

**PURIFICATION ET CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE D'UNE  
NUCLÉOTIDASE D'ORIGINE HÉPATIQUE**

par

Marie-Claude Leclerc

Mémoire présenté au Département de Biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, septembre 1998



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.

0-612-56927-6

Le 1er février 1999, le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.  
date

Président-rapporteur: M. Richard Blouin  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

Membre: M. Brian Talbot  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

Membre: M. Adrien R. Beaudoin  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

## SOMMAIRE

Ce n'est qu'au cours des deux dernières décennies que les chercheurs se sont davantage intéressés à l'importance des nucléotides extracellulaires, en particulier aux purines extracellulaires, et aux rôles qu'ils pouvaient bien jouer au niveau des divers systèmes physiologiques des animaux. Au niveau du foie, ils seraient impliqués dans la sécrétion biliaire dépendante de l'ATP, dans la glycogénolyse et la contraction/relaxation des vaisseaux sanguins irriguant le foie. L'action des nucléotides libérés dans le milieu extracellulaire est médiée par des récepteurs spécifiques, les purinocepteurs, que l'on retrouve aussi au niveau du foie. La régulation de ces nucléotides au niveau des récepteurs est effectuée par des enzymes spécifiques, les ectonucléotidases. Notre intérêt pour le sujet nous a amené à la purification et à la caractérisation d'une ectonucléotidase, l'ATP-diphosphohydrolase hépatique, afin de mieux comprendre le rôle de cette enzyme au niveau du foie.

Le but de notre travail était de purifier l'enzyme afin d'en définir ses caractéristiques biochimiques et cinétiques. Cette étude prend la voie au clonage de son gène. Les résultats ont montré que l'ATP-diphosphohydrolase hépatique possédait des caractéristiques différentes des ATPDases déjà purifiées et caractérisées. De cette étude, nous avons pu conclure que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sont nécessaires pour l'activité de l'enzyme hépatique. Le pH optimal de catalyse de l'ATP-diphosphohydrolase hépatique se situe entre 6,5 et 7,0 alors que celui de l'ATPDase de la rate de boeuf est de 7,5-8,0 (ATP) et 8,0-8,5 (ADP). Par comparaison à l'enzyme de la rate de boeuf, elle démontre une sensibilité moindre aux inhibiteurs mesurés (gossypol et azidure de sodium) et aux sels biliaires (cholate, 7-déhydrocholate, glycocholate, taurocholate et taurodéoxycholate). Et à notre surprise, des concentrations de 0,05 mM de taurodéoxycholate et 0,5 mM de taurocholate augmentent de façon significative l'activité de l'enzyme. L'enzyme hydrolyse les triphosphonucléosides et les diphosphonucléosides

de façon préférentielle. La faible quantité de phosphate mesurée pour l'hydrolyse des nucléotides monophosphates est présumément effectuée par la 5'-nucléotidase. Les paramètres cinétiques de l'enzyme ont été déterminés. Le  $K_m$  de l'enzyme est de 21  $\mu\text{M}$  pour l'ATP et de 31  $\mu\text{M}$  pour l'ADP. Les  $V_{\text{max}}$  calculés sont de 0,24 et 0,18  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  pour l'ATP et l'ADP respectivement. Par immunobuvardage, on retrouve une bande à environ 75 kDa correspondant au type II de l'ATPDase. Une seconde bande d'intensité plus faible est retrouvée à une hauteur légèrement supérieure à la 54 kDa, correspondant au type I de l'ATPDase. L'ATPDase hépatique a aussi la particularité de conserver une activité enzymatique optimale à une concentration élevée de Triton X-100, soit une concentration de 15 %. L'immunocytochimie, réalisée avec l'anticorps "Ringo", a permis de localiser l'enzyme au niveau du foie. La réaction est détectée principalement au niveau des canalicules biliaires, de l'épithélium vasculaire, des cellules des muscles lisses et des hépatocytes. L'intensité de la réaction varie d'un lobule à l'autre et même à l'intérieur des lobules, la réaction étant plus intense dans les zones périlobulaire et périportale.

Ce travail contient une deuxième partie portant aussi sur une nucléotidase. Dans le cadre de la purification de nucléotidases, des résultats intéressants ont mené vers la purification d'une protéine soluble démontrant des activités phosphohydrolases. L'un des objectifs de ma maîtrise fut de caractériser une protéine soluble démontrant des activités nucléotidases et purifiée originalement par Salma Daoud. Ce peptide, appelé peptide S, est un peptide dérivé d'une protéine connue : la calponine. Ces résultats sont présentés dans l'annexe I. Ils démontrent qu'un polyphosphate est étroitement lié à la protéine. De plus, lorsque la protéine est dépourvue de cette molécule de polyphosphate, celle-ci ne possède pas d'activité nucléotidase.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais adresser mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, Dr Adrien Beaudoin, un grand générateur d'idées qui a su me redonner de l'intérêt dans mon projet durant les périodes les plus difficiles. Ses conseils judicieux et son savoir-faire me guideront tout au long de ma carrière.

Je voudrais témoigner toute ma gratitude à l'Université de Sherbrooke qui m'a donné l'opportunité d'acquérir de l'expérience en enseignement, pour son soutien financier et les différentes ressources qui ont été mises à ma disposition, ainsi qu'à mes conseillers, Drs Richard Blouin et Brian Talbot, pour leur grande disponibilité et leurs précieux conseils prodigués tout au long de mes deux années de recherche.

Je ne saurais passer sous le silence l'excellent travail de monsieur Gilles Grondin pour les travaux d'immunolocalisation et le support technique de madame Johanne Proulx lors de ma maîtrise ainsi que l'aide précieuse apportée par Karine Rogers et Manon Chiasson, toutes deux étudiantes en santé animale. Merci aussi à mes collègues de travail et mes amis, tout spécialement à Ouhida Benrezzak, Nathalie Côté, Fernand-Pierre Gendron, Hapsatou Mamadi, Étienne Morin, Alexandrine Pelletier, Marie-Soleil Perron, Jean Sévigny et Maryse St-Georges, qui ont su agrémenter et réchauffer mes longues journées (et soirées !) de travail dans la chambre froide par leurs encouragements et leurs conseils.

J'aimerais aussi exprimer une vive reconnaissance à mes parents et mes soeurs. C'est une chance unique de vous avoir toujours près de moi. J'apprécie nos longues conversations et prends vos conseils à coeur. Merci aussi à toi, Louis-Philippe, pour ton soutien constant et ta compréhension.

Le p'tit chef !

*Ad augusta per augusta  
On n'arrive au succès qu'après maints obstacles*

# TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>II</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>X</b>
<b>CHAPITRE 1 LES NUCLÉOTIDES EXTRACELLULAIRES ET LE FOIE</b> .....	<b>1</b>
1.1 NUCLÉOTIDES EXTRACELLULAIRES.....	1
1.1.1 Sources des nucléotides extracellulaires et mécanismes de relâche au niveau du système circulatoire.....	1
1.1.2 Importance des nucléotides extracellulaires au niveau des différents systèmes physiologiques.....	3
1.1.3 Récepteurs des nucléotides extracellulaires.....	3
1.1.4 Régulation des nucléotides extracellulaires.....	10
1.1.5 Localisation de l'ATPDase.....	11
1.2 DESCRIPTION ET ANATOMIE DU FOIE.....	18
1.2.1 Histologie du foie.....	18
1.2.2 Sécrétion biliaire.....	23
1.2.3 Récepteurs purinergiques au niveau du foie.....	31
1.3 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....	35
1.3.1 Prémises.....	35
1.3.2 Hypothèse de travail.....	35
1.3.3 Objectifs.....	36
<b>CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>37</b>
2.1 MATÉRIEL.....	37
2.2 MÉTHODES.....	38
2.2.1 Essais enzymatiques.....	38
2.2.2 Purification de l'ATPDase porcine hépatique.....	39
2.2.3 Électrophorèse des protéines et immunobuvardage de type Western.....	42
2.2.4 Détection des activités enzymatiques par électrophorèse en conditions non dénaturantes (enzymogramme).....	44
2.2.5 Caractérisation de l'ATP diphosphohydrolase hépatique.....	44
2.2.6 Immunocytochimie.....	47
<b>CHAPITRE 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>48</b>
3.1 RÉSULTATS.....	48
3.1.1 Purification de l'ATPDase hépatique.....	48
3.1.2 Caractéristiques biochimiques de l'ATPDase hépatique.....	52
3.1.3 Immunolocalisation.....	68
3.2 DISCUSSION.....	71
<b>CHAPITRE 4 CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....	<b>77</b>
<b>ANNEXE I CARACTÉRISATION DU PEPTIDES S</b> .....	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>91</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADO	Adénosine
ADP	Adénosine diphosphate
ADPase	Adénosine diphosphatase
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphatase
ATPDase	Adénosine diphosphohydrolase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BSA	Albumine sérique bovine
CAM	Protéine d'adhésion cellulaire
cMOAT	Transporteur multispécifique pour les anions organiques
CTP	Cytosine triphosphate
DAG	Diacylglycérol
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
GMPC	Guanosine monophosphate cyclique
Gp110	Protéine d'adhésion cellulaire
G <sub>i</sub>	GTPase inhibitrice
GDP	Guanosine diphosphate
GMP	Guanosine monophosphate
G <sub>s</sub>	GTPase stimulatrice
HA <sub>4</sub>	Protéine d'adhésion cellulaire
IgG	Immunoglobuline
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 triphosphate



kDa	Kilo daltons
$K_m$	Constante de Michaelis équivalant à la concentration de substrat permettant à une enzyme d'atteindre la moitié de sa vitesse maximale d'hydrolyse
M	Molaire
$M_r$	Masse moléculaire
$MrP_2$	Protéine multirésistante
$NaN_3$	Azidure de sodium
NBT	Bleu nitro de tétrazolium
Nctp	Co-transporteur protéique $Na^+$ -dépendant pour le taurocholate
Oatp1	Transporteur $Na^+$ -dépendant pour les anions organiques
$P_i$	Phosphate inorganique
$PiP_2$	Phosphatidylinositol biphosphate
PLC	Phospholipase C
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
Pp120	Protéine d'adhésion cellulaire
SBTI	Inhibiteur de trypsine de la fève de soya
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
TCA	Acide trichloroacétique
Tween 20	Sorbitan monolauréate
U	Unité
UMP	Uridine triphosphate
UTP	Uracile triphosphate
$V_{max}$	Vitesse maximale

## LISTE DES FIGURES

Figure 1-1. Source des nucléotides extracellulaires dans le système vasculaire .....	2
Figure 1-2. Deux grandes familles de purinorécepteurs : P <sub>1</sub> et P <sub>2</sub> .....	5
Figure 1-3. Représentation d'un lobule hépatique .....	20
Figure 1-4. L'espace porte ou la triade hépatique .....	21
Figure 1-5. Représentation d'une cellule hépatique .....	22
Figure 1-6. Structure du (a) cholestérol, (b) de l'acide taurocholique et (c) de l'acide glycocholique .....	25
Figure 1-7. Modes de transports de la bile à travers l'hépatocyte et les canalicules biliaires.....	28
Figure 2-1. Fractionnement cellulaire du foie .....	41
Figure 3-2. Profil de purification de l'ATP-diphosphohydrolase hépatique avec une colonne échangeuse d'anions DEAE-agarose .....	50
Figure 3-1. Gel effectué en conditions non dénaturantes et révélé avec ATP et ADP et Western blot.....	51
Figure 3-3. Influence du pH sur l'activité catalytique de l'ATP-diphosphohydrolase....	54
Figure 3-4. Influence du calcium et du magnésium sur l'hydrolyse de l'ATP-diphosphohydrolase avec l'ATP ou l'ADP comme substrat.....	55
Figure 3-5. Effet du gossypol et de l'azidure de sodium sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate .....	58
Figure 3-6. Comparaison de l'activité de l'ATP-diphosphohydrolase hépatique en présence de divers substrats à des concentrations finales de 200 µM .....	59
Figure 3-7. Effet du 7-déhydrocholate sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate avec ADP comme substrat .....	60

