY Meet, Cayman Island, April 17-22, 1999.

BERGSTROM S. (1967). Prostaglandins: members of a new hormonal system. These physiologically very potent compounds of ubiquitous occurrence are formed from essential fatty acids. *Science.* **157**: 82-91.

BERNET F., MAUBERT E., BERNARD J., MONTEL V. et DUPOUY JP. (1994). In vitro steroidogenic effects of neuropeptide Y (NPY1-36), Y1 and Y2 receptor agonists (Leu31-Pro34 NPY, NPY18-36) and peptide YY (PYY) on rat adrenal capsule/zona glomerulosa. *Regul. Pept.* **52**:187-93.

BERRIDGE MJ. (1993). Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature.* **365**(6445):388-9.

BHATTACHARYA M., PERI K., RIBEIRO-DA-SILVA A., ALMAZAN G., SHICHI H., HOU X., VARMA DR. et CHEMTOB S. (1999). Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **274**: 15719-24.

BISCHOFF A. et MICHEL MC. (1999). Emerging functions for neuropeptide Y5 receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**: 104-6.

BITRAN M., DANIELS AJ. et BORIC MP. (1997). GW1229, a novel neuropeptide Y Y1 receptor antagonist, inhibits the vasoconstrictor effect on neuropeptide Y in the hamster microcirculation. *Eur. J. Pharmacol.* **319**: 43-7.

BKAILY G. (1991). Receptor and second messenger modulation of Ca²⁺ and K⁺ channels activity in vascular smooth muscle cells. In: *Ion channels of vascular smooth muscle cells and endothelial cells.* Eds. N. Sperelakis and H. Kuriyama. NewYork: Elsevier pp: 185-198.

BKAILY G. (ed) (1994). Biophysical and pharmacological properties of T-, L- and R-type Ca²⁺ channels. In: *Ionic Channels in Vascular Smooth Muscle.* R.G. Landes Company, Austin, pp: 9-21.

BKAILY G. (ed) (1994a). Regulation of R-type Ca²⁺ channels by insulin and ET-1 in VSM. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle.* Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 41-52.

BKAILY G. (ed) (1994b). Regulation of Ca²⁺ channels in VSM by monocyte-released factors. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle.* Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 53-64.

BKAILY G. (ed) (1994c). The possible role of Ca²⁺ and K⁺ channels in vascular smooth muscle pathophysiology. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle.* Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 103-113.

BKAILY G. (ed) (1994d). cGMP-sensitive K⁺ channels in VSM. In: *Ionic Channel In Vascular Smooth Muscle.* Mol Biol Intelligence Unit, Austin, pp 87-102.

BKAILY G., CHOUFANI S., HASSAN G., EL-BIZRI N., JACQUES D. et D'ORLEANS-JUSTE P. (2000). Presence of functional endothelin-1 receptors in nuclear membranes of human aortic vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**: 414-7.

BKAILY G., D'ORLÉANS-JUSTE P., NAIK R., PÉRODIN J., STANKOVA J., ABDULNOUR E. et ROLA-PLESZCZYNSKY M. (1993). PAF activation of a voltage-gated R-type Ca^{2+} channel in human and canine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **110** : 519-520.

BKAILY G., D'ORLÉANS-JUSTE P., POTHIER P., CALIXTO J B. et YUNES R. (1997a). Nuclear membrane receptors and channels : Potential therapeutical targets for drug action. *Drug Dev. Res.* **42** : 211-222.

BKAILY G., ECONOMOS DL. POTVIN JL. ARDILOUZE C. MARRIOTT J. CORCOS D. BONNEAU C. et FONG N. (1992). Blockade of insulin sensitive steady-state R-type Ca^{2+} channel by PN 200-110 in heart and vascular smooth muscle. *Mol. Cell Biochem.* **177**: 93-106.

BKAILY G., GROS-LOUIS N., NAIK R., JAALOUK D. et POTHIER P. (1996). Implication of the nucleus in excitation contraction coupling of heart cells. *Mol. Cell Biochem.* **154**: 113-121.

BKAILY G., JACQUES D. et POTHIER P. (1999). Use of confocal microscopy to investigate cell structure and function. *Methods Enzymol.* **307**: 119-35.

BKAILY G., POTHIER P., D'ORLEANS-JUSTE P., SIMAAN M., JACQUES D., JAALOUK D., BELZILE F., HASSAN G., BOUTIN C., HADDAD G. et NEUGEBAUER W. (1997). The use of confocal microscopy in the investigation of cell structure and function in the heart, vascular endothelium and smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* **172**: 171-94.

BKAILY G., SLEIMAN S., ASSELIN C., STEPHAN J., CHOUFANI S., JACQUES D. et D'ORLÉANS-JUSTE P. (2002). Angiotensin II AT1 receptor internalization and translocation modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* (en press).

BKAILY G. et SPERELAKIS N. (1985). Injection of guanosine 5'-cyclic monophosphate into heart cells blocks calcium slow channels. *Am. J. Physiol.* **248**: 745-9.

BKAILY G., WANG S., BUI M. ET MÉNARD D. (1995). ET-1 stimulates Ca^{2+} currents in cardiac cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**: 293-6.

BLEAKMAN D., MILLER R.J. et COLMERS WF. (1993). Action of neuropeptide Y on electrophysiological properties of nerve cells. *In: Colmers WF, Wahlestedt C (Eds), The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides.* Totowa, NJ: Humana Press, pp 241-272.

BLOMQVIST AG. et HERZOG H. (1997). Y-receptor subtypes--how many more?. *Trends in Neurosci.* **20**: 294-8.

BLOMQVIST AG., ROUBOS EW., LARHAMMAR D. et MARTENS GJ. (1995). Cloning and sequence analysis of a neuropeptide Y/peptide YY receptor Y1 cDNA from *Xenopus laevis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1261**: 439-41.

BOLTON TB. (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* **59**: 606-718.

BOOZ GW., CONRAD KM., HESS AL., SINGER HA. et BAKER KM. (1992). Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology.* **130**: 3641-9.

BOROWSKY B., WALKER MW., BARD J., WEINSHANK RL., LAZ TM., VAYSSE P., BRANCHEK TA. et GERALD C. (1998). Molecular biology and pharmacology of multiple NPY Y5 receptor species homologs. *Regul. Pept.* **75-76**: 45-53.

BRISMAR H., ASGHAR M., CAREY RM., GREENGARD P. et APERIA A. (1998). Dopamine-induced recruitment of dopamine D1 receptors to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA).* **95**: 5573-8.

BROOME M., HOKFELT T. et TERENIUS L. (1985). Peptide YY (PYY)-immunoreactive neurons in the lower brain stem and spinal cord of rat. *Acta Physiol. Scand.* **125**: 349-52.

BRUTSAERT DL. et ANDRIES LJ. (1992). The endocardial endothelium. *Am. J. Physiol.* **263**: H985-1002.

BRUTSAERT DL., De KEULENAER GW., FRANSEN P., MOHAN P., KALUZA GL., ANDRIES LJ., ROULEAU JL. et SYS SU. (1996). The cardiac endothelium: functional morphology, development, and physiology. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **39**: 239-62.

BRUTSAERT DL., FRANSEN P., ANDRIES LJ., De KEULENAER GW. et SYS SU. (1998). Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovasc. Res.* **38**: 281-90.

BRUTSAERT DL., MEULEMANS AL., SIPIDO KR. et SYS SU. (1988). Effects of damaging the endocardial surface on the mechanical performance of isolated cardiac muscle. *Circ. Res.* **62**: 358-66.

BURKHOF A., LINEMEYER DL. et SALON JA. (1998). Distribution of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor gene and its absence in rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **53**: 311-6.

CARTER TD. et PEARSON JD. (1992). Regulation of prostacyclin synthesis in endothelial Cells. *News. Physiol. Sci.* **7**: 64-69.

CAVANAGH ME. et PARNAVELAS JG. (1990). Development of neuropeptide Y (NPY) immunoreactive neurons in the rat occipital cortex: a combined immunohistochemical-autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* **297**: 553-63.

CHOUFANI S. (2002). L'endothéline-1 module le calcium cytosolique et nucléaire ainsi que la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules du muscle lisse aortique humain. *Université de Sherbrooke*.

CHUA BH., CHUA CC., DIGLIO CA. et SIU BB. (1993). Regulation of endothelin-1 mRNA by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1178**: 201-6.

CHUN JJ., NAKAMURA MJ. et SHATZ CJ. (1987). Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide-immunoreactive neurons. *Nature.* **325**: 617-20.

CINES DB., POLLAK ES., BUCK CA., LOSCALZO J., ZIMMERMAN GA., MCEVER RP., POBER JS., WICK TM., KONKLE BA., SCHWARTZ BS., BARNATHAN ES., MCCRAE KR., HUG BA., SCHMIDT AM. et STERN DM. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* **91**: 3527-61.

CLARK JD., SCHIEVELLA AR., NALEFSKI EA. et LIN LL. (1995). Cytosolique phospholipase A₂. *J. Lipid. Mediat Cell Signal.* **12**: 83-117.

COLMERS WF. et BLEAKMAN D. (1994). Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons. *Trends Neurosci.* **17**: 373-9.

CORABOEUF E. et VASSORT G. (1968). Effects of some inhibitors of ionic permeabilities on ventricular action potential and contraction of rat and guinea-pig hearts. *J. Electrocardiol.* **1**: 19-29.