Figure 3-8. Effet du cholate sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate avec ADP comme substrat .....	61
Figure 3-9. Effet du glycocholate sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate avec ADP comme substrat .....	62
Figure 3-10. Effet du taurocholate sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate avec ADP comme substrat .....	63
Figure 3-11. Effet du taurodéoxycholate sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate avec ADP comme substrat .....	64
Figure 3-12. Effet d'un détergent, le Triton X-100, sur la fraction particulaire de foie avec ADP comme substrat .....	66
Figure 3-13. Détermination des paramètres cinétiques par la méthode graphique de Woolf-Augustinson-Hofstee avec ATP et ADP comme substrats .....	67
Figure 3-14. Immunocytochimie du foie .....	69
Figure 3-15. Immunocytochimie du système de canalicules biliaires .....	70

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1. Classification pharmacologique des récepteurs P <sub>1</sub> .....	7
Tableau 1-2. Classification pharmacologique des récepteurs P <sub>2</sub> .....	8
Tableau 1-3. Propriétés biochimiques des ATP-diphosphohydrolases des mammifères .....	12
Tableau 1-4. Récepteurs purinergiques retrouvés dans le foie .....	34
Tableau 3-1. Bilan de purification de l'ATP-diphosphohydrolase hépatique .....	49
Tableau 3-2. Influence du gossypol et l'azidure de sodium sur l'activité des ATPDases de différents tissus .....	56

# CHAPITRE 1

## LES NUCLÉOTIDES EXTRACELLULAIRES ET LE FOIE

### 1.1 Nucléotides extracellulaires

Les nucléotides sont des molécules qui exercent leur influence sur une multitude de systèmes importants dans le métabolisme. À l'époque, les chercheurs croyaient que le rôle de ces molécules était confiné à l'espace intracellulaire. Cependant, des recherches ultérieures ont montré la présence des nucléotides dans l'espace extracellulaire (Lüthje, 1989). Notre étude portera plus particulièrement sur les nucléotides de type purine tels l'ATP, l'ADP, l'AMP ou l'adénosine.

#### 1.1.1 Sources des nucléotides extracellulaires et mécanismes de relâche au niveau du système circulatoire

Les nucléotides extracellulaires sont libérés des cellules par exocytose, mécanisme impliquant des granules de sécrétion. La libération d'ATP de cellules intactes ne comportant pas de granules indique l'existence de mécanismes non exocytotiques, encore jusqu'ici inconnus (Dubyak et al., 1993; Sévigny et Beaudoin, 1994). Ces nucléotides sanguins originent de sources variées (Figure 1-1) incluant les cellules sanguines, les

plaquettes (où ils sont concentrés dans des grains de sécrétion appelés corps denses) et les cellules endothéliales. Parmi les éléments sanguins, les érythrocytes représentent une source importante de nucléotides. Leur libération est causée par les forces de cisaillement du flux sanguin, l'hypoxie ou simplement par l'éclatement des cellules. Les terminaisons des cellules nerveuses et les cellules musculaires lisses contribuent aussi à l'apport des nucléotides dans le milieu extracellulaire (El-Moatassim et al., 1992; Sévigny et Beaudoin, 1994).

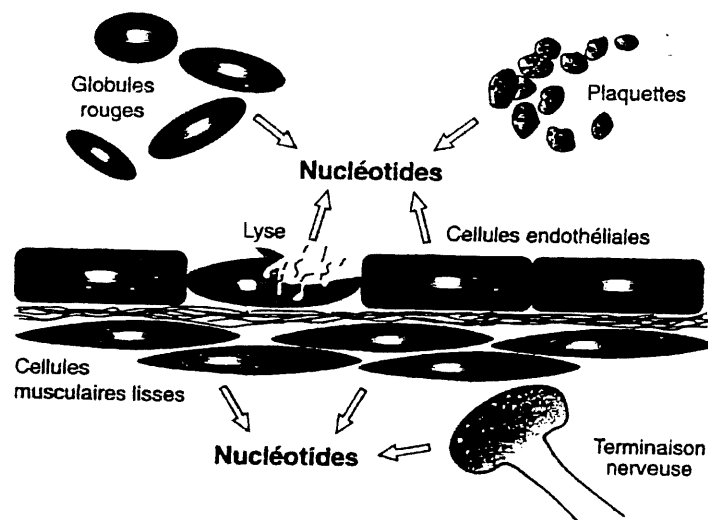


Figure 1-1. **Source des nucléotides extracellulaires dans le système vasculaire.** Les globules rouges, les plaquettes, les cellules endothéliales et muscles lisses des vaisseaux, de même que les terminaisons nerveuses sont des sources importantes de nucléotides extracellulaires (Tiré de Sévigny, 1997).

La rupture de cellules (El-Moatassim et al., 1992; Sévigny et Beaudoin, 1994) ou l'étirement mécanique (Wang et al., 1996; Roman et al. 1997) constituent une source supplémentaire de nucléotides dans le système sanguin. Sous des conditions de stress, telles l'hypoxie ou l'inflammation, les cellules vont libérer des nucléotides dans le milieu extracellulaire (Keppens, 1993; Sévigny et Beaudoin, 1994). En considérant ces nombreuses sources de nucléotides extracellulaires, on peut ensuite se demander quels rôles jouent ces nucléotides au niveau des différents systèmes physiologiques.

### **1.1.2 Importance des nucléotides extracellulaires au niveau des différents systèmes physiologiques**

Des rôles biologiques importants ont été attribués aux nucléotides extracellulaires, notamment au niveau de la perméabilité cellulaire, de la sécrétion exocrine et endocrine, de la prolifération des cellules endothéliales, de la contraction-relaxation musculaire d'une multitude de muscles lisses, de l'agrégation plaquettaire, de la modulation de l'excitabilité neuronale, de la croissance de tumeurs et de la mort cellulaire programmée (apoptose) (Côté et al., 1992a; Sévigny et Beaudoin, 1994). Dans le cadre de ce mémoire, une attention toute particulière sera portée sur l'importance des nucléotides extracellulaires et de leur action engendrée au niveau du foie (section 1.2.3).

### **1.1.3 Récepteurs des nucléotides extracellulaires**

L'action des nucléotides extracellulaires est médiée par des récepteurs spécifiques. Il

s'agit des purinocepteurs ou récepteurs purinergiques. Ces derniers sont divisés en deux grandes familles soit les purinocepteurs de type P<sub>1</sub> ou P<sub>2</sub> (se référer à la figure 1-2), selon leur réponse à l'adénosine ou à l'ATP/ADP respectivement (Burnstock, 1978, 1980; El-Moatassim et al., 1992).

Les récepteurs de type P<sub>1</sub> reconnaissent l'AMP et l'adénosine. Ils étaient subdivisés en deux classes originalement : A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>. Cette classification a été établie selon la nomenclature pharmacologique, c'est-à-dire selon l'affinité des récepteurs aux analogues de l'adénosine et selon le mode de transduction du signal suite à la liaison de l'agoniste (Burnstock, 1978, 1980). Par la suite, l'intérêt pour les récepteurs purinergiques a permis de mettre à jour de nouvelles caractéristiques sur les purinocepteurs. Ces nouvelles informations ont donné lieu à une reclassification des récepteurs de type P<sub>1</sub> en A<sub>1</sub> (A<sub>1A</sub>, A<sub>1B</sub>), A<sub>2</sub> (A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>), A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub>. Cette pluralité de récepteurs répondant à l'adénosine et à ses analogues explique la complexité de l'interprétation des modes d'action de l'adénosine (Fredholm et al., 1994; Windscheig, 1996; Sévigny, 1997; Burnstock, 1997). Les récepteurs de type A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub> agissent sur une protéine G<sub>i</sub> et inhibent l'adénylcyclase, alors que l'action de l'adénosine médiée par les récepteurs de type A<sub>2</sub> s'effectue par l'intermédiaire d'une protéine G<sub>s</sub> qui active l'adénylcyclase et provoque une augmentation de la concentration d'AMPc (Sévigny et Beaudoin, 1994; Windscheif, 1996). Les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub> peuvent aussi conduire à l'activation de la phospholipase C via une protéine G<sub>p</sub>, ce qui aurait pour effet d'accroître la concentration de calcium intracellulaire. Les récepteurs A<sub>2</sub> peuvent activer une autre enzyme, la guanylate cyclase, ayant pour rôle d'augmenter la concentration de GMPc. Les récepteurs de types P<sub>1</sub> interviennent dans la fermeture de canaux calciques (A<sub>1</sub>) et dans l'ouverture de canaux potassiques (A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>) (Windscheif, 1996). La concentration d'adénosine est un paramètre important puisqu'elle a une affinité supérieure pour les purinocepteurs A<sub>1</sub> et peut ainsi les activer à des concentrations beaucoup plus faibles (jusqu'à mille fois) que dans le cas des récepteurs A<sub>2</sub> (Fredholm et al., 1994; Communi et al., 1996; Sévigny, 1997).



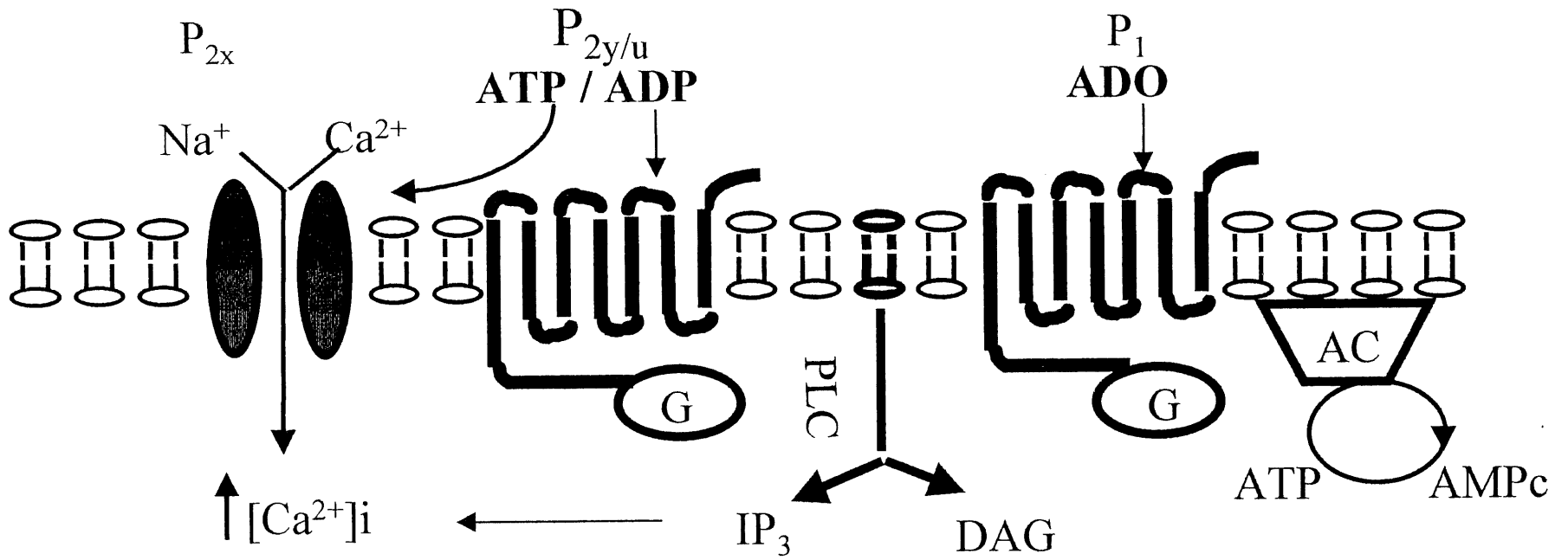


Figure 1-2. Représentation des différents purinocepteurs et de leur mode d'action.

Les récepteurs de type  $P_2$  sont des médiateurs de l'action induite par l'ADP et l'ATP (et ses analogues). Une première classification a permis de les subdiviser en plusieurs sous classes, soit les récepteurs  $P_{2X}$ ,  $P_{2Y}$ ,  $P_{2T}$ ,  $P_{2U}$ ,  $P_{2Z}$  et  $P_{2D}$  (Burnstock, 1978, 1980). Le récepteur  $P_{2X}$  est un récepteur de type canal perméable aux ions sodium, calcium et potassium. Il est impliqué dans la contraction des muscles lisses. Le récepteur  $P_{2Y}$  agit via une protéine G. Il est impliqué dans la majorité des systèmes physiologiques, causant par exemple une augmentation de la glycogénolyse dans le foie, une augmentation de la libération de surfactant dans les poumons, une vasodilatation lorsqu'activé sur les cellules endothéliales, ... Ensuite, on retrouve les récepteurs  $P_{2U}$  et  $P_{2T}$ . Ceux-ci sont également couplés à une protéine G pour augmenter le niveau de calcium cytosolique et initier diverses actions physiologiques. L'une des particularités importantes du récepteur  $P_{2U}$ , c'est sa capacité de lier la pyrimidine UTP (Burnstock, 1978, 1980, 1997; Sévigny et Beaudoin, 1994; Fredholm et al., 1994). Quant au récepteur  $P_{2T}$ , il est associé aux plaquettes et répond spécifiquement à l'ADP pour causer l'agrégation plaquettaire (Sévigny et Beaudoin, 1994). Le récepteur  $P_{2Z}$  est activé par la forme tétra-anionique de l'ATP ( $ATP^{4-}$ ) et se retrouve principalement sur les macrophages et les lymphocytes où il contrôle l'ouverture des canaux non sélectifs perméables aux molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 1 kDa (Sévigny et Beaudoin, 1994; Windscheif, 1996).

Ces récepteurs purinergiques, à l'exception des récepteurs  $P_{2X}$  et  $P_{2Z}$ , sont tous couplés à une protéine G. Celle-ci a généralement pour rôle d'activer la phospholipase C (PLC). Cette enzyme a pour fonction d'hydrolyser le phosphatidylinositol biphosphate ( $PIP_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ). Le diacylglycérol va, par la suite, activer une série de kinases dont la protéine kinase C. Quant à l' $IP_3$ , il est associé à un canal calcique. Tous deux auront pour effet d'augmenter la concentration de calcium intracellulaire. L'activation des protéines G conduit généralement à la mobilisation du calcium et à l'entrée de calcium dans la cellule (El-Moatassim et al., 1992; Boarder et al., 1995; Petit et al., 1996; Burnstock, 1997). Ce système permet aussi la régulation de différentes enzymes par le biais des protéines G : adénylcyclase, phospholipase D (PLD)

ou phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), phosphatidyl choline sélective (El-Moatassim et al., 1992; Boarder et al., 1995).

Tableau 1-1. Classification pharmacologique des récepteurs P<sub>1</sub>.

Type	Agonistes préférentiels	Mécanismes effecteurs	Localisation
A <sub>1</sub>	CPA = CHA = R-PIA > Ado	↓ adénylylcyclase (protéine G <sub>i</sub> )	cerveau, coeur, reins, tissus adipeux
A <sub>2A</sub>	NECA=CGS 21680 = APEC = Ado	↑ adénylylcyclase (protéine G <sub>s</sub> )	cerveau
A <sub>2B</sub>	NECA > Ado	↑ adénylylcyclase (protéine G <sub>s</sub> )	tractus gastrointestinal, localisation étendue
A <sub>3</sub>	APNEA =N <sup>6</sup> -benzyl- NECA >> Ado	↓ adénylylcyclase (protéine G)	testicules, ...

Abréviations : Ado : adénosine; APNEA : N<sup>6</sup>-2-(4-aminophényl)éthylasénosine; CGS 21680: 2-[p-(2-carbonyl-éthyl)-phényléthylamino]-5'-N-éthylcarboxamidoadénosine; CHA : N<sup>6</sup>-cyclohexyladénosine; CPA : N<sup>6</sup>-cyclopentyl adénosine; N<sup>6</sup>-benzyl-NECA : N<sup>6</sup>-benzyl -5'-N-éthylcarboxamino adénosine; R-PIA : N<sup>6</sup>-(R-phénylisopropyl)-adénosine (tiré de Fredholm et al., 1994)

Tableau 1-2. Classification pharmacologique des récepteurs P<sub>2</sub>.

Type	Agonistes préférentiels	Mécanismes effecteurs	Localisation	Réponse typique
P <sub>2D</sub>	ATP > ADP > 2-MeSATP > APCPP	↑ PLC ↑ Ca <sup>2+</sup> intracellulaire	cellules chromaffines, synaptosomes	libération neurotransmetteurs
P <sub>2T</sub>	2-MeSADP > ADP (ATP + antagoniste)	↑ canal Ca <sup>2+</sup> ↑ PLC	plaquettes	agrégation plaquettaire
P <sub>2U</sub>	UTP = ATP > ADP	↑ PLC ↑ autres phospholipases ↑ Ca <sup>2+</sup> intracellulaire	endothél. vasculaire épithél. respiratoire	libération NO, prostacycline, sécrétion Cl <sup>-</sup>
P <sub>2X</sub>	APCPP > ATP > 2MeSATP	canal cationique ↑ Ca <sup>2+</sup> , dépolarisation membranaire	muscle lisse	contraction musculaire lisse
P <sub>2Y</sub>	2-MeSATP > ADP = ATP	↑ PLC ↑ Ca <sup>2+</sup> intracellulaire ↑ autres phospholipases	endothél. vasculaire, foie, ...	libération NO, prostacycline
P <sub>2Z</sub>	BzATP > ATP > ADP	pore non sélectif (< 900 Daltons) ↑ Ca <sup>2+</sup> intracellulaire	macrophages, lymphocytes	mort cellulaire

Abréviations : 2-MeSADP : 2-méthylthio-ADP; 2-MeSATP : 2-méthylthio-ATP; APCPP :  $\alpha,\beta$ -méthylène-ATP; BzATP : 3'-o-(benzoyl)-benzoyl-ATP (Tiré de Fredholm et al., 1994 et Communi et al., 1996).

Il est à préciser que cette classification des récepteurs est basée sur des informations pharmacologiques. Cependant, la venue d'outils biotechnologiques a permis d'amener de nouvelles informations sur la structure de ces récepteurs. L'ADNc des récepteurs  $P_{2T}$ ,  $P_{2U}$ ,  $P_{2X}$  et  $P_{2Y}$  a été clonée. Plusieurs récepteurs de type  $P_{2X}$  ont aussi été clonés. Les analyses ont montré que ces derniers se comportent comme des canaux cationiques non sélectifs activés par l'ATP. L'architecture de ces récepteurs est tout à fait caractéristique : deux zones hydrophobes transmembranaires séparées par un domaine extracellulaire riche en cystéines. L'analyse des séquences des récepteurs  $P_{2U}$  et  $P_{2Y}$  a permis de les associer à la superfamille des récepteurs heptahélicoïdaux couplés aux protéines G et activant la phospholipase C (Fredholm et al., 1994; Communi et al., 1995; Windscheif, 1996; Burnstock, 1997). La liaison des nucléotides se fait aux sixième et septième domaines transmembranaires (Burnstock, 1997). Suite à l'acquisition de nouvelles informations par la biologie moléculaire, une réorganisation complète de la classification des récepteurs de type  $P_2$  a été proposée et s'est rapidement imposée. Dans cette nouvelle nomenclature, les récepteurs possédant une activité intrinsèque de canal cationique sont baptisés  $P_{2X}$  alors que les récepteurs heptahélicoïdaux couplés aux protéines G sont appelés  $P_{2Y}$ . Les récepteurs  $P_{2X}$  possèdent maintenant de nombreuses sous-divisions; les récepteurs  $P_{2X1}$ ,  $P_{2X2}$ , ... jusqu'à  $P_{2X8}$  ont été clonés et identifiés (Windscheif, 1996; Burnstock, 1997). Les récepteurs  $P_{2Z}$  des macrophages qui sont liés à des pores non sélectifs ont été associés aux récepteurs  $P_{2X1}$ . Les récepteurs  $P_{2Y}$ ,  $P_{2U}$  et  $P_{2T}$  obtiennent alors l'appellation  $P_{2Y1}$ ,  $P_{2Y2}$  et  $P_{2Y3}$  respectivement. On retrouve également des récepteurs qui se comportent comme des récepteurs pyrimidinergiques, ayant une grande affinité pour l'UTP. Il s'agit des récepteurs  $P_{2Y4}$  et  $P_{2Y6}$  (Windscheif, 1996; Burnstock, 1997). Cette nouvelle nomenclature est encore appelée à se modifier puisque de nouveaux sous-types de récepteurs n'ayant pas leur homologue pharmacologique ont été clonés (Fredholm et al., 1994; Communi et al., 1995; Windscheif, 1996; Burnstock, 1997).

#### 1.1.4 Régulation des nucléotides extracellulaires

Bien que les nucléotides extracellulaires soient nécessaires à une multitude d'activités physiologiques, leur concentration dans le milieu extracellulaire doit être rigoureusement contrôlée. La régulation du niveau des nucléotides extracellulaires est effectuée par des ectoenzymes, plus spécifiquement, des ectonucléotidases (Keppens, 1993; Meier, 1995; Beaudoin, et al., 1996; Zimmermann, 1996; Che et al., 1997; Thorsten, 1997). Il existe aussi un système de transport pour les nucléosides, qui permet de réguler la concentration de ces molécules dans le canal biliaire. Il s'agit d'un système de transport dépendant du sodium (Meier, 1995; Che et al., 1997; Thorsten, 1997). Les ectoenzymes constituent une famille d'enzymes que l'on retrouve à la surface membranaire de nombreuses cellules de mammifères et dont le site catalytique est exposé à l'espace périplasmique (Côté, et al., 1992, Plesner, 1995). Plus particulièrement, notre laboratoire s'est intéressé à l'ATP-diphosphohydrolase (ATPDase; E.C. 3.6.1.5) ou apyrase. Les ATPDases sont activées par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . Le tableau 1-3 regroupe les différents types d'ATPDases connus chez les mammifères jusqu'à maintenant.