CORR LA., ABERDEEN JA., MILNER P., LINCOLN J. et BURNSTOCK G. (1990). Sympathetic and nonsympathetic neuropeptide Y-containing nerves in the rat myocardium and coronary arteries. *Circ. Res.* **66**: 1602-9.

COUTTENYE MM., De CLERCK NM., HERMAN AG. et BRUTSAERT DL. (1985). Effects of prostacyclin on contractile properties of isolated mammalian cardiac muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **7**: 971-6.

CRISCIONE L., RIGOLLIER P., BATZL-HARTMANN C., RUEGER H., STRICKER-KRONRAD A., WYSS P., BRUNNER L., WHITEBREAD S., YAMAGUCHI Y., GERALD C., HEURICH RO., WALKER MW., CHIESI M., SCHILLING W., HOFBAUER KG. et LEVENS N. (1998). Food intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. *J. Clin. Invest.* **102**: 2136-45.

CURTIS MJ., PUGSLEY MK. et WALKER MJ. (1993). Endogenous chemical mediators of ventricular arrhythmias in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res.* **27**: 703-19.

DAHLOF C., DAHLOF P. et LUNDBERG JM. (1986). Alpha 2-adrenoceptor-mediated inhibition of nerve stimulation-evoked release of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in the pithed guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.* **131**: 279-83.

DAHLOF P., TARIZZO VI., LUNDBERG JM. et DAHLOF C. (1991). Alpha- and beta-adrenoceptor-mediated effects on nerve stimulation-evoked release of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in the pithed guinea pig. *J. Auton. Nerv. Syst.* **35**: 199-210.

DALSGAARD CJ., FRANCO-CERECEDA A., SARIA A., LUNDBERG JM., THEODORSSON-NORHEIM E. et HOKFELT T. (1986). Distribution and origin of substance P- and neuropeptide Y-immunoreactive nerves in the guinea-pig heart. *Cell Tissue Res.* **243**: 477-85.

DANIELS AJ., MATTHEWS JE., SLEPETIS RJ., JANSEN M., VIVEROS OH., TADEPALLI A., HARRINGTON W., HEYER D., LANDAVAZO A. et LEBAN JJ. (1995). High-affinity neuropeptide Y receptor antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*. **92**: 9067-71.

DANIELS AJ., MATTHEWS JE., CHANCE WT., GRIZZLE W. et HEYER D. (1997). Food intake inhibition and body weight loss in rat treated with G1264879A, an NPY-Y1 receptor antagonist. *Regul. Pept.* **71**: 212.

DAS UN., LEE AM. et BARRITT GJ. (1983). Prostanoids can modify response to electrical stimulus and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ exchange in isolated myocardial muscle cells. *Prostaglandins Leukot. Med.* **12**: 305-14.

DAVENPORT AP., NUNEZ DJ., HALL JA., KAUMANN AJ. et BROWN MJ. (1989). Autoradiographical localization of binding sites for porcine [^{125}I]endothelin-1 in humans, pigs, and rats: functional relevance in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**: S166-70.

De HERT SG., GILLEBERT TC. et BRUTSAERT DL. (1993). Alteration of left ventricular endocardial function by intracavitary high-power ultrasound interacts with volume, inotropic state, and alpha 1-adrenergic stimulation. *Circulation.* **87**: 1275-85.

De KEULENAER GW., ANDRIES LJ., SYS SU. et BRUTSAERT DL. (1995). Endothelin-mediated positive inotropic effect induced by reactive oxygen species in isolated cardiac muscle. *Circ. Res.* **76**: 878-84.

DiMAGGIO DA., CHRONWALL BM., BUCHANAN K. et O'DONOHUE TL. (1985). Pancreatic polypeptide immunoreactivity in rat brain is actually neuropeptide Y. *Neuroscience.* **15**: 1149-57.

DIPOLO RJ. (1979). Calcium influx in internally dialysed squid axons. *J. Gen. Physiol.* **73**: 91-113.

DOODS HN. et KRAUSE J. (1991). Different neuropeptide Y receptor subtypes in rat and rabbit vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* **204**: 101-3.

DOODS HN., WIENEN W., ENTZEROTH M., RUDOLF K., EBERLEIN W., ENGEL W. et WIELAND HA. (1995). Pharmacological characterization of the selective nonpeptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**: 136-42.

DOODS HN., GAIDA W., WIELAND HA., DOLLINGER H., SCHNORRENBERG G., ESSER F., ENGEL W., EBERLEIN W. et RUDOLF K. (1999). BIIE0246: A selective and high affinity neuropeptide Y Y2 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **384**: R3-5.

DUMONT Y., CADIEUX A., DOODS H., FOURNIER A. et QUIRION R. (2000). Potent and selective tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and peripheral nervous systems: BIB03304 (Y1) and CGP71683A (Y5). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **78**: 116-25.

DUMONT Y., CADIEUX A., DOODS H., PHENG LH., ABOUNADER R., HAMEL E., JACQUES D., REGOLI D. et QUIRION R. (2000a). BIIE0246, a potent and highly selective non-peptide neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **129**: 1075-88.

DUMONT Y., CADIEUX A., PHENG LH., FOURNIER A., ST-PIERRE S. et QUIRION R. (1994). Peptide YY derivatives as selective neuropeptide Y/peptide YY Y1 and Y2 agonists devoided of activity for the Y3 receptor sub-type. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **26**: 320-4.

DUMONT Y., FOURNIER A. et QUIRION R. (1998). Expression and characterization of the neuropeptide Y Y5 receptor subtype in the rat brain. *J. Neurosci.* **18**: 5565-74.

DUMONT Y., FOURNIER A., ST-PIERRE S. et QUIRION R. (1995). Characterization of neuropeptide Y binding sites in rat brain membrane preparations using [¹²⁵I][Leu³¹,Pro³⁴]peptide YY and [¹²⁵I]peptide YY³⁻³⁶ as selective Y1 and Y2 radioligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**: 673-80.

DUMONT Y., FOURNIER A., ST-PIERRE S., SCHWARTZ TW. et QUIRION R. (1990). Differential distribution of neuropeptide Y1 and Y2 receptors in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **191**: 501-3.

DUMONT Y., MARTEL JC., FOURNIER A., ST-PIERRE S. et QUIRION R. (1992). Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog. Neurobiol.* **38**: 125-67.

DUMONT Y. et QUIRION R. (2000). [(125)I]-GR231118: a high affinity radioligand to investigate neuropeptide Y Y(1) and Y(4) receptors. *Br. J. Pharmacol.* **129**: 37-46.

DUMONT Y., JACQUES D., ST-PIERRE JA. et QUIRION R. (1997). Neuropeptide Y receptors in mammalian brain: species differences and status in the human central nervous system. In: *Grundemar L, Bloom SR (Eds), Neuropeptide Y and Drug Development*. San Diego and London Academic Press. pp 57-86.

DUMONT Y., JACQUES D., ST-PIERRE JA., TONG Y., PARKER R., HERZOG H. et QUIRION R. (2000b). Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide receptor proteins and mRNAs in mammalian brains. In: *Quirion R, Bjorklund A, Hokfelt T (Eds), Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier Science. pp375-475.

DUSTING GJ. et McDONALD PS. (1990). Prostacyclin and vascular function: implications for hypertension and atherosclerosis. *Pharmacol. Ther.* **48**: 323-44.

EBERT SN., BADEN JM., MATHERS LH., SIDDALL BJ. et WONG DL. (1996). Expression of phenylethanolamine n-methyltransferase in the embryonic rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**: 1653-8.

EBERT SN. et THOMPSON RP. (2001). Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: association with pacemaking and conduction tissue development. *Circ. Res.* **88**: 117-24.

EDVINSSON L., EKBLAD E., HAKANSON R. et WAHLESTEDT C. (1984). Neuropeptide Y potentiates the effect of various vasoconstrictor agents on rabbit blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* **83**: 519-25.

EDVINSSON L., EMSON P., MCCULLOCH J., TATEMOTO K. et UDDMAN R. (1983). Neuropeptide Y: cerebrovascular innervation and vasomotor effects in the cat. *Neurosci. Lett.* **43**: 79-84.

EDVINSSON L., HAKANSON R., WAHLESTEDT C. et UDDMAN R. (1987). Effect of neuropeptide Y on the cardiovascular system. *Trends Pharmacol. Sci.* **8**: 231-5.

EKBLAD E., EDVINSSON L., WAHLESTEDT C., UDDMAN R., HAKANSON R. et SUNDLER F. (1984). Neuropeptide Y co-exists and cooperates with noradrenaline in perivascular nerve fibers. *Regul. Pept.* **8**: 225-35.

EKMAN R., WAHLESTEDT C., BOTTCHE G., SUNDLER F., HAKANSON R. et PANULA P. (1986). Peptide YY-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Regul. Pept.* **16**: 157-68.

ERICSSON A., HANSON A., LUNDBERG J. et PERSSON H. (1991). Detection of neuropeptide Y immunoreactivity and messenger RNA in rat platelets: the effects of vinblastin reserpine and dexamethasone on NPY expression in blood cells. *Exp. Cell. Res.* **192**: 604-611.

Erlinge D., Brunkwall J. et Edvinsson L. (1994). Neuropeptide Y stimulates proliferation of human vascular smooth muscle cells: cooperation with noradrenaline and ATP. *Regul. Pept.* **50**: 259-65.

EVA C., KEINANEN K., MONYER H., SEEBURG P. et SPRENGEL R. (1990). Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family. *FEBS Letters.* **271**: 81-4.