L'ATP-diphosphohydrolase a pour rôle d'effectuer l'hydrolyse séquentielle des résidus  $\gamma$  et  $\beta$  phosphate des triphospho- et diphosphonucléotides, tel l'ATP et ADP. L'AMP ainsi formé est ensuite hydrolysé en adénosine par la 5'-nucléotidase (Meyerhof, 1945). Il s'agit d'une enzyme ubiquitaire; elle a tout d'abord été associée aux tubercules de pommes de terre (Kalckar, et al, 1944), puis elle a été purifiée à partir de diverses plantes, insectes hématophages et autres invertébrés (Beaudoin, et al., 1996). Elle a été purifiée pour la première fois chez les mammifères, en 1980, dans le laboratoire de Beaudoin (Beaudoin et al. 1980; LeBel et al., 1980). La purification de l'enzyme a permis d'obtenir une fraction riche en activité phosphohydrolase (68 unités/mg de protéines) qui a, par la suite, été caractérisée en détails (Beaudoin et al., 1980; Laliberté et al., 1982). Dès lors, trois types d'ATP-diphosphohydrolase distincts ont été identifiés

dans les tissus de mammifères: ATP-diphosphohydrolase de type I, II et III qui sont toutes trois des glycoprotéines. Cependant, elles diffèrent de par leur poids moléculaire, leur pH optimal et leur courbe de dénaturation. Le type I est une protéine de 54 kDa. Après traitement à la N-glucosidase F, son poids est alors de 35 kDa. Les types II et III sont des protéines de 78 kDa. L'anticorps dirigé contre la partie N-terminale de la séquence d'acides aminés du type I réagit à la fois avec les types II et III. Il existe une forte homologie entre ces trois types d'ATPDases. Le type I serait une forme tronquée de l'ATP-diphosphohydrolase (Sévigny et al, 1996; Sévigny, 1997). Le type I est retrouvé dans le pancréas et a un pH optimal de 8,0 alors que le type II a été identifié dans la majorité des organes et possède un pH optimal de 7,5 (Côté et al, 1992). Quant au type III, il est retrouvé dans la trachée et le poumon. Son activité est optimale à un pH de 7,0 à 7,3 (Picher et al., 1993, 1994). Les types I et II de l'ATPDase sont présents dans la rate (Sévigny, 1997). Récemment, quelques unes des ATP-diphosphohydrolases ont été clonées et séquencées. Suite à l'analyse de ces séquences, une forte homologie a été retrouvée entre l'ATPDase et un marqueur d'activation des lymphocytes B humains qui a été identifié comme étant CD39 (Christofforidis et al., 1995; Sévigny et al. 1995; Handa et Guidotti, 1995).

### **1.1.5 Localisation de l'ATPDase**

L'ATP-diphosphohydrolase est une enzyme ubiquitaire dans ce sens qu'on la retrouve dans chacun des grands systèmes physiologiques : système digestif, système respiratoire, système circulatoire, système immunitaire et système nerveux (Côté et al., 1992a,b; Picher et al., 1992,1993; Sévigny et Beaudoin, 1994; Sévigny et al., 1995; Beaudoin et al., 1997; Sévigny, 1997; Sévigny et al, 1997a; Benrezzak et al., 1998; Sévigny et al., 1998). L'enzyme est localisée à des endroits stratégiques dans ces systèmes et influence

Tableau 1-3. Propriétés biochimiques des ATP-diphosphohydrolases de mammifères.

Source d'ATPDase	pH optimum (substrat)	$K_{m-app}$ ( $\mu M$ )		Mr (kDa)	Ratio ATP/ADP
		ATP	ADP		
<b>Porc</b>					
Pancréas [1-4]	8,0 (ATP)	7,3	7,4	132 $\pm$ 19	1,1
	9,0 (ADP)	3,1	5,6	58 et/ou 28	
<b>Boeuf</b>					
Aorte [4-9]	7,5	23 $\pm$ 3		110	1,1
	(ATP & ADP)	14 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2	189 $\pm$ 30	
Rate [10]	7,5-8,0 (ATP) 8,0-8,5 (ADP)		9	100	1,0
Poumon [11]	7,5 (ATP & ADP)	7 $\pm$ 2		70 $\pm$ 3	1,4
Muscle lisse de la trachée [12]	7,3 (ATP & ADP)	15 $\pm$ 2		71 $\pm$ 5	1,5
<b>Homme</b>					
Vaisseaux [13] ombilicaux				75	1,1
Placenta [14,15]	7,0-7,5 (ATP)	10	20	62	1,1
	7,5-8,0 (ADP)			82	



Tableau 1-3. Propriété biochimiques des ATP-diphosphohydrolases de mammifères (suite)

Source d'ATPDase	pH optimum (substrat)	$K_{m,app}$ ( $\mu M$ )		Mr (kDa)	Ratio ATP/ADP
		ATP	ADP		
<b>Rat</b>					
Placenta [16]	8,0 (ATP & ADP)	50	33	67	1,1
Glandes salivaires [17]	8,0 (ATP) 9,0 (ADP)	13	15		1,0
Glandes mammaires [17-19]	8,0 (ATP) 9,0 (ADP)	12	16		0,9 1,3
Utérus [17,18]	8,0 (ATP) 9,0 (ADP)	12	27	67	1,4 1,5
Reins [20,21]	8,0 (ATP & ADP)	12	21	66	0,6 0,9
Synaptosomes de l'hypothalamus [22]	8,0 (ATP & ADP)				3,7-5,6
Synaptosome du cortex cérébral adulte [23]	8,0-8,5 (ATP & ADP)	80	45		2,3
Plaquettes sanguines [24]	7,5-8,0 (ATP & ADP)	24 $\pm$ 0,56	31 $\pm$ 2,65		1,5

(Tiré de Sévigny, 1997)

1. LeBel et al., 1980; 2. Laliberté et al., 1982; 3. Laliberté et Beaudoin, 1983; 4. Côté et al., 1991; 5,6. Côté et al., 1992b,c; 7. Miura et al., 1987; 8. Yagi et al., 1989; 9. Picher et al., 1996; 10. Moodie et al., 1991; 11. Picher et al., 1993; 12. Picher et al., 1994; 13. Yagi et al., 1992; 14. Kettlun et al., 1994; 15. Christoforidis et al., 1995; 16. Pieber et al., 1991; 17,18. Valenzuela et al., 1989, 1992; 19. Alvarez et al., 1996; 20. Sandoval et al., 1996; 21. Valenzuela et al., 1996; 22. Schadeck et al., 1989; 23. Battastini et al., 1991; 24. Frassetto et al., 1993.

la concentration des nucléotides extracellulaires.

## **I. Système digestif**

La localisation immunocytochimique des ATPDases dans les différents tissus du système digestif des mammifères ont montré une réaction très intense avec l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale de l'ATPDase au niveau de l'estomac et des intestins. Plus spécifiquement, l'enzyme a été retrouvée sur les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules réticulaires et les lymphocytes de ces organes. La réaction au niveau des glandes gastriques est aussi très intense. Elle a été localisée dans le système ductal des glandes associées au système digestif (Sévigny et al., 1998). La membrane plasmique de la portion luminale et basolatérale des cellules acinaires du pancréas de rat démontre une activité ATPDase.

L'immunolocalisation montre que les acini pancréatiques réagissent fortement avec l'anticorps dirigé contre l'ATPDase (Sévigny et al., 1995). L'ATP-diphosphohydrolase étant située à des endroits stratégiques dans le système digestif, elle pourrait jouer plusieurs rôles importants dans ce système, notamment dans la sécrétion des électrolytes, dans la sécrétion glandulaire, dans la contraction musculaire lisse, ainsi que dans le contrôle du flot sanguin (Côté et al., 1992a; Sévigny et al., 1998).

## **II. Le coeur et le système sanguin**

De nombreuses études biochimiques et cytochimiques ont montré non seulement la

présence d'activités phosphohydrolases dans les cellules endothéliales intactes et les cellules musculaires lisses des gros vaisseaux sanguins (Heyns et al., 1974; Pearson et al., 1980; Miura et al., 1987; Yagi et al., 1991; Côté et al., 1992b; Sévigny et al., 1997a), mais aussi à la surface des cardiomyocytes intacts (Bowditch et al., 1985). Côté et al. (1992b) ont démontré que la couche interne de l'aorte contient l'ATPDase. Les deux zones de la couche interne, la média et l'intima, ont été séparées et les résultats obtenus ont révélé que les deux couches présentaient des activités ATPDasiques. Cependant, la plupart de l'activité a été retrouvée dans la média. Celle-ci est composée principalement de cellules musculaires lisses. L'enzyme a été purifiée et identifiée comme l'ATP-diphosphohydrolase de type II (Côté et al., 1992b). Une réaction immunologique intense a été identifiée au niveau de la membrane plasmique des cellules des fibres de Purkinje (Beaudoin et al., 1997). Des activités ATPasiques ont aussi été répertoriées à la surface des érythrocytes par Engelhardt (1957). La présence de l'enzyme au niveau des muscles lisses du système sanguin suggère un rôle dans la contraction et la relaxation des vaisseaux sanguins. L'enzyme possède aussi la propriété d'inhiber l'agrégation plaquettaire (Sévigny et Beaudoin, 1994; Côté, et al., 1992a).

### **III. Système immunitaire**

Dans le système immunitaire, des activités nucléotidases ont été identifiées au niveau des granulocytes et des leukocytes (DePierre et Karnovsky, 1974a,b; Weiss et Sachs, 1977; Smolen et Weissman 1978; Medzihradsky et al., 1980; Smith et Peters, 1981; Smith et al., 1981; Wilson et al., 1981; Ochs et Reed, 1984). Des activités ATPases ont aussi été identifiées au niveau des macrophages, des cellules mononucléaires, des lymphocytes et des mastocytes (Dornand, et al., 1974; Cooper et Stanworth, 1977; Chakravarty et Echetebeu, 1978; Kragball et Ellegaard, 1978; Chakravarty et Nielsen, 1980). Une étude

approfondie sur la localisation de l'enzyme au niveau de la rate et des tissus lymphoïdes par l'équipe de Benrezzak (1998) a permis de confirmer la présence de l'ATPDase au niveau de la pulpe blanche et la pulpe rouge de la rate, des tissus lymphoïdes situés le long du tractus gastro-intestinal et à la surface des lymphocytes et des cellules "natural killers". De plus, la présence de l'enzyme a été révélée sur la membrane des amygdales et sur les plaques de Peyer (Benrezzak, 1998). De par sa localisation dans le système immunitaire, l'enzyme jouerait un rôle important dans la modulation de la cytotoxicité des macrophages et des neutrophiles, de l'activité des cellules "natural killer", dans le relâchement de médiateurs de l'inflammation par les mastocytes, dans la réponse immunitaire des leukocytes à des stimuli inflammatoire et aussi la modulation de la croissance tumorale ainsi que de la mort cellulaire (Côté et al., 1992a).

#### **IV. Système nerveux**

Des ATPDases ont été détectées dans le système nerveux et le cerveau. Il existe d'ailleurs une littérature exhaustive rapportant des activités ecto-ATPase et ecto-ADPase dans ces tissus (Agren et al., 1971; Stefanovic et al., 1974, 1976; Nagy et Rosenberg, 1981; Nagy et al., 1983; Kegel et al., 1997). White (1978) a été le premier à observer l'hydrolyse rapide de l'ATP dans les synaptosomes de l'hypothalamus. La présence de l'enzyme dégradant l'ATP a été confirmée par les techniques d'immunolocalisation. Cette dernière a été identifiée sur la membrane plasmique pré-synaptique par Sorensen et Mahler en 1982. L'ectonucléase retrouvée au niveau des synaptosomes du cerveau de poulet a été caractérisée par l'équipe de Nagy (Nagy et Rosenberg, 1981; Nagy et al., 1983). De plus, la présence de l'ATPDase aurait été confirmée au niveau des cellules gliales et des neuroblastomes (Kegel et al., 1997). Il existe une ATPDase présente au niveau des capillaires du cerveau (Picher et al., 1993) et de la glande pituitaire (Lorenson

et al., 1981). La localisation d'ATPases et ATPDases dans le cerveau a aussi été réalisée par des analyses sur Northern blot par l'équipe de Kegel et collaborateurs (1997). La présence de l'enzyme dans le système nerveux jouerait un rôle important dans la modulation de l'excitabilité neuronale et le relâchement des neurotransmetteurs et des hormones (Côté et al., 1992a; Beaudoin et al., 1996)

## **V. Système respiratoire**

En 1971, Ryan et Smith ont observé la présence d'activités ATPasiques et ADPasiques au niveau des cellules endothéliales et vasculaires (Ryan et Smith, 1971). Suite à ces travaux, il a été démontré que les membranes plasmiques des fractions microsomales du poumon possédaient des activités phosphohydrolases (Dawson et al., 1985; Picher et al., 1993). Ensuite, l'ATP-diphosphohydrolase de type III a été purifiée dans le poumon de boeuf (Picher et al., 1992). L'immunolocalisation a permis de détecter la présence de l'enzyme sur l'épithélium respiratoire de la trachée jusqu'aux cellules alvéolaires, ainsi qu'au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins et du système respiratoire (bronches, bronchioles, sac alvéolaire), des glandes muqueuses, des chondrocytes, des leucocytes, ainsi que sur les cellules endothéliales et mésothéliales (Sévigny et al., 1997b). L'enzyme, de par sa localisation, permettrait donc le contrôle de la contraction et la relaxation des muscles lisses du système respiratoire (Côté et al., 1992a; Sévigny et al., 1997b), de la sécrétion de mucus et de surfactant, du transport à travers l'épithélium des ions chlorures, la fréquence des battements ciliaires. Elle peut aussi permettre de prévenir la thrombose pulmonaire (Sévigny et al., 1997b).

## 1.2 Description et anatomie du foie

### 1.2.1 Histologie du foie

Situé dans le quadrant droit supérieur de l'abdomen, immédiatement sous le diaphragme, le foie constitue la plus grosse glande de l'organisme (Hould, 1982). Il est pourvu d'une circulation sanguine très riche. Il est desservi par l'artère hépatique et la veine porte qui achemine les substances absorbées au niveau de l'intestin, à l'exception des lipides (Leeson, et al., 1971; Hould, 1982). La veine porte apporte le sang de l'intestin, puis celui-ci est acheminé vers les cellules hépatiques via l'artère hépatique. Ses veines se jettent dans la veine cave inférieure. La veine porte et l'artère hépatique entrent dans le foie et les canaux biliaires et le quittent par une région appelée hile, une fente transversale située à la face inférieure du foie (Leeson et al, 1971). Il s'agit d'une glande dite amphicrine car il produit des sécrétions de type endocrine et de type exocrine. Ceci est dû au fait que les hépatocytes qui le composent possèdent une double polarité : l'une vasculaire correspondant à la fonction endocrine et l'autre canaliculaire correspondant à la sécrétion biliaire (Coujard, et al., 1980; Hould, 1982).

Dû à sa position stratégique dans la circulation, le foie joue de nombreux rôles importants au niveau de l'homéostasie, notamment dans le maintien de la concentration de glucose, du métabolisme lipidique (synthèse, entreposage, excrétion) et de la sécrétion biliaire. De plus, il sert à la désintoxication du sang en détruisant ou transformant des substances toxiques pour l'organisme. Le foie est aussi la source de synthèse de facteurs de coagulation (héparine, prothrombine, fibrinogène) (Leeson et al, 1971; Horner-Andrews, 1979; Hould, 1982) et constitue la source principale de synthèse des nucléotides (Che et al. 1997). Il synthétise plusieurs protéines plasmatiques (albumine,

globulines) ainsi que plusieurs vitamines (fonction de stockage de certaines vitamines hydrosolubles ou liposolubles) et sert aussi de site d'entreposage des lipides et du glycogène. Ces rôles sont assurés par les hépatocytes (Leeson et al, 1971; Horner-Andrews, 1979; Hould, 1982). Un rôle phagocytaire est aussi attribué au foie, cependant ce sont les cellules de Küpffer qui assurent cette fonction. Celles-ci sont situées près des sinusoides (Elias et al., 1978; Coujard, 1980 ; Hould, 1982). Le foie possède aussi un pouvoir de régénération très remarquable. L'organisation du processus de réparation dépend de la nature de la blessure. Les cellules entrent en division intense mais elles sont toutefois capables de s'hypertrophier et de s'hyperplasier. Les canaux biliaires peuvent également proliférer activement et donner naissance à de nouvelles cellules hépatiques (Leeson et al., 1971; Sigal et al., 1992).

Le foie est divisé en différents lobes qui sont ensuite subdivisés en lobules (figure 1-3) que certains auteurs définissent comme étant l'unité fonctionnelle du foie (Leeson et al., 1971; Hould, 1982). Un lobule est délimité par des espaces portes localisés à chaque extrémité du lobule. Au centre, de chacun des lobules hépatiques, on retrouve la veine centro-lobulaire. Chaque espace porte est composé de ce que l'on appelle la triade hépatique (figure 1-4). La triade hépatique comprend un embranchement de la veine porte et de l'artère hépatique et un embranchement du canal biliaire. On retrouve aussi des canaux lymphatiques au niveau de l'espace porte (Leeson et al, 1971; Elias et al., 1978; Hould, 1982). Notons que les cellules disposées en périphérie d'un lobule sont très bien irriguées alors que celles situées près de la veine centro-lobulaire sont les plus éloignées de leur apport nutritif (Leeson, et al., 1971). Les cellules se déplacent de façon unidirectionnelle, l'âge des cellules étant proportionnelle à la distance de l'espace porte. Il existe un gradient d'activité décroissant de la périphérie vers le centre selon l'âge des cellules (Sigal, 1992). Ainsi, le foie a pu être divisé en trois zones différentes: une zone péri-lobulaire dite d'activité permanente, une zone intermédiaire d'activité variable et une zone centrale de repos permanent qui n'entrerait en action qu'en cas de surcharge fonctionnelle (Coujard et al., 1980; Sigal, 1992).

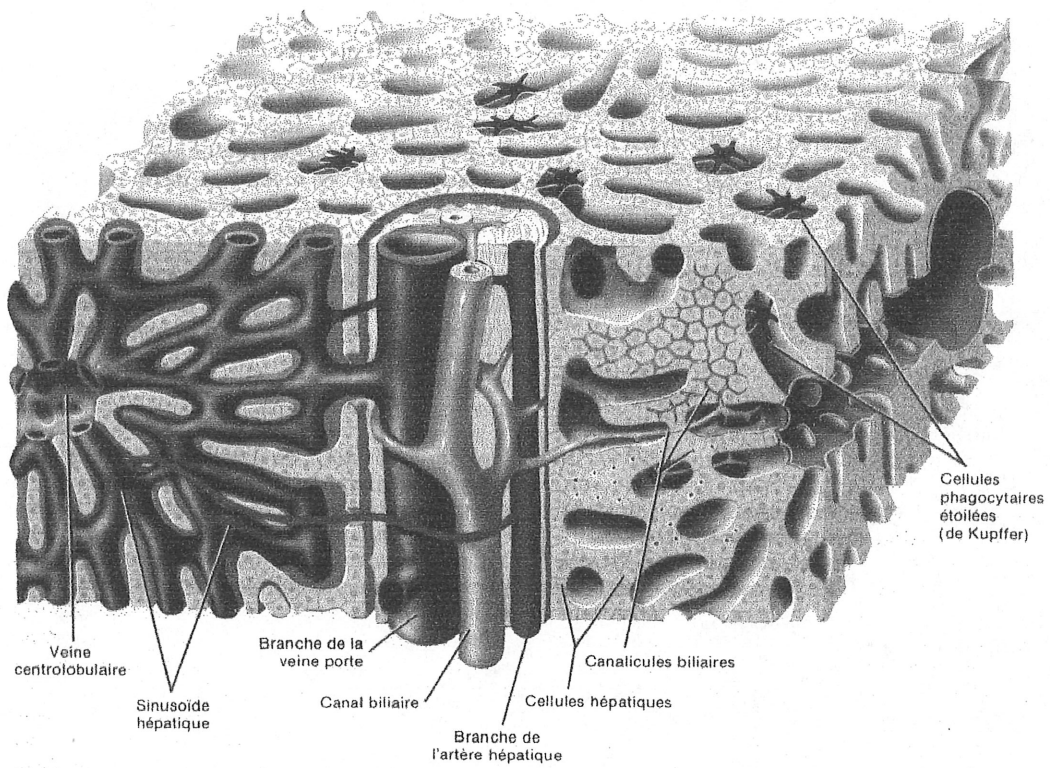
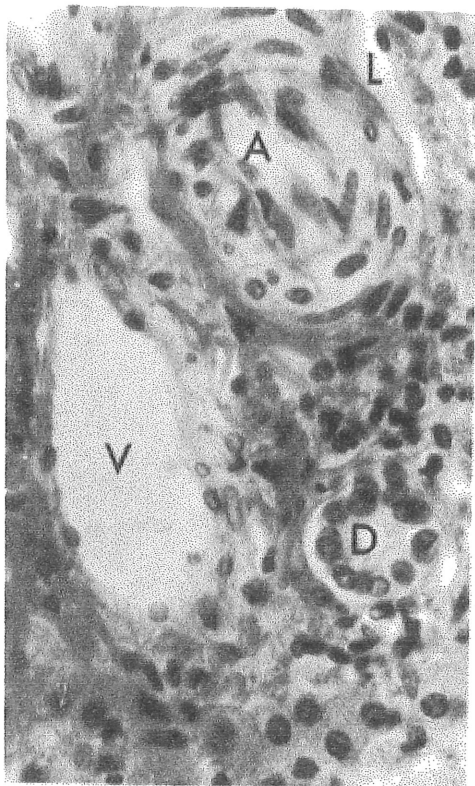
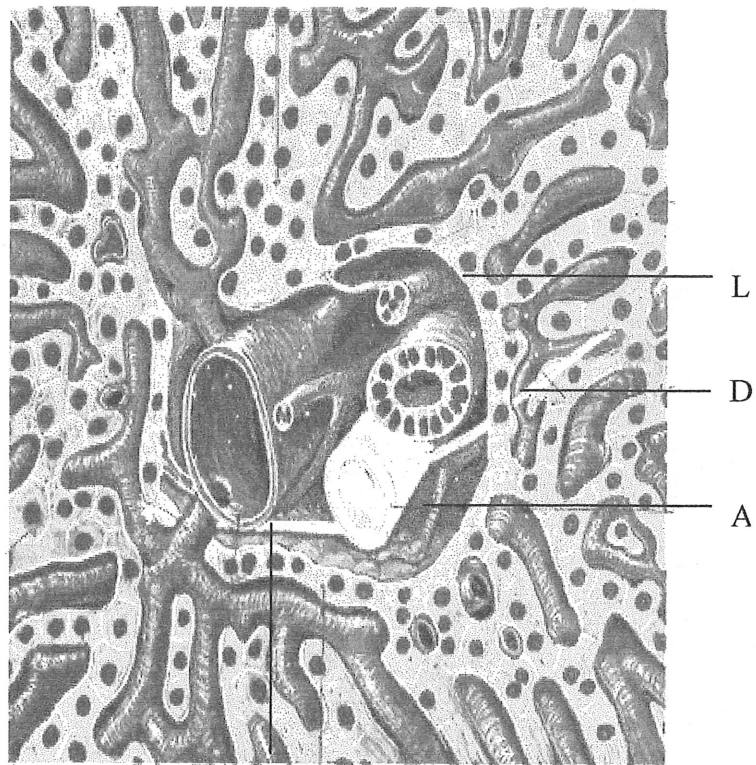