EVA C., OBERTO A., SPRENGEL R. et GENAZZANI E. (1992). The murine NPY-1 receptor gene. Structure and delineation of tissue-specific expression. *FEBS Letters*. **314**: 285-8.

EVANS HG., LEWIS MJ. et SHAH AM. (1994). Modulation of myocardial relaxation by basal release of endothelin from endocardial endothelium. *Cardiovasc. Res.* **28**: 1694-9.

EWALD DA., STERNWEIS PC et MILLER, RJ. (1988) Guanine nucleotide-binding protein G₀-induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca²⁺ channels sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. **85**: 3633-7.

FASSINA G., TESSARI F. et DORIGO P. (1983). Positive inotropic effect of a stable analogue of PGI₂ and of PGI₂ on isolated guinea pig atria. Mechanism of action. *Pharmacol. Res. Commun.* **15**: 735-49.

FETH F., RASCHER W. et MICHEL MC. (1992). Neuropeptide Y (NPY) receptors in HEL cells: comparison of binding and functional parameters for full and partial agonists and a non-peptide antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **105**: 71-6.

FORSGREN S. (1989). Neuropeptide Y-like immunoreactivity in relation to the distribution of sympathetic nerve fibers in the heart conduction system. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**: 279-90.

FORSGREN S. (1989a). Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the bovine heart: high degree of coexistence with neuropeptide Y-like immunoreactivity. *Cell Tissue Res.* **256**: 125-35.

FOSTER GA. Et SHULTZBERG. (1984). Immunohistochemical analysis of the ontogeny of neuropeptide Y immunoreactive neurons in foetal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2**: 387-407.

FOX AP., NOWYCKY MC. et TSIEN RW. (1987). Single-channel recording of three types of calcium channels in chick sensory neurons. *J. Physiol.* **394**: 173-200.

FRANCO-CERECEDA A., BENGTSSON L. et LUNDBERG JM. (1987). Inotropic effects of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin on the human right atrium in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **134**: 69-76.

FRANCO-CERECEDA A., LUNDBERG JM. et DAHLOF C. (1985). Neuropeptide Y and sympathetic control of heart contractility and coronary vascular tone. *Acta Physiol. Scand.* **124**: 361-9.

FRIED G., LUNDBERG JM. et THEODORSSON-NORHEIM E. (1985). Subcellular storage and axonal transport of neuropeptide Y (NPY) in relation to catecholamines in the cat. *Acta Physiol. Scand.* **125**: 145-54.

FRIED G., TERENIUS L., HOKFELT T. et GOLDSTEIN M. (1985a). Evidence for differential localization of noradrenaline and neuropeptide Y in neuronal storage vesicles isolated from rat vas deferens. *J. Neurosci.* **5**: 450-8.

FUHLENDORFF J., GETHER U., AAKERLUND L., LANGELAND-JOHANSEN N., THOGERSEN H., MELBERG SG., OLSEN UB., THASTRUP O. et SCHWARTZ TW. (1990). [Leu31, Pro34]neuropeptide Y: a specific Y1 receptor agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*. **87**: 182-6.

FUHLENDORFF J., JOHANSEN NL., MELBERG SG., THOGERSEN H. et SCHWARTZ TW. (1990a). The antiparallel pancreatic polypeptide fold in the binding of neuropeptide Y to Y1 and Y2 receptors. *J. Biol. Chem.* **265**: 11706-12.

FUKUDA Y., HIRATA Y., YOSHIMI H., KOJIMA T., KOBAYASHI Y., YANAGISAWA M. et MASAKI T. (1988). Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**: 167-72.

FURCHGOTT RF. et ZAWADZKI JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. **288**: 373-6.

FURNESS JB., COSTA M., EMSON PC., HAKANSON R., MOGHIMZADEH E., SUNDLER F., TAYLOR IL. et CHANCE RE. (1983). Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with neuropeptide Y- and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea-pig digestive tract. *Cell Tissue Res.* **234**: 71-92.

GALIONE A. (1993). Cyclic ADP-ribose: a new way to control calcium. *Science*. **259**: 325-6.

GALIONE A., LEE HC. et BUSA WB. (1991). Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*. **253**: 1143-6.

GASSMANN M., CASAGRANDA F., ORIOLI D., SIMON H., LAI C., KLEIN R. et LEMKE G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature*. **378**: 390-4.

GEHLERT DR. (1994). Subtypes of receptors for neuropeptide Y: implications for the targeting of therapeutics. *Life Sci.* **55**: 551-62.

GEHLERT DR. (1998). Multiple receptors for the pancreatic polypeptide (PP-fold) family: physiological implications. *Proc. Soci. Exp. Biol. Med.* **218**: 7-22.

GEHLERT DR., BEAVERS LS., JOHNSON D., GACKENHEIMER SL., SCHOBER DA. et GADSKI RA. (1996). Expression cloning of a human brain neuropeptide Y Y2 receptor. *Mol. Pharmacol.* **49**: 224-8.

GEHLERT DR., GACKENHEIMER SL., SCHOBER DA., BEAVERS L., GADSKI R., BURNETT JP., MAYNE N., LUNDELL I. et LARHAMMAR D. (1996a). The neuropeptide Y Y1 receptor selective radioligand, [125I][Leu31,Pro34]peptide YY, is also a high affinity radioligand for human pancreatic polypeptide 1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **318**: 485-90.

GEHLERT DR., SCHOBER DA., BEAVERS L., GADSKI R., HOFFMAN JA., SMILEY DL., CHANCE RE., LUNDELL I. et LARHAMMAR D. (1996b). Characterization of the peptide binding requirements for the cloned human pancreatic polypeptide-preferring receptor. *Mol. Pharmacol.* **50**: 112-8.

GERALD C., WALKER MW., CRISCIONE L., GUSTAFSON EL., BATZL-HARTMANN C., SMITH KE., VAYSSE P., DURKIN MM., LAZ TM., LINEMEYER DL., SCHAFFHAUSER AO., WHITEBREAD S., HOFBAUER KG., TABER RI., BRANCHEK TA. et WEINSHANK RL. (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature.* **382**: 168-71.

GERALD C., WALKER MW., BRANCHEK TA. et WEINSHANK RL. (1996a). methods of modifying feeding behavior, compound useful in such methods and DNA encoding a hypothalamic atypical neuropeptide Y/ peptide YY receptor (Y5). *International Patent Application WO96/ 16542*.

GERALD C., WALKER MW., VAYSSE PJ., HE C., BRANCHEK TA. et WEINSHANK RL. (1995). Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. *J. Biol. Chem.* **270**: 26758-61.

GIBBINS IL. et MORRIS JL. (1988). Co-existence of immunoreactivity to neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide in non-noradrenergic axons innervating guinea pig cerebral arteries after sympathectomy. *Brain Res.* **444**: 402-6.

GILES WR. et VAN GINNEKEN AC. (1985). A transient outward current in isolated cells from the crista terminalis of rabbit heart. *J. Physiol.* **368**: 243-64.

GILLEBERT TC., DE HERT SG., ANDRIES LJ., JAGENEAU AH. et BRUTSAERT DL. (1992). Intracavitary ultrasound impairs left ventricular performance: presumed role of endocardial endothelium. *Am. J. Physiol.* **263**: H857-65.

GLOVER I., HANEEF I., PITTS J., WOOD S., MOSS D., TICKLE I. et BLUNDELL T. (1983). Conformational flexibility in a small globular hormone: x-ray analysis of avian pancreatic polypeptide at 0.98-Å resolution. *Biopolymers.* **22**: 293-304.

GOBEIL F JR., DUMONT I., MARRACHE AM., VAZQUEZ-TELLO A., BERNIER SG., ABRAN D., HOU X., BEAUCHAMP MH., QUINIOU C., BOUAYAD A., CHOUFANI S., BHATTACHARYA M., MOLOTCHNIKOFF S., RIBEIRO-DA-SILVA A., VARMA DR., BKAILY G. et CHEMTOB S. (2002). Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors. *Circ. Res.* **90**: 682-9.

GOLDBERG Y., TAIMOR G., PIPER HM. et SCHLUTER KD. (1998). Intracellular signaling leads to the hypertrophic effect of neuropeptide Y. *Am. J. Physiol.* **275**: C1207-15.

GOTTLIEB AI., LANGILLE BL., WONG MK. et KIM DW. (1991). Structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Lab. Invest.* **65**: 123-37.

GRAY TS. et MORLEY JE. (1986). Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Life Sci.* **38**:389-401.

GREGOR P., FENG Y., DECARR LB., CORNFIELD LJ. et MCCALEB ML. (1996). Molecular characterization of a second mouse pancreatic polypeptide receptor and its inactivated human homologue. *J. Biol. Chem.* **271**: 27776-81.

GREGOR P., MILLHAM ML., FENG Y., DECARR LB., MCCALEB ML. et CORNFIELD LJ. (1996a) Cloning and characterization of a novel receptor to pancreatic polypeptide, a member of the neuropeptide Y receptor family. *FEBS Letters.* **381**: 58-62.

GROCOTT-MASON R., ANNING P., EVANS H., LEWIS MJ. et SHAH AM. (1994). Modulation of left ventricular relaxation in isolated ejecting heart by endogenous nitric oxide. *Am. J. Physiol.* **267**: H1804-1.

GROUZMANN E., COMMY E. et BOHOUN C. (1989). Plasma neuropeptide Y concentrations in patients with neuroendocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **68**: 808-813.