Figure 1-3. Représentation d'un lobule hépatique (Tiré de Elias et al., 1978).





a)



b)

Figure 1-4. L'espace porte ou la triade hépatique comprend un embranchement de l'artère hépatique (A), une branche de la veine porte (V) possédant une paroi vasculaire très mince mais étant de plus grosse taille que l'artère, un petit canal biliaire composé d'un revêtement de cellules épithéliales cubiques (D) et parfois un ou des vaisseaux lymphatiques apparaissant comme des fentes bordées par un endothélium (L). a) Microphotographie (750X) (Tiré de Leeson et al., 1971) et b) schématisation (Tiré de Elias et al., 1978).

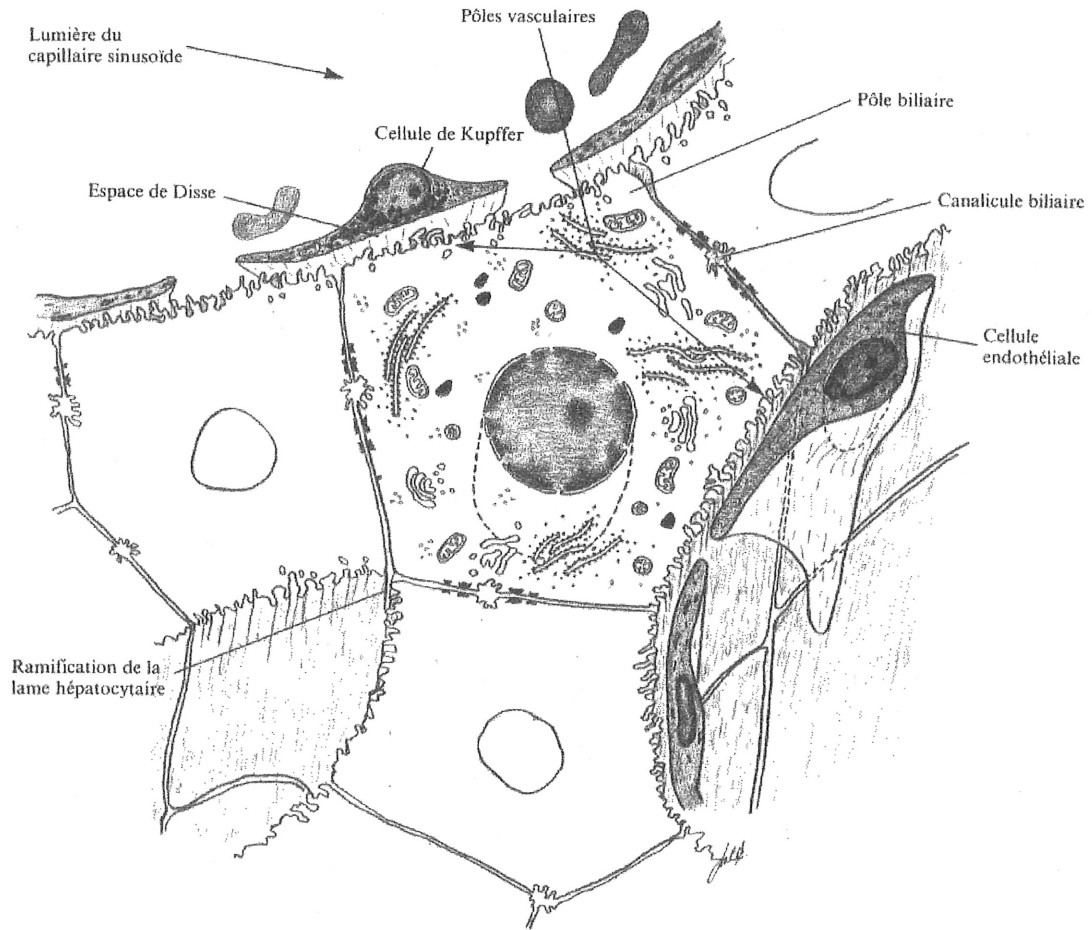


Figure 1-5. Représentation d'une cellule hépatique (Tiré de Hould, 1982).

Les hépatocytes sont les unités de base constituant le foie. Il s'agit de cellules épithéliales de forme polyédrique possédant au minimum six à huit faces et sont pourvues d'un noyau sphérique ou ovoïde, dans lequel on peut distinguer un ou deux nucléoles et une chromatine assez abondante et distribuée uniformément (figure 1-5). Le cytoplasme contient les organites habituels. Les cellules hépatiques sont arrangées en travées anastomosées et ramifiées qui forment un réseau tri-dimensionnel. Chacune des ces couches ainsi formées n'a qu'une seule cellule d'épaisseur. Les espaces formés entre ces cellules permettent de constituer des capillaires sinusoides ou des canalicules biliaires. Les canalicules biliaires sont le produit de l'accolement et de l'invagination de la membrane plasmique de deux hépatocytes (Leeson et al., 1971; Elias et al., 1978; Horner-Andrews, 1979; Coujard, 1980; Hould, 1982). Tel que mentionné, les hépatocytes sont des cellules polarisées possédant trois surfaces différentes morphologiquement et fonctionnellement. Il s'agit du domaine basal ou sinusoidal qui fait face à la circulation, du domaine latéral et du domaine apical situé du côté biliaire (Coujard, et al., 1980; Hould, 1982; Che et al., 1997).

### **1.2.2 Sécrétion biliaire**

#### **I. La bile**

Le foie sécrète quotidiennement environ 0,5 litre de bile dans le duodénum par un système canaliculaire (Ganong et al., 1983). Les constituants majeurs de la bile sont les sels biliaires, le cholestérol, les pigments biliaires, la lécithine et certains minéraux inorganiques (sodium, potassium, chlore) (Vander, et al., 1989). Du point de vue de la fonction gastro-intestinale, les sels biliaires sont les composants les plus importants de la bile car ils sont indispensables à la digestion et à l'absorption des lipides, ainsi qu'à

l'élimination du cholestérol. La bile permet l'émulsion des graisses en diminuant la tension de surface et l'absorption des vitamines liposolubles. Elle constitue un réservoir d'alcalis qui aident à neutraliser la chyme acide de l'estomac. Il s'agit aussi d'une voie importante d'excrétion des médicaments, des pigments biliaires et des substances minérales (cuivre, zinc et mercure) (Harper et al., 1982). Les sels biliaires servent de détergent pour émulsifier les lipides et les rendre accessibles aux lipases pancréatiques. La bile, contenant les acides biliaires, emprunte la voie du cycle entérohépatique. Elle est tout d'abord déchargée dans le duodénum. Ensuite, les acides biliaires sont réabsorbés par le petit intestin et retournent au foie par la veine mésentérique supérieure et la veine porte. Environ 80 à 90 % des acides biliaires sécrétés sont réabsorbés de l'intestin et transportés dans le foie pour être sécrétés de nouveau (Leeson et al., 1971; Horner-Andrews, 1979). Les acides biliaires sont présents sous forme de sels biliaires à un pH physiologique. Ils sont synthétisés dans l'hépatocyte à partir du cholestérol (Suchy et al., 1997) (Fig. 1-6). Le sel biliaire présent majoritairement dans la bile est le cholate et le chénodéoxycholate (Horner-Andrews, 1979; Goodman et al., 1980; Harper et al., 1982). Ensuite, ils sont conjugués à la glycine et à la taurine pour former les sels biliaires correspondants: glycocholate, glycochénodéoxycholate, taurocholate et taurochénodéoxycholate. Ces sels biliaires sont synthétisés dans le foie et constituent les acides biliaires primaires. Lorsqu'ils sont sécrétés dans l'intestin avec la bile, ils peuvent subir des modifications par l'action des micro-organismes. Ils sont alors transformés en sels biliaires dits secondaires tels le déoxycholate, le lithocholate, le glycodéoxycholate, le taurodéoxycholate, le glycolithocholate et le tauroolithocholate (Ganong, 1983; Chambers and Dickwood, 1993).

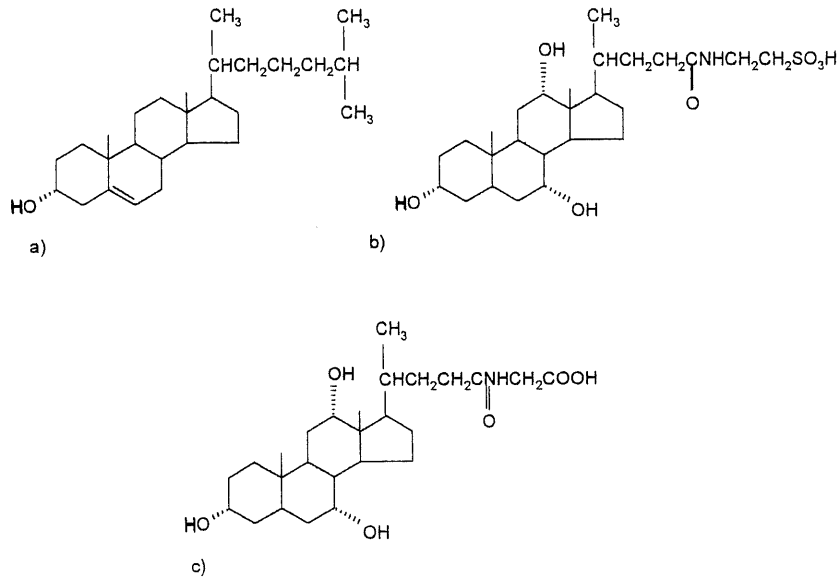


Figure 1-6. Structure du (a) cholestérol, (b) de l'acide taurocholique et (c) de l'acide glycocholique.

Le taurocholate fait aussi partie des constituants majeurs de la bile (Bresse, 1953; Inoue et al, 1982; Nishida et al., 1991). Les cholates possèdent aussi des dérivés semi-synthétiques comme l'acide déhydrocholique qui est très utilisé comme agent hypocholestérolémiant favorisant la sécrétion biliaire ainsi que comme médicament contre la constipation en diminuant l'absorption de l'eau et des électrolytes (Goodman et al., 1980).

## II. Sécrétion biliaire et mécanismes de transport impliqués

La bile est sécrétée à la face apicale des cellules hépatiques à travers la membrane

plasmique qui forme les canalicules biliaires. Les canalicules biliaires s'écoulent dans des diverticules situés aux extrémités des plus petits canaux biliaires. Ces diverticules sont accolés aux cellules parenchymateuses et se continuent sous forme de petits canaux à parois très fines. Ces canaux courts, appelés *cholangioles*, se transforment à leur tour en canaux biliaires. Les canaux biliaires convergent ensuite pour former le canal hépatique. Ce dernier se divise en deux pour former le canal cystique et le canal biliaire commun. La bile est déversée dans la circulation sanguine, dans le duodénum (Leeson et al., 1971). Un petit réservoir se détache du canal cholédoque sous la face inférieure du foie pour ainsi former la vésicule biliaire. Cette dernière permet de concentrer la bile et de la libérer lors de divers stimuli gastro-intestinaux (Vander et al., 1989).

Dès 1970, la compréhension d'un système comme le transport biliaire suscitait beaucoup d'intérêt. C'est avec une méthode développée pour la préparation de vésicules isolées que de nouvelles expériences ont été réalisées et ont permis de faire avancer les connaissances sur ce sujet. Le transport de la bile peut s'effectuer à différents niveaux. Au retour de la circulation sanguine, les sels biliaires empruntent une voie de transport pour passer des sinusoides à l'hépatocyte. Ensuite ils prennent une seconde voie de transport pour circuler à l'intérieur de l'hépatocyte. Le passage des sels biliaires de l'hépatocyte aux canalicules biliaires nécessite différentes voies de transport diffé (figure 1-7).

Le transport des sels biliaires des sinusoides à l'hépatocyte est couplé à un transporteur dépendant du sodium, le Nctp ( $\text{Na}^+$ -taurocholate-cotransporting polypeptide). Un second transporteur, cette fois-ci indépendant du sodium, permet aussi l'entrée de la bile du côté basolatéral (Che et al., 1997; Suchy et al., 1997; Kast et al., 1994; Sippel et al., 1997, 1994). Ce transporteur a été cloné : Oatp1 ( $\text{Na}^+$ -independent organic anion transporter) et reconnu comme un transporteur multispécifique pour les sels biliaires. Il s'agit d'un système de transport pour les anions organiques stimulé par l'ion chlorure (Meier, 1995; Suchy et al., 1997). Le transport des sels biliaires se produit de façon prédominante dans

les hépatocytes situés près de l'espace porte, créant un gradient de sel entre la zone 1 (périportale) et la zone 3 (périveineuse). Les sels arrivent à l'hépatocyte, pour la plupart, liées à des protéines plasmiqes (Meier, 1995). Le transport de la bile à l'intérieur de l'hépatocyte s'effectue selon deux modes principaux, l'un associé à des compartiments intracellulaires, impliquant l'appareil de Golgi et/ou le réticulum endoplasmique (transport vésiculaire dépendant des microtubules) et le second système est un transport direct aux canalicules via la liaison à des protéines cytosoliques. La seconde voie est la voie principale de transport de la bile dans la cellule hépatique (Nishida et al., 1991; Meier, 1995). Quant à la sécrétion de la bile dans les canalicules biliaires, elle peut être effectuée selon trois modes de transport soit un mode de transport dépendant du potentiel membranaire (-35 à 40 mV), un second dépendant de l'ATP pour le transport du taurocholate et des acides biliaires contenant des groupements glucuronides ou sulfates, ainsi qu'un dernier mode de transport dépendant des ions OH<sup>-</sup> ou HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Meier, 1995; Suchy, 1997). La charge des chaînes latérales est un facteur déterminant pour le transport de la bile à travers l'hépatocyte. Les acides biliaires chargés sont sécrétés dans la bile de manière efficace. Les acides biliaires contenant un groupement sulfate (position 3) ou (3- ou 24-) glucuronide sont des substrats pour différents transporteurs, probablement un transporteur multispécifique pour les anions organiques (cMOAT ou MrP2), aussi ATP-dépendant, mais différent des ATPases (Meier, 1995; Trauner, 1997; Suchy et al., 1997). Le transporteur canaliculaire des sels biliaires (cBST) médie la sécrétion des sels biliaires monovalents. Environ 50 % de la sécrétion de la bile est dépendante du potentiel membranaire (Suchy et al., 1997). Le flot biliaire est aussi influencé par les contractions spontanées des canalicules qui sont stimulés par l'ATP et sont associés à une augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Meier, 1995). Le transport de la bile des sinusoides au domaine canaliculaire de l'hépatocyte représente l'étape limitante du transport biliaire (Sippel et al., 1994, 1997). L'entrée des sels biliaires dans les canalicules est suivie d'une entrée passive d'eau. Les acides biliaires peuvent inhiber leur propre sécrétion lorsque la concentration est élevée dans le canal biliaire (Suchy et al., 1997).

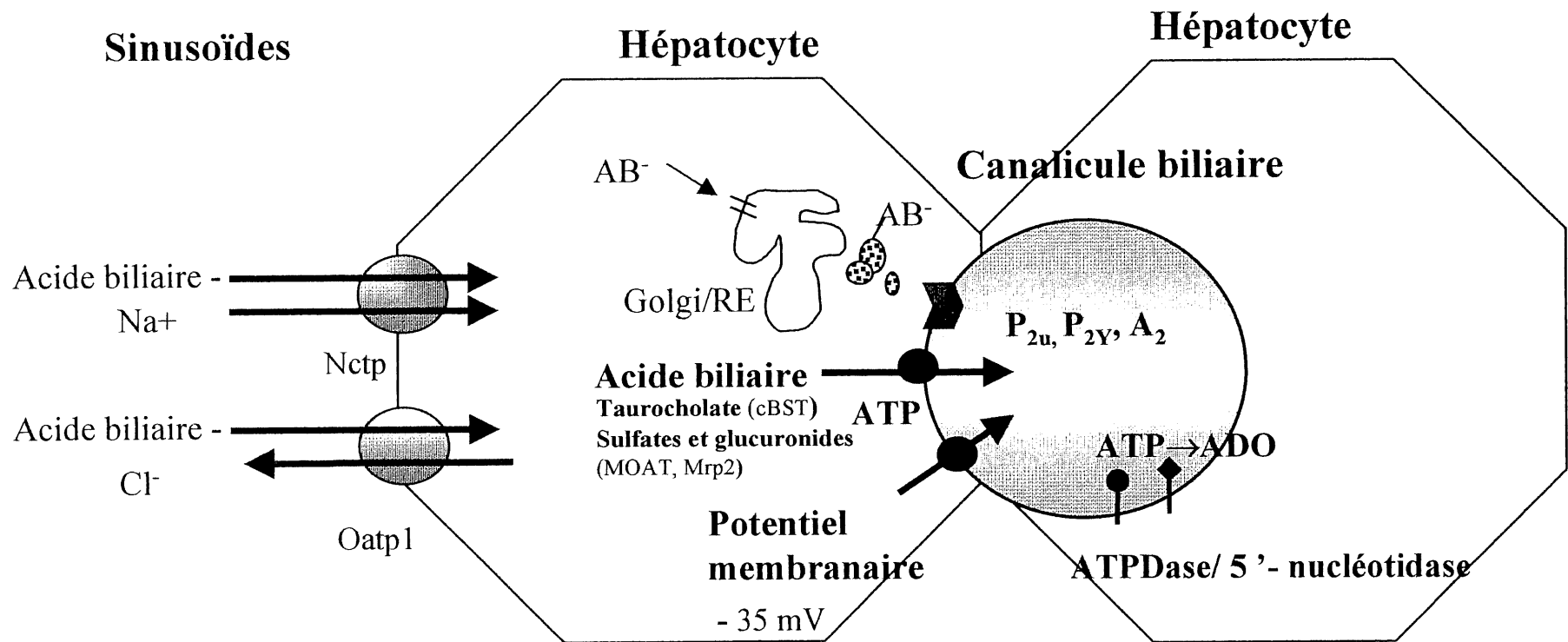


Figure 1-7. Schéma illustrant les différents modes de transport de la bile à travers et à l'intérieur de l'hépatocyte et à travers le canal biliaire.



Les nucléotides purinergiques sont présents dans la bile, ce qui indique que les hépatocytes peuvent relâcher des nucléotides dans les canalicules où ils seraient dégradés en adénosine par des ecto-ATPases et la 5'-nucléotidase. Dans les hépatocytes, les ecto-ATPases et la 5'-nucléotidase sont associées à la membrane des canaux biliaires. L'adénosine est transportée dans les hépatocytes par un système de transport des nucléotides Na<sup>+</sup>-dépendant présent dans la membrane canaliculaire. Le mécanisme par lequel l'ATP entre dans les canalicules n'est pas encore connu. Des évidences ont suggérées que la protéine canaliculaire MDR accomplit cette fonction. On a proposé aussi l'existence de transporteurs spécifiques pour l'ATP. Un autre mécanisme proposé serait le transport de l'ATP par des vésicules intracellulaires qui fusionnent avec la membrane et relâche l'ATP. Ces éléments ont donc conduit au concept que les acides biliaires et les autres composés organiques sont transportés dans la bile par un mécanisme ATP-dépendant (Che et al., 1992,1997; Suchy et al., 1997).

L'identification des protéines responsables du transport des sels biliaires à travers la membrane a fait l'objet de nombreuses recherches. En 1960, Novikoff et Essner (Novikoff et Essner, 1960) ont démontré par immunocytochimie la présence d'une ATPase dans le foie de mammifères. Depuis ce temps, plusieurs activités nucléotidases associées à la membrane plasmique des cellules hépatiques ont été décrites dans la littérature (Novikoff et Essner, 1960; Wattiaux et al., 1968; Lin et Fain, 1984). Dans les hépatocytes, l'ecto-ATPase et la 5' nucléotidase sont principalement localisées dans le domaine canaliculaire de la membrane plasmique (Lin, 1989). En 1985, Lin et ses collaborateurs ont purifié une protéine démontrant une activité ATPasique dépendante du calcium et du magnésium. Celle-ci a été identifiée comme étant une ecto-ATPase (Lin et Guidotti, 1989; Aurivillius, 1990; Lin et al., 1991). L'enzyme a été ensuite clonée et son poids moléculaire a été estimé à approximativement 60 000 Da sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE. La localisation de l'enzyme par immunofluorescence a permis de déterminer que l'ecto-ATPase était restreinte à la membrane canaliculaire et le clonage et le séquençage du cDNA ont permis de prédire qu'il s'agissait d'une glycoprotéine de 519

acides aminés, ayant un poids moléculaire de 110 kDa (Lin and Guidotti, 1989; Aurivillius, 1990; Lin et al., 1991). Cependant, aucune activité ATPasique n'a été détectée après transfection de l'ADNc de cette protéine. Cette ATPase a été identifiée à une molécule d'adhésion: C-CAM et ne coderait pas pour une ATPDase (Plesner, 1995; Knowles, 1995). C-CAM semble être la même protéine que les protéines d'adhésion HA<sub>4</sub>, pp120, gp110 qui ont été purifiées et identifiées comme des récepteurs possibles de l'ATP permettant le transport de la bile à travers la membrane de l'hépatocyte vers le canalicule biliaire (Margolis et al., 1989; Becker, 1993; Kast et al., 1994; Najjar et al., 1994; Plesner, 1995; Sippel, 1997; Che et al., 1997).