GRUNDEMAR L., JONAS SE., MORNER N., HOGESTATT ED., WAHLESTEDT C. et HAKANSON R. (1992). Characterization of vascular neuropeptide Y receptors. *Br. J. Pharmacol.* **105**: 45-50.

GRUNDEMAR L., WAHLESTEDT C. et REIS DJ. (1991). Neuropeptide Y acts at an atypical receptor to evoke cardiovascular depression and to inhibit glutamate responsiveness in the brainstem. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **258**: 633-8.

GRUNDEMAR L., SHEIKH SP. et WAHLESTEDT C. (1993). Characterization of receptor types for NPY and related peptides. In: *Colmers WF, Wahlestedt C (Eds), The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides*. Totowa, NJ: Humana Press, pp197-240.

GYRNKIEWICK G., POENI M. et TSEIN RY. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450.

HAASS M., FORSTER C., RICHARDT G., KRANZHOFER R. et SCHOMIG A. (1990). Role of calcium channels and protein kinase C for release of norepinephrine and neuropeptide Y. *Am. J. Physiol.* **259**: R925-30.

HAASS M., HOCK M., RICHARDT G. et SCHOMIG A. (1989). Neuropeptide Y differentiates between exocytotic and nonexocytotic noradrenaline release in guinea-pig heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **340**: 509-15.

HAPPOLA O., WAHLESTEDT C., EKMAN R., SOINILA S., PANULA P. et HAKANSON R. (1990). Peptide YY-like immunoreactivity in sympathetic neurons of the rat. *Neuroscience.* **39**: 225-30.

HARASAKI H., SUZUKI I., TANAKA J., HANANO H. et TORISU M. (1975). Ultrastructure research of the endocardial endothelium of monkeys. *Archivum Histologicum Japonicum - Nippon Soshikigaku Kiroku.* **38**: 71-84.

HENDRY WF. Organization of neuropeptide Y neurons in the mammalian central nervous system. In: *Colmers WF, Wahlestedt C (Eds), The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides*. Totowa, NJ: Humana Press, pp 457-510.

HERZOG H., BAUMGARTNER M., VIVERO C., SELBIE LA., AUER B. et SHINE J. (1993). Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. *J. Biol. Chem.* **268**: 6703-7.

HERZOG H., HORT YJ., BALL HJ., HAYES G., SHINE J. et SELBIE LA. (1992). Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U S A)*. **89**: 5794-8.

HERZOG H., HORT YJ., SHINE J. et SELBIE LA. (1993a). Molecular cloning, characterization, and localization of the human homolog to the reported bovine NPY Y3 receptor: lack of NPY binding and activation. *DNA Cell Biol.* **12**: 465-71.

HIRABAYASHI A., NISHIWAKI K., SHIMADA Y. et ISHIKAWA N. (1996). Role of neuropeptide Y and its receptor subtypes in neurogenic pulmonary edema. *Eur. J. Pharmacol.* **296**: 297-305.

HIRATA M., HAYASHI Y., USHIKUBI F., YOKOTA Y., KAGEYAMA R., NAKANISHI S. et NARUMIYA S. (1991). Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor. *Nature*. **349**: 617-20.

HU Y., BLOOMQUIST BT., CORNFIELD LJ., DECARR LB., FLORES-RIVEROS JR., FRIEDMAN L., JIANG P., LEWIS-HIGGINS L., SADLOWSKI Y., SCHAEFER J., VELAZQUEZ N. et MCCALEB ML. (1996). Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J. Biol. Chem.* **271**: 26315-9.

HULTING J., SOLLEVI A., ULLMAN B., FRANCO-CERECEDA A. et LUNDBERG JM. (1990). Plasma neuropeptide Y on admission to a coronary care unit: raised levels in patients with left heart failure. *Cardiovasc. Res.* **24**: 102-8.

HUME JR. et UEHARA A. (1985). Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. *J. Physiol.* **368**: 525-44.

INUI A. (1999). Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved? *Trends Pharmacol. Sci.* **20**: 43-6.

JACQUES D., CADIEUX A., DUMONT Y. et QUIRION R. (1995). Apparent affinity and potency of BIBP3226, a non-peptide neuropeptide Y receptor antagonist, on purported neuropeptide Y Y1, Y2 and Y3 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **278**: R3-5.

JACQUES D., SADER S., CHOUFANI S., D'ORLEANS-JUSTE P. et CHAREST D (2000). Endothelin-1 regulates cytosolic and nuclear Ca²⁺ in human endocardial endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**: S397-400.

JACQUES D., SADER S., EL-BIZRI N., CHOUFFANI S., HASSAN G. et SHBAKLO H. (2000a). Neuropeptide Y induced increase of cytosolic and nuclear Ca^{2+} in heart and vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **78**: 162-72.

JAZIN EE., YOO H., BLOMQVIST AG., YEE F., WENG G., WALKER MW., SALON J., LARHAMMAR D. et WAHLESTEDT C. (1993). A proposed bovine neuropeptide Y (NPY) receptor cDNA clone, or its human homologue, confers neither NPY binding sites nor NPY responsiveness on transfected cells. *Regul. Pept.* **47**:247-58.

JOSEPHSON IR., SANCHEZ-CHAPULA J. et BROWN AM. (1984). Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ. Res.* **54**:157-62.

KALRA SP. et CROWLEY WR. (1992). Neuropeptide Y: a novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to luteinizing hormone. *Front. Neuroendocrinol.* **13**: 1-46.

KALRA SP. et CROWLEY WR. (1984). Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. *Life Sci.* **35**: 1173-6.

KANATANI A., ITO J., ISHIHARA A., IWAASA H., FUKURODA T., FUKAMI T., MACNEIL DJ., VAN DER PLOEG LH. et IHARA M. (1998). NPY-induced feeding involves the action of a Y1-like receptor in rodents. *Regul. Pept.* **75-76**: 409-15.

KATZ, B.(1969). The release of neuronal transmitter substances. C.C. Thomas, Ed. Liverpool University Press. Liverpool. Sherrington Lectures (10)IX:2-5.

KIM D., DURAN WT., DANIELS AJ. et DURAN WN. (1997). Novel neuropeptide Y receptor antagonists block vasoconstriction in the hamster cheek pouch microcirculation. *Microvasc. Res.* **53**: 167-72.

KIMMEL JR., HAYDEN LJ. et POLLOCK HG. (1975). Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone. *J. Biol. Chem.* **250**: 9369-76.

KRAUSE J., EVA C., SEEBURG PH. et SPRENGEL R. (1992). Neuropeptide Y1 subtype pharmacology of a recombinantly expressed neuropeptide receptor. *Mol. Pharmacol.* **41**: 817-21.

KU DD., NELSON JM., CAULFIELD JB. et WINN MJ. (1990). Release of endothelium-derived relaxing factors from canine cardiac valves. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **16**:212-8.

- LABURTHE M. (1990). Peptide YY and neuropeptide Y in the gut: availability, biological actions and receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **1**: 168-174.
- LAITE-MOREIRA AF., MOHAN P., SYS SU. ET BRUTSAERT DL. (1994). Myocardial positive inotropic effect of dibutyryl-cyclic GMP in vivo (abstract). *Eur. Heart. J.* **15**: 144.
- LARHAMMAR D., BLOMQVIST AG., YEE F. JAZIN E., YOO H. et WAHLESTEDT C. (1992). Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. *J. Biol. Chem.* **267**: 10935-8.
- LARHAMMAR D. (1996). Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul. Pept.* **62**: 1-11
- LARHAMMAR D. (1996a). Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul. Pept.* **65**: 165-74.
- LARSEN PJ., SHEIKH SP., JAKOBSEN CR., SCHWARTZ TW. et MIKKELSEN JD. (1993). Regional distribution of putative NPY Y1 receptors and neurons expressing Y1 mRNA in forebrain areas of the rat central nervous system. *Eur. J. Neurosci.* **5**: 1622-37.
- LAUDER JM. et KREBS H. (1978). Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev. Neurosci.* **1**: 15-30.
- LEBAN JJ., HEYER D., LANDAVAZO A., MATTHEWS J., AULABAUGH A. et DANIELS AJ. (1995). Novel modified carboxy terminal fragments of neuropeptide Y with high affinity for Y2-type receptors and potent functional antagonism at a Y1-type receptor. *J. Med. Chem.* **38**: 1150-7.
- LEE KF., SIMON H., CHEN H. BATES B., HUNG MC. et HAUSER C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature.* **378**: 394-8.
- LEVY MN. et MARTIN PJ. (1979). Neural control of the heart. In: *Berne RM. Sperelakis N. Geiger SR. eds. Handbook of physiology- the cardiovascular system.* Bethesda: American Physiological Society, pp 581-62.
- LI K., STEWART DJ. et ROULEAU JL. (1991). Myocardial contractile actions of endothelin-1 in rat and rabbit papillary muscles. Role of endocardial endothelium. *Circ. Res.* **69**: 301-12.

- LIPP P. et NIGGLI E. (1993). Ratiometric confocal Ca^{2+} -measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes. *Cell Calcium*. **14**: 359-72.
- LITOVSKY SH. et ANTZELEVITCH C. (1988). Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ. Res.* **62**: 116-26.
- LOVELL J. (1982). Effects of 6-hydroxydopamine-induced norepinephrine depletion on cerebellar development. *Dev. Neurosci.* **5**: 359-368.
- LUNDBERG JM., ANGGARD A., THEODORSSON-NORHEIM E. et PERNOW J. (1984). Guanethidine-sensitive release of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the cat spleen by sympathetic nerve stimulation. *Neurosci. Letters*. **52**: 175-80.
- LUNDBERG JM., FRIED G., PERNOW J. et THEODORSSON-NORHEIM E. (1986). Co-release of neuropeptide Y and catecholamines upon adrenal activation in the cat. *Acta Physiol. Scand.* **126**: 231-8.
- LUNDBERG JM., HEMSEN A., LARSSON O., RUDEHILL A. SARIA A. et FREDHOLM BB. (1988). Neuropeptide Y receptor in pig spleen: binding characteristics, reduction of cyclic AMP formation and calcium antagonist inhibition of vasoconstriction. *Eur. J. Pharmacol.* **145**: 21-9.
- LUNDBERG JM., HEMSEN A., RUDEHILL A., HARFSTRAND A., LARSSON O., SOLLEVI A., SARIA A., HOKFELT T., FUXE K. et FREDHOLM BB. (1988a). Neuropeptide Y- and alpha-adrenergic receptors in pig spleen: localization, binding characteristics, cyclic AMP effects and functional responses in control and denervated animals. *Neuroscience*. **24**: 659-72.
- LUNDBERG JM., HUA XY. et FRANCO-CERECEDA A. (1984a). Effects of neuropeptide Y (NPY) on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deferens and urinary bladder of the guinea-pig. *Acta Physiol. Scand.* **121**: 325-32.
- LUNDBERG JM. et MODIN A. (1995). Inhibition of sympathetic vasoconstriction in pigs in vivo by the neuropeptide Y-Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *Br. J. Pharmacol.* **116**: 2971-82.
- LUNDBERG JM., MODIN A. et MALMSTRÖM RE. (1996). Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends in Pharmacol. Sci.* **17**: 301-4.

LUNDBERG JM., PERNOW J., FRANCO-CERECEDA A. et RUDEHILL A. (1987). Effects of antihypertensive drugs on sympathetic vascular control in relation to neuropeptide Y. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **10**: S51-68.

LUNDBERG JM. (1996). Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.* **48**: 113-78.

LUNDBERG JM., RUDEHILL A., SOLLEVI A., FRIED G. et WALLIN G. (1989). Co-release of neuropeptide Y and noradrenaline from pig spleen in vivo: importance of subcellular storage, nerve impulse frequency and pattern, feedback regulation and resupply by axonal transport. *Neuroscience.* **28**: 475-86.

LUNDBERG JM., RUDEHILL A. et SOLLEVI A. (1989a). Pharmacological characterization of neuropeptide Y and noradrenaline mechanisms in sympathetic control of pig spleen. *Eur. J. Pharmacol.* **163**: 103-13.

LUNDBERG JM., SARIA A., FRANCO-CERECEDA A., HOKFELT T., TERENIUS L. et GOLDSTEIN M. (1985). Differential effects of reserpine and 6-hydroxydopamine on neuropeptide Y (NPY) and noradrenaline in peripheral neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **328**: 331-40.

LUNDBERG JM. et TATEMOTO K. (1982). Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade. *Acta Physiol. Scand.* **116**: 393-402.

LUNDBERG JM., TATEMOTO K., TERENIUS L., HELLSTROM PM., MUTT V., HOKFELT T. et HAMBERGER B. (1982). Localization of peptide YY (PYY) in gastrointestinal endocrine cells and effects on intestinal blood flow and motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U S A).* **79**: 4471-5.

LUNDBERG JM., TERENIUS L., HOKFELT T. et GOLDSTEIN M. (1983). High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci. Letters.* **42**: 167-72.

LUNDBERG JM., TERENIUS L., HOKFELT T., MARTLING CR., TATEMOTO K., MUTT V., POLAK J., BLOOM S. et GOLDSTEIN M. (1982a). Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol. Scand.* **116**: 477-80.

LUNDBERG J. M., MARTINSON A., HEMSEN A., THEODORSSON-NORHEIME. SVEDENHAG J. EKBLÖM, E. et HJEMDAHL P. (1985a)

Corelease of neuropeptide Y and catecholamines during physical exercises in man. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **133**: 30-36.

LUNDELL I., BLOMQVIST AG., BERGLUND MM., SCHOBER DA., JOHNSON D., STATNICK MA., GADSKI RA., GEHLERT DR. et LARHAMMAR D. (1995). Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J. Biol. Chem.* **270**: 29123-8.

LUNDELL I., STATNICK MA., JOHNSON D., SCHOBER DA., STARBACK P., GEHLERT DR. et LARHAMMAR D. (1996). The cloned rat pancreatic polypeptide receptor exhibits profound differences to the orthologous receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U S A)*. **93**: 5111-5.

MACKERELL AD JR., HEMSEN A., LACROIX JS. et LUNDBERG JM. (1989). Analysis of structure-function relationships of neuropeptide Y using molecular dynamics simulations and pharmacological activity and binding measurements. *Regl. Pept.* **25**: 295-313.

MACKERELL AD Jr. (1988). Molecular modeling and dynamics of neuropeptide Y. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2**: 55-63.

MACLEAN MR. et HILEY CR. (1990). Effect of neuropeptide Y on cardiac output, its distribution, regional blood flow and organ vascular resistances in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol.* **99**: 340-2.

MALMSTRÖM R.E. et LUNDBERG J.M. (1997). Neuropeptide Y in sympathetic nerves: evidence for Y1 receptor mediated vascular control. In Grundemar L, Bloom SR (Eds), *Neuropeptide Y and Drug development*. San Diego and London Academic Press. pp 41-56.

MALMSTRÖM RE., MODIN A. et LUNDBERG JM. (1996). SR 120107A antagonizes neuropeptide Y Y1 receptor mediated sympathetic vasoconstriction in pigs in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* **305**: 145-54.

MALMSTRÖM RE. (1997). Neuropeptide Y Y1 receptor mechanisms in sympathetic vascular control. *Acta Physiol. Scand.* **636**: 1-55.

MANABE K., TAKANO M. et NOMA A. (1995). Non-selective cation current of guinea-pig endocardial endothelial cells. *J. Physiol.* **487**: 407-19.

MARKS, A.R. (1992). Calcium channels expressed in vascular smooth muscle. *Circulation* **86**: 61-67.

MARRON K., WHARTON J., SHEPPARD MN., FAGAN D., ROYSTON D., KUHN DM., DE LEVAL MR., WHITEHEAD BF., ANDERSON RH. et POLAK JM. (1995). Distribution, morphology, and neurochemistry of endocardial and epicardial nerve terminal arborizations in the human heart. *Circulation*. **92**: 2343-51.

MARRON K., WHARTON J., SHEPPARD MN., GULBENKIAN S., ROYSTON D., YACoub MH., ANDERSON RH. et POLAK JM. (1994). Human endocardial innervation and its relationship to the endothelium: an immunohistochemical, histochemical, and quantitative study. *Cardiovasc. Res.* **28**: 1490-9.

MATSUMOTO M., NOMURA T., MOMOSE K., IKEDA Y., KONDOU Y., AKIHO H., TOGAMI J., KIMURA Y., OKADA M. et YAMAGUCHI T. (1996). Inactivation of a novel neuropeptide Y/peptide YY receptor gene in primate species. *J. Biol. Chem.* **271**: 27217-20.

McAULEY MA. et WESTFALL TC. (1992). Possible location and function of neuropeptide Y receptor subtypes in the rat mesenteric arterial bed. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* **261**: 863-8.

McAULEY MA., CHEN X. et WESTFALL TC. (1993). Central cardiovascular actions of neuropeptide Y. In: *Colmers WF, Wahlestedt C (Eds), The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides*. Totowa, NJ: Humana Press, pp389-418.

McCULLOUGH LA. et WESTFALL TC. (1995). Neuropeptide Y inhibits depolarization-stimulated catecholamine synthesis in rat pheochromocytoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **287**: 271-7.

McDONALD JK. (1988). NPY and related substances. *Critical Reviews in Neurobiology.* **4**: 97-135.

McDONALD JK., PARNAVELAS JG., KARAMANLIDIS AN., BRECHA N. et KOENIG JI. (1982). The morphology and distribution of peptide-containing neurons in the adult and developing visual cortex of the rat. I. Somatostatin. *J. Neurocytol.* **11**: 809-24.

McLEAN LR., BUCK SH. et KRSTENANSKY JL. (1990). Examination of the role of the amphipathic alpha-helix in the interaction of neuropeptide Y and active cyclic analogues with cell membrane receptors and dimyristoylphosphatidylcholine. *Biochemistry.* **29**: 2016-22.

MEBAZAA A., MARTIN LD., ROBOTHAM JL., MAEDA K., GABRIELSON EW. et WETZEL RC. (1993). Right and left ventricular cultured endocardial endothelium produces prostacyclin and PGE₂. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**: 245-8.

MEBAZAA A., MAYOUX E., MAEDA K., MARTIN LD., LAKATTA EG., ROBOTHAM JL. et SHAH AM. (1993a). Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. *Am. J. Physiol.* **265**: H1841-6.

MEBAZAA A., WETZEL R., CHERIAN M. et ABRAHAM M. (1995). Comparison between endocardial and great vessel endothelial cells: morphology, growth, and prostaglandin release. *Am. J. Physiol.* **268**: H250-9.

MEDEIROS MS. et TURNER AJ. (1996). Metabolism and functions of neuropeptide Y. *Neurochem. Res.* **21**: 1125-32.

MEDEIROS MS. et TURNER AJ. (1994). Post-secretory processing of regulatory peptides: the pancreatic polypeptide family as a model example. *Biochimie.* **76**: 283-7.

MEDEIROS MS. et TURNER AJ. (1994a). Processing and metabolism of peptide-YY: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-IV, aminopeptidase-P, and endopeptidase-24.11. *Endocrinology.* **134**: 2088-94.

MELAX H. et LEESON TS. (1967). Fine structure of the endocardium in adult rats. *Cardiovasc. Res.* **1**: 349-55.

MENTLEIN R., DAHMS P., GRANDT D. et KRUGER R. (1993). Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul. Pept.* **49**: 133-44.

MEULEMANS AL., ANDRIES LJ. et BRUTSAERT DL. (1990). Does endocardial endothelium mediate positive inotropic response to angiotensin I and angiotensin II?. *Circ. Res.* **66**: 1591-601.

MEULEMANS AL., ANDRIES LJ. et BRUTSAERT DL. (1990a). Endocardial endothelium mediates positive inotropic response to alpha 1-adrenoceptor agonist in mammalian heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **22**: 667-85.

MEULEMANS AL., SIPIDO KR., SYS SU. et BRUTSAERT DL. (1988). Atriopeptin III induces early relaxation of isolated mammalian papillary muscle. *Circ. Res.* **62**: 1171-4.

MEYER D. et BIRCHMEIER C. (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature*. **378**: 386-90.

MICHEL MC., BECK-SICKINGER A., COX H., DOODS HN., HERZOG H., LARHAMMAR D., QUIRION R. SCHWARTZ T. et WESTFALL T. (1998). XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol. Rev.* **50**: 143-50.

MICHEL MC. et RASCHER W. (1995). Neuropeptide Y: a possible role in hypertension?. *J. Hypertens.* **13**: 385-95.

MICHEL MC., SCHLICKER E., FINK K. BOUBLIK JH., GOTHERT M., WILLETTE RN., DALY RN., HIEBLE JP., RIVIER JE. et MOTULSKY HJ. (1990). Distinction of NPY receptors in vitro and in vivo. I. NPY-(18-36) discriminates NPY receptor subtypes in vitro. *Am. J. Physiol.* **259**: E131-9.

MIHARA S., SHIGERI Y. et FUJIMOTO M. (1990). Neuropeptide Y receptor in cultured vascular smooth muscle cells: ligand binding and increase in cytosolic free Ca²⁺. *Biochem. Int.* **22**: 205-12.

MILLAR BC., SCHLUTER KD., ZHOU XJ., MCDERMOTT BJ. et PIPER HM. (1994). Neuropeptide Y stimulates hypertrophy of adult ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **266**: C1271-7.

MILLAR BC., WEIS T., PIPER HM., WEBER M., BORCHARD U., MCDERMOTT, BJ., et BALASUBRAMANIAM A. (1991) Positive and negative contractile effects of neuropeptide Y on ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **261**: H1727-H1733.

MINAKATA H., TAYLOR JW., WALKER MW., MILLER RJ. et KAISER ET. (1989). Characterization of amphiphilic secondary structures in neuropeptide Y through the design, synthesis, and study of model peptides. *J. Biol. Chem.* **264**: 7907-13.

MINTH CD., ANDREWS PC. et DIXON JE. (1986). Characterization, sequence, and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. *J. Biol. Chem.* **261**: 11974-9.

MINTH CD., BLOOM SR., POLAK JM. et DIXON JE. (1984). Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U S A)*. **81**: 4577-81.

MITRA R. et MORAD M. (1986). Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U S A)*. **83**: 5340-4.

MODIN A., PERNOW J., et LUNDBERG JM. (1993). Repeated renal and splenic sympathetic nerve stimulation in anaesthetized pigs: maintained overflow of neuropeptide Y in controls but not after reserpine. *J. Auton. Nerv. Syst.* **49**: 123-134.

MOHAN P., BRUTSAERT DL., PAULUS WJ. et SYS SU. (1996). Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation*. **93**: 1223-9.

MONCADA S. (1992). Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. *J. Lab. Clin. Med.* **120**: 187-91.

MONCADA S., GRYGLEWSKI R., BUNTING S. et VANE JR. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. **263**: 663-5.

MONCADA S., PALMER RM. et HIGGS EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-42.

MOTULSKY HJ. et MICHEL MC. (1988). Neuropeptide Y mobilizes Ca²⁺ and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells. *Am. J. Physiol.* **255**: E880-5.

MYERS AK., FARHAT MY., SHEN GH., DEBINSKI, W., WAHLESTEDT C. et ZUKOWSKA-GROJEC Z. (1990). Platelets as a source and a site of action for neuropeptide Y. *Ann. NY Acad. Sci.* **611**: 408-411.

MYERS AK., FARHAT MY., VAZ CA., KEISER HR. et ZUKOWSKA-GROJEC Z. (1988). Release of immunoreactive neuropeptide Y by rat platelets. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **155**: 118-122.

NAKAMURA M., SAKANAKA C., AOKI Y., OGASAWARA H., TSUJI T., KODAMA H., MATSUMOTO T., SHIMIZU T. et NOMA M. (1995). Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y1 receptor generated by alternative splicing. Isolation, genomic structure, and functional expression of the receptors. *J. Biol. Chem.* **270**: 30102-10.

NAKAMURA M., YOKOYAMA M., WATANABE H. et MATSUMOTO T. (1997). Molecular cloning, organization and localization of the gene for the mouse neuropeptide Y-Y5 receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* **1328**: 83-9.

NANKOVA B., KVETNANSKY R., HIREMAGALUR B., SABBAN B., RUSNAK M. et SABBAN EL. (1996). Immobilization stress elevates gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids. *Endocrinology*. **137**: 5597-604.

NAVARRO HA., KUDLACZ EM. et SLOTKIN TA. (1991). Control of adenylate cyclase activity in developing rat heart and liver: effects of prenatal exposure to terbutaline or dexamethasone. *Biol. Neonate*. **60**: 127-36.

NIGGLI E. et LEDERER WJ. (1991). Real-time confocal microscopy and calcium measurements in heart muscle cells: towards the development of a fluorescence microscope with high temporal and spatial resolution. *Cell Calcium*. **11**: 121-30.

NIGGLI E., PISTON DW., KIRBY MS., CHENG H., SANDISON DR., WEBB WW. et LEDERER WJ. (1994). A confocal laser scanning microscope designed for indicators with ultraviolet excitation wavelengths. *Am. J. Physiol.* **266**: C303-10.

NILIUS, B. et CATEELS, R. (1994). Biology of the vascular wall and its interaction with migratory and blood cells. In: *Comprehensive Human Physiology*, edited by Greger, R. and Windhorst, U. Berlin: Springer-Verlag, p. 1981-1994.

NILIUS B. et RIEMANN D. (1990). Ion channels in human endothelial cells. *Gen. Physiol. Biophys.* **9**: 89-111.

NORENBERG W., BEK M., LIMBERGER N., TAKEDA K. et ILLES P. (1995). Inhibition of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells by Y3-type neuropeptide Y receptors via the adenylate cyclase/protein kinase A system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **351**: 337-47.

O'DONOHUE TL., CHRONWALL BM., PRUSS RM., MEZEY E., KISS JZ., EIDEN LE., MASSARI VJ., TESSEL RE., PICKEL VM. et Dimaggio DA. (1985). Neuropeptide Y and peptide YY neuronal and endocrine systems. *Peptides*. **6**: 755-68.

ORKAND RK. et OPAVA SC. (1994). Glial function in the homeostasis of the neuronal micro-environment. *NIPS*. **9**: 265-7.

PALMER RM., ASHTON DS. et MONCADA S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. **333**: 664-6.

- PAPPANO A.J. (1981). Adrenoreceptors and adrenergic mechanisms in the embryonic and fetal heart. *In Adrenoreceptors and Catecholamine Action* (G. Kunos, Ed.). Wiley, New York. PP. 69-97.
- PARKER RM. et HERZOG H. (1998). Comparison of Y-receptor subtype expression in the rat hippocampus. *Regul. Pept.* **75-76**: 109-15.
- PAUL M., BACHMANN J. et GANTEN D. (1992). The tissue renin-angiotensins systems in cardiovascular disease. *Trends. Cardiovasc. Med.* **2**: 94-99.
- PAULUS WJ. (1994). Endothelial control of vascular and myocardial function in heart failure. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **8**: 437-46.
- PAULUS WJ., VANTRIMPONT PJ. et SHAH AM. (1994). Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation.* **89**: 2070-8.
- PAULUS WJ., VANTRIMPONT PJ. et SHAH AM. (1995). Paracrine coronary endothelial control of left ventricular function in humans. *Circulation.* **92**: 2119-26.
- PEINE CJ. et LOW FN. (1975). Scanning electron microscopy of cardiac endothelium of the dog. *Am. J. Anat.* **142**: 137-57.
- PERNEY TM. et MILLER RJ. (1989) Two different G-proteins mediate neuropeptide Y and bradykinin-stimulated phospholipid breakdown in cultured rat sensory neurons. *J. Biol. Chem* **264**: 7317-7327.
- PERNOW J. et LUNDBERG JM. (1989). Modulation of noradrenaline and neuropeptide Y (NPY) release in the pig kidney in vivo: involvement of alpha 2, NPY and angiotensin II receptors. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **340**: 379-85.
- PERNOW J., THOREN P., MILLBERG BI. et LUNDBERG JM. (1988). Renal sympathetic nerve activation in relation to reserpine-induced depletion of neuropeptide Y in the kidney of the rat. *Acta Physiol. Scand.* **134**: 53-9.
- PERNOW J., LUNDBERG JM., KAIJSER L., HJEMDAHL P., THEODORSON-NORHEIM E., MARTINSSON E., et PERNOW B. (1986) Plasma neuropeptide Y-like immunoreactivity and catecholamines during various degrees of sympathetic activation in man. *Clin. physiol.* **6**: 561-78.

PICKEL VM., BECK-SICKINGER AG., CHAN J. et WEILAND HA. (1998). Y1 receptors in the nucleus accumbens: ultrastructural localization and association with neuropeptide Y. *J. Neurosci. Res.* **52**: 54-68.

PLAYFORD RJ. et COX HM. (1996). Peptide YY and neuropeptide Y: two peptides intimately involved in electrolyte homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**: 436-8.

QUIRION R., MARTEL JC., DUMONT Y., CADIEUX A., JOLICOEUR F., ST-PIERRE S. et FOURNIER A. (1990). Neuropeptide Y receptors: autoradiographic distribution in the brain and structure-activity relationships. *Ann. NY Acad. Sci.* **611**:58-72.

RHODIN JAG. (1974). *Histology. A text and Atlas.* New York: Oxford University Press. p. 803.

RIMLAND J., XIN W., SWEETNAM P., SAIJOH K., NESTLER EJ. et DUMAN RS. (1991) Sequence and expression of a neuropeptide Y receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* **40**: 869-75.

RIMLAND JM., SEWARD EP., HUMBERT Y., RATTI E., TRIST DG. et NORTH RA. (1996). Coexpression with potassium channel subunits used to clone the Y2 receptor for neuropeptide Y. *Mol. Pharmacol.* **49**: 387-90.

ROSE PM., FERNANDES P., LYNCH JS., FRAZIER ST., FISHER SM., KODUKULA K., KIENZLE B. et SEETHALA R. (1995). Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. [erratum appears in *J BiolChem* 1995 Dec 1;270(48):29038.]. *J. Biol. Chem.* **270**: 22661-4.

ROTROSEN D. et GALLIN JI. (1986). Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers. *J. Cell Biol.* **103**: 2379-87.

RUBANYI GM. et POLOKOFF MA. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **46**: 325-415.

RUDEHILL A., SOLLEVI A., FRANCO-CERECEDA A. et LUNDBERG JM. (1986). Neuropeptide Y (NPY) and the pig heart: release and coronary vasoconstrictor effects. *Peptides.* **7**: 821-6.

RUDEHILL A., LUNDBERG JM., SOLLEVI A. et HJEMDAHL P. (1987) Elevation of neuropeptide Y like immunoreactivity and catecholamines in plasma

on increased intracranial pressure in the pig. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **31**: 132-138.

RUDOLF K., EBERLEIN W., ENGEL W., WIELAND HA., WILLIM KD., ENTZEROTH M., WIENEN W., BECK-SICKINGER AG. et DOODS HN. (1994). The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist: BIBP3226. *Eur. J. Pharmacol.* **271**: R11-3.

RUDOLF K., EBERLEIN W., ENGEL W., WIELAND HA., WILLIM KD., ENTZEROTH M., WIENEN W., BECK-SICKINGER A. et DOODS HN. (1997). BIBP3226, a potent and selective neuropeptide Y Y1-receptor antagonist. Structure-activity studies and localization of the human y1 receptor binding site. In *Grundemar L, Bloom SR (Eds), Neuropeptide Y and Drug development*. London Academic Press. pp 175-190.

SABOL SL. et HIGUCHI H. (1990). Transcriptional regulation of the neuropeptide Y gene by nerve growth factor: antagonism by glucocorticoids and potentiation by adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol ester. *Molecular Endocrinology.* **4**: 384-92.

SCHALLING M., FRANCO-CERECEDA A., HEMSEN A., DAGERLIND A., SEROOGY K., PERSSON H., HOKFELT T. et LUNDBERG JM. (1991). Neuropeptide Y and catecholamine synthesizing enzymes and their mRNAs in rat sympathetic neurons and adrenal glands: studies on expression, synthesis and axonal transport after pharmacological and experimental manipulations using hybridization techniques and radioimmunoassay. *Neuroscience.* **41**: 753-66.

SCHNITTLER HJ., WILKE A., GRESS T., SUTTORP N. et DRENCKHAHN D. (1990). Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J. Physiol.* **431**: 379-40.

SCHOBER DA., VAN ABBEMA AM., SMILEY DL., BRUNS RF. et GEHLERT DR. (1998). The neuropeptide Y Y1 antagonist, 1229U91, a potent agonist for the human pancreatic polypeptide-preferring (NPY Y4) receptor. *Peptides.* **19**: 537-42.

SCHOBER, DA., GACKENHEIMER, SL., HEIMAN, ML et GEHLERT, DR. (1999). Pharmacological characterization of [¹²⁵I]1229U91 binding to NPY/PYY Y1 and Y4 receptor. Conf Proc, 5th Int NPY Meet, Cayman Island, April 17-22, 1999.

SCHOEMAKER IE., MEULEMANS AL., ANDRIES LJ. et BRUTSAERT DL. (1990). Role of endocardial endothelium in positive inotropic action of vasopressin. *Am. J. Physiol.* **259**: H1148-51.

SCHOUPS AA., SAXENA VK., TOMBEUR K. et DE POTTER WP. (1988). Facilitation of the release of noradrenaline and neuropeptide Y by the alpha 2-adrenoceptor blocking agents idazoxan and hydergine in the dog spleen. *Life Sci.* **42**: 517-23.

SCHULZ R., SMITH JA., LEWIS MJ. et MONCADA S. (1991). Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. *Br. J. Pharmacol.* **104**: 21-4.

SCHWARTZ TW., FUHLENDORFF J., KJEMS LL., KRISTENSEN MS., VERVELDE M., O'HARE M., KRSTENANSKY JL. et BJORNHOLM B. (1990). Signal epitopes in the three-dimensional structure of neuropeptide Y. Interaction with Y1, Y2, and pancreatic polypeptide receptors. *Ann. NY Acad Sci.* **611**: 35-47.

SERRADEIL-LE GAL C., VALETTE G., ROUBY PE., PELLET A., OURY-DONAT F., BROSSARD G., LESPY L., MARTY E., NELIAT G., et DE COINTET P. (1995). SR 120819A, an orally-active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters.* **362**: 192-6.

SHAH AM., ANDRIES LJ., MEULEMANS AL. et BRUTSAERT DL. (1989). Endocardium modulates myocardial inotropic response to 5-hydroxytryptamine. *Am. J. Physiol.* **257**: H1790-7.

SHAH AM., GROCCOTT-MASON RM., PEPPER CB., MEBAZAA A., HENDERSON AH., LEWIS MJ. et PAULUS WJ. (1996). The cardiac endothelium: cardioactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **39**: 263-84.

SHAH AM., LEWIS MJ. et HENDERSON AH. (1991). Effects of 8-bromo-cyclic GMP on contraction and on inotropic response of ferret cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **23**: 55-64.

SHAH AM., MEULEMANS AL. et BRUTSAERT DL. (1989a). Myocardial inotropic responses to aggregating platelets and modulation by the endocardium. *Circulation.* **79**: 1315-23.

SHAH AM., SPURGEON HA., SOLLOTT SJ., TALO A. et LAKATTA EG. (1994). 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. *Circ. Res.* **74**: 970-8.

SHEIKH SP., HOLST JJ., SKAK-NIELSEN T., KNIGGE U., WARBERG J., THEODORSSON-NORHEIM E., HOKFELT T., LUNDBERG JM. et SCHWARTZ TW. (1988). Release of NPY in pig pancreas: dual parasympathetic and sympathetic regulation. *Am. J. Physiol.* **255**: G46-54.

SHEIKH SP. (1991). Neuropeptide Y and peptide YY: major modulators of gastrointestinal blood flow and function. *Am. J. Physiol.* **261**: G701-15.

SHEN SH., GRUNDEMAR L., ZUKOWSKA-GROJEC Z., HAKANSON R. et WAHLESTEDT C. (1991). C-terminal neuropeptide Y fragments are mast cell-dependent vasodepressor agents. *Eur. J. Pharmacol.* **204**: 249-56.

SHIBATA EF., DRURY T., REFSUM H., ALDRETE V. et GILES W. (1989). Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am. J. Physiol.* **257**: H1773-81.

SHIGERI Y. et FUJIMOTO M. (1993). Neuropeptide Y stimulates DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Neurosci. Letters.* **149**: 19-22.

SINEY L. et LEWIS M. (1994). Nitric Oxide modulates endothelin release from porcine cultured endocardial endothelium. *Endothelium.* **2**: 169-175.

SLOTKIN, T.A. (1986). Development of the sympathoadrenal axis. In: *Developmental Neurobiology of the Autonomic Nervous System* (P. M. Gootman, Ed.). Humana. Clifton, NJ. pp. 69-96.

SLOTKIN TA. (1986a). Development of the sympathoadrenal axis. In *Developmental Neurobiology of the Autonomic Nervous System* (P. M. Gootman, Ed.), pp. 97-133. Humana. Clifton, NJ.

SMITH JB. (1996). Calcium homeostasis in smooth muscle cells. *New Horiz.* **4**: 2-18.

SPORN LA., MARDER VJ. et WAGNER DD. (1989). Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand factor in endothelial cells. *J. Cell Biol.* **108**: 283-9.

STANLEY, B.G. (1993). Neuropeptide Y in multiple hypothalamic sites controls eating behavior, endocrine and autonomic systems of body energy balance. In: *Colmers WF, Wahlestedt C (Eds), The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides.* Totowa, NJ: Humana Press. pp 457-510.

STANLEY BG., MAGDALIN W., SEIRAFI A., NGUYEN MM. et LEIBOWITZ SF. (1992). Evidence for neuropeptide Y mediation of eating produced by food deprivation and for a variant of the Y1 receptor mediating this peptide's effect. *Peptides.* **13**: 581-7.

St-PIERRE JA., NOUEL D., DUMONT Y., BEAUDET A. et QUIRION R. (2000). Association of neuropeptide Y Y1 receptors with glutamate-positive and NPY-positive neurons in rat hippocampal cultures. *Eur. J. Neurosci.* 12: 1319-30.

St-PIERRE JA., DUMONT Y. et QUIRION R. (1995). NPY-positive primary hippocampal cells bear NPY receptors: anatomical basis for an autoregulation. *Physologist.* 38: A253.

SUBURO AM., GIBSON SJ., MOSCOSO G., TERENGI G. et POLAK JM. Transient expression of neuropeptide Y and its C-flanking peptide immunoreactivities in the spinal cord and ganglia of human embryos and fetuses. *Neuroscience.* 46: 571-84. (1992).

SUNDLER F., HAKANSON R., EKBLAD E., UDDMAN R. et WAHLESTEDT C. (1986). Neuropeptide Y in the peripheral adrenergic and enteric nervous systems. *Int. Rev. Cytol.* 102: 243-69.

TAKEDA K. et KLEPPER M. (1990). Voltage-dependent and agonist-activated ionic currents in vascular endothelial cells: a review. *Blood Vessels.* 27: 169-183, 1990.

TAKEDA K., SCHINI V. et STOECKEL. (1987). Voltage-activated potassium, but not calcium currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 410: 385-393.

TAOUDI-BENCHEKROUN M., GROS-LOUIS N., BKAILY G. et D'ORLÉANS-JUSTE P. (1995). R-type calcium channel involved in endothelin-1 induced contraction of newborn rabbit aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*

TATEMOTO K., CARLQUIST M. et MUTT V. (1982). Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature.* 296: 659-60.

TATEMOTO K. (1982). Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U S A).* 79: 2514-8.

TATEMOTO K. (1982a). Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U S A).* 79: 5485-9.

TOMPKINS RG., SCHNITZER JJ. et YARMUSH ML. (1989). Macromolecular transport within heart valves. *Circ. Res.* 64: 1213-23.

TONG Y., DUMONT Y., SHEN SH. et QUIRION R. (1997). Comparative developmental profile of the neuropeptide Y Y1 receptor gene and protein in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **48**: 323-32.

VANDER A J., SHERMAN JH. et LUCIANO DS. (eds) (1975). Muscle: smooth muscle. In: *Human physiology: the mechanism of body function*. Second edition. McGraw-Hill Inc. pp 219-225.

VANHOUTTE PM. (1987). Vascular physiology: the end of the quest? *Nature*. **327**: 459-60.

VERGNE P., BERTIN P., BONNET C., RIGAUD M. et TREVES R. (1996). [Non-steroidal anti-inflammatory agents and cyclooxygenases]. *Therapie*. **51**: 639-46.

VERNADAKIS A. et GIBSON DA. (1974). Role of neurotransmitter substances in neural growth. In: *Perinatal Pharmacology: Problems and Priorities (J. Dancis and J.C. Hwang, Ed.)* Raven, New York. pp.65-76.

VEZZANI A., SPERK G. et COLMERS WF. (1999). Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation. *Trends Neurosci.* **22**: 25-30.

WAHLESTEDT C., GRUNDEMAR L., HAKANSON R., HEILIG M., SHEN GH., ZUKOWSKA-GROJEC Z. et REIS DJ. (1990). Neuropeptide Y receptor subtypes, Y1 and Y2. *Ann. NY Acad. Sci.* **611**: 7-26.

WAHLESTEDT C. et REIS DJ. (1993). Neuropeptide Y-related peptides and their receptors--are the receptors potential therapeutic drug targets? *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**: 309-52.

WALTER U. (1989). Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **113**: 41-88.

WANG ZL., BENNET WM., WANG RM., GHATEI MA. et BLOOM SR. (1994). Evidence of a paracrine role of neuropeptide-Y in the regulation of insulin release from pancreatic islets of normal and dexamethasone-treated rats. *Endocrinology*. **135**: 200-6.

WEINBERG DH., SIRINATHSINGHI DJ., TAN CP., SHIAO LL., MORIN N., RIGBY MR., HEAVENS RH., RAPOPORT DR., BAYNE ML., CASCIERI MA., STRADER CD., LINEMEYER DL. et MACNEIL DJ. (1996). Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J. Biol. Chem.* **271**: 16435-8.

WEIS T., BERGER F., BORCHARD U., HAFNER D. et PIPER, HN. (1990). Pharmacological modulation of transient outward current in rat ventricular myocytes. In : *Ionic Current and Ischemia*, edited by Vereecke, J. Van Bongaert, P.P. et Verdonck, F. Leuven: Leuven University, p. 237-239.

WESTFALL TC., HAN SP., KNUEPFER M., MARTIN J., CHEN XL., DEL VALLE K., CIARLEGLIO A. et NAES L. (1990). Neuropeptides in hypertension: role of neuropeptide Y and calcitonin gene related peptide. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **30**: 75S-82S.

WETTSTEIN JG., EARLEY B. et JUNIEN JL. (1995). Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmacol. Ther.* **65**: 397-414.

WHARTON J., GORDON L., BYRNE J., HERZOG H., SELBIE LA., MOORE K., SULLIVAN MH., ELDER MG., MOSCOSO G. et TAYLOR KM. (1993). Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. **90**: 687-91.

WHARTON J., POLAK JM., GORDON L., BANNER NR., SPRINGALL DR., ROSE M., KHAGANI A., WALLWORK J. et YACOB MH. (1990). Immunohistochemical demonstration of human cardiac innervation before and after transplantation. *Circ. Res.* **66**: 900-12.

WHITE GE., GIMBRONE MA. et FUJIWARA K. (1983). Factors influencing the expression of stress fibers in vascular endothelial cells in situ. *J. Cell Biol.* **97**: 416-24.

WIELAND HA., ENGEL W., EBERLEIN W., RUDOLF K. et DOODS HN. (1998). Subtype selectivity of the novel nonpeptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist BIBO 3304 and its effect on feeding in rodents. *Br. J. Pharmacol.* **125**: 549-55.

WIELAND HA., WILLIM K. et DOODS HN. (1995). Receptor binding profiles of NPY analogues and fragments in different tissues and cell lines. *Peptides*. **16**: 1389-94.

WILCOX JN., AUGUSTINE A., GOEDEL DV. et LOWE DG. (1991). Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3454-62.

WOODHAMS PL., ALLEN YS., MCGOVERN J., ALLEN JM., BLOOM SR., BALAZS R. et POLAK JM. (1985). Immunohistochemical analysis of the early ontogeny of the neuropeptide Y system in rat brain. *Neuroscience*. **15**: 173-202.

XIONG Z. et CHEUNG DW. (1995) ATP-dependent inhibition of Ca^{2+} activated K^+ channels in vascular smooth muscle cells by neuropeptide Y. *Pfluegers Arch. J. Physiol.* **431**: 110-116.

YAMADA H., FABRIS B., ALLEN AM., JACKSON B., JOHNSTON CI. et MENDELSON AO. (1991). Localization of angiotensin converting enzyme in rat heart. *Circ. Res.* **68**: 141-9.

YAN H., YANG J., MARASCO J., YAMAGUCHI K., BRENNER S., COLLINS F. et KARBON W. (1996). Cloning and functional expression of cDNAs encoding human and rat pancreatic polypeptide receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. **93**: 4661-5.

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**: 411-5.

YANAGISAWA M. et MASAKI T. (1989). Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 1877-83.

ZHANG X., SHI T., HOLMBERG K., LANDRY M., HUANG W., XIAO H., JU G. et HOKFELT T. (1997). Expression and regulation of the neuropeptide Y Y2 receptor in sensory and autonomic ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. **94**: 729-34.

ZUKOWSKA-GROJEC Z. (1995). Neuropeptide Y. A novel sympathetic stress hormone and more. *Ann. NY Acad. Sci.* **771**: 219-33.

ZUKOWSKA-GROJEC Z., KARWATOWSKA-PROKOPCZUK E., FISHER TA. et JI H. (1998). Mechanisms of vascular growth-promoting effects of neuropeptide Y: role of its inducible receptors. *Regul. Pept.* **75-76**: 231-8.

ZUKOWSKA-GROJEC Z., KARWATOWSKA-PROKOPCZUK E., ROSE W., RONE J., MOVAFAGH S., JI H., YEH Y., CHEN WT., KLEINMAN HK., GROUZMANN E. et GRANT DS. (1998a). Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ. Res.* **83**: 187-95.

ZUKOWSKA-GROJEC Z., MARKS ES. et HAASS M. (1987). Neuropeptide Y is a potent vasoconstrictor and a cardiodepressant in rat. *Am. J. Physiol.* **253**: H1234-9.

ZUKOWSKA-GROJEC Z. et WAHLESTEDT C. (1993). Origin and action of neuropeptide Y in the cardiovascular system. In: *W.F. Colmers and C. Wahlestedt(Eds), The biology of Neuropeptide Y and Related Peptides*. Humana, Totowa, NJ. pp 315-388.