Une protéine possédant une activité ATPasique mais n'utilisant pas l'ADP a aussi été mise en évidence par Ohkubo et ses collaborateurs (1980). Il s'agit d'une glycoprotéine et métalloprotéine ayant un pH optimum de catalyse de 7,5 et ayant un poids moléculaire de 65000 daltons. Le groupe de Lotersztajn a purifié une ATPase de haute affinité avec le calcium et le magnésium dans la membrane plasmique du foie de rat (Lotersztajn et al., 1981). D'autres activités ATPasiques ont été répertoriées et purifiées par Mego (1984), ainsi que Ezaki et ses collaborateurs (1992). Deux protéines membranaires possédant des activités ATPasiques et ayant un pH optimal de 5 et 8 unités respectivement (Mego, 1984) et une protéine, située à la surface membranaire, hydrolysant l'ATP et ADP et activée par le Ca<sup>2+</sup> et le Mg<sup>2+</sup> et ayant un pH optimal de 4,5 (Ezaki et al., 1992) ont été purifiées.

Lors d'essais « Northern blot » sur des échantillons de foie humain, bovin et de rat, Kaczmarek et al. (1996) ainsi que Kegel et collaborateurs (1997) ont démontré la présence d'un très faible signal lors de l'hybridation avec une sonde spécifique pour l'ATPDase (ribosonde antisense CD39). Le niveau d'ARNm dans le foie est donc très faible pour les ATP-diphosphohydrolases (Kegel et al., 1997).

### 1.2.3 Récepteurs purinergiques au niveau du foie

Chez les mammifères, le foie est le site majeur de la synthèse de novo des nucléotides de type purine (Che et al., 1992, 1997). Ceci situe le foie à un niveau important dans l'utilisation des purines. La concentration en adénosine dans le foie est de  $4,95 \pm 0,89$   $\mu\text{M}$  (Che et al., 1997). Ainsi, les tissus endommagés ou dont le niveau de purines est plus faible génèrent un ou des signaux accroissant la synthèse des purines par le foie qui les relâche dans le sang. Ces nucléotides sont ensuite recapturés, puis retrouvés dans la bile. L'hépatocyte est la source majeure d'ATP dans les canalicules biliaires. Un dommage sévère ou aigu du foie peut contribuer à réduire l'apport de purines aux tissus ou organes comme les muscles ou le cerveau qui dépendent particulièrement de ces molécules provenant du foie (Che et al., 1997). Par exemple, en hypoxie, l'ATP est relâché et s'accumule dans les canalicules biliaires, ce qui peut produire une cholestase (diminution de la sécrétion biliaire) associée à un accroissement de la concentration de calcium intracellulaire (Che et al., 1992).

L'ATP, l'ADP et l'AMP relâchés des hépatocytes et des canaux biliaires influencent la régulation de la sécrétion biliaire (Che et al., 1992, 1997). Ils serviraient de facteurs de régulation de la sécrétion autocrine et paracrine (Sippel et al., 1994; Che et al., 1997). L'ATP et ses dérivés sont présents en concentration suffisante dans la bile pour activer les récepteurs présents sur la membrane canaliculaire (Meier, 1995; Che et al., 1997; Thorsten et al., 1997). Au niveau du foie, les nucléotides, dont l'action est médiée par les purinocepteurs, seraient impliqués dans la glycogénolyse (Keppens et De Wulf, 1986; Keppens, 1993), la contraction canaliculaire (Nathanson, 1991; Che et al., 1992, 1997), la perméabilité cellulaire des jonctions serrées (Nathanson, 1991, 1992), la sécrétion biliaire (Nathanson, 1991), la genèse de l'urée (Guinzberg et al., 1987), la néoglucogénèse (Koike et al., 1992), l'accroissement du niveau de phosphatidates (Bocckino et al., 1987; Keppens, 1993) et la contraction/relaxation des vaisseaux

sanguins irriguant le foie (Haüssinger et al., 1988; Mathie et al., 1991).

L'action de l'ATP et l'ADP est médiée, en partie, par des récepteurs de type  $P_{2u}$  (Schlenker et al., 1997; Wolkoff et al., 1995) et  $P_{2y}$  (Che et al., 1997, 1992; Keppens, 1993; Haüssinger et al., 1987; Keppens et De Wulf, 1986), alors que l'action de l'adénosine est médiée par des récepteurs de type  $P_1 : A_2$  (Mathie et al., 1991; Charest et al., 1985). Le tableau 1-4 résume les différents récepteurs retrouvés au niveau du foie. Il est à noter que la réponse des récepteurs à ces molécules est cinq fois plus effective pour l'ATP que l'ADP. Cela est dû au fait que l'effet de l'ADP est principalement dû à son action sur le récepteur  $P_{2Y}$  (Boarder et al., 1995).

L'adénosine, via les récepteurs  $P_1 (A_2)$ , interagit sur plusieurs aspects du métabolisme cellulaire du foie (Mathie et al., 1991; Charest et al., 1985). Elle a pour effet d'augmenter la glycolyse par l'activation de la glycogène phosphorylase, de stimuler la genèse de l'urée et de diminuer la synthèse protéique (Tinton et al., 1996). La hausse de la glycolyse implique l'augmentation de l'AMPc libéré en réponse à l'adénosine (Keppens, 1993; Charest et al., 1985). La glycogène phosphorylase est activée par une élévation de la concentration de l'AMPcyclique et en même temps, la glycogène synthase est transformée sous sa forme inactive par l'intervention d'une kinase dépendante de l'AMP cyclique (Granner et al., 1989). L'adénosine favorise aussi la vasodilatation des vaisseaux irriguant le foie (Mathie et al., 1991).

La réponse à l'ATP et à l'ADP dans la glycolyse implique l'action des récepteurs de type  $P_{2Y}$  (Keppens, 1993). L'effet de l'ATP sur la glycolyse, via les récepteurs de type  $P_2$ , se produit de façon biphasique. On observe une première phase d'activation rapide de la glycolyse puis une seconde phase, plus lente et progressive, marquant une diminution de la synthèse du glucose (Koike et al., 1992; Vanstapel et al., 1991). L'activation des récepteurs purinergiques conduit à l'activation de la glycogène phosphorylase en activant des enzymes effectuant la conversion de la forme *b* inactive en

la forme  $\alpha$  active de la glycogène phosphorylase et inhibe la glycogène synthase. La régulation de ces enzymes constitue l'étape limitante dans la glycogénolyse (Petit et al., 1996; El-Moatassim et al., 1992; Vanstapel, 1991). L'augmentation de la glycogénolyse dépend de la concentration calcique dans la cellule (Boarder et al., 1995; El-Moatassim et al., 1992). Le diacylglycérol est un activateur de la protéine kinase C. Celle-ci n'active pas la glycogène phosphorylase mais serait plutôt responsable de l'inhibition de la glycogène synthase (Keppens, 1993). Les récepteurs  $P_{2U}$  localisés dans la membrane apicale sont impliqués dans la réponse sécrétrice canaliculaire (Thorsten et al., 1997; Schlenker et al., 1997; Wolkoff et al., 1995). Ceci est dû à l'augmentation du calcium intracellulaire dans l'hépatocyte en réponse à l'ATP ou l'UTP (Wolkoff et al., 1995). Les récepteurs  $P_{2U}$  sont aussi impliqués dans l'activation de la glycogénolyse (Boarder et al., 1995; Beaudoin et Sévigny, 1994). Un autre phénomène important associé aux purinocepteurs est la régulation autocrine du volume des cellules par la libération d'ATP extracellulaire. Lors de l'étirement mécanique de la cellule, de l'ATP est relâché et se liera ensuite à un récepteur  $P_2$ . Un canal chlore sera ensuite activé, libérant du chlore permettant ensuite à la cellule de retrouver sa forme initiale. Le récepteur  $P_{2U}$  est donc impliqué dans la régulation de la pression osmotique des cellules hépatiques (Wang et al., 1996; Roman et al., 1997).

Les nucléotides purines ont aussi pour rôles de provoquer la relâche et de stimuler la synthèse des prostaglandines et des thromboxanes (Vanstapel et al., 1991; Haüssinger et al., 1988) par les cellules de Küpffer (Vanstapel et al., 1991). Les réponses de la pression sanguine et de la glycogénolyse aux nucléotides extracellulaires sont partiellement médiées par les thromboxanes ( $B_2$ ) et les prostaglandines ( $E_2$ ,  $D_2$ ). Ils exercent un effet direct sur la pression portale, sur le relâchement du glucose, du calcium et du potassium sans qu'il y ait d'effet exercé sur la glycogène phosphorylase (Haüssinger et al., 1988). De plus, l'ATP accroît le niveau de phosphatidates via la stimulation de l'activité de la phospholipase D. Le rôle physiologique des phosphatidates serait lié à l'influx calcique et possiblement à l'inhibition de l'effet du glucagon sur l'AMPc. L'augmentation de

calcium intracellulaire est aussi influencé par le glucagon puisque celui-ci joue un rôle sur le niveau d'AMPC des hépatocytes (Keppens, 1993; Bocckino et al., 1987).

La présence de récepteurs P<sub>2</sub> (P<sub>2U</sub> et P<sub>2Y</sub>) et P<sub>1</sub> (A<sub>2</sub>) au niveau du foie suggère l'existence d'ectonucléotidases qui seraient responsables du métabolisme des purines qui contrôlent ou influencent le transport biliaire dépendant de l'ATP, la contraction et relaxation des vaisseaux sanguins irriguant le foie ainsi que la glycogénolyse.

Tableau 1-4. **Récepteurs purinergiques retrouvés dans le foie.**

Récepteurs		Agonistes	Action physiologique
P <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	Adénosine et AMP	↑ de la glycogénolyse (effet biphasique) Effet vasodilatateur
P <sub>2</sub>	P <sub>2Y</sub>	ATP, ADP et analogues	↑ de la glycogénolyse (effet biphasique)
	P <sub>2U</sub>	ATP, UTP et analogues	↑ de la glycogénolyse (effet biphasique) Régulation osmotique Impliqué dans la sécrétion biliaire

## **1.3 Hypothèse de travail**

### **1.3.1 Prémisses**

Depuis les dernières décennies, de nombreux auteurs ont décrit la présence d'activités ATPasiques (Novikoff et Essner, 1960; Emmelot et al., 1964, 1968; Ohkubo et al., 1980; Lotersztajn et al., 1981; Ezaki et al., 1981; Lin et Fain, 1984; Mego, 1984) et ADPasiques (Wattiaux-de-Coninck and Wattiaux, 1969; Ezaki et al., 1981) au niveau de la membrane plasmique du foie. Dans les hépatocytes, l'ecto-ATPase et la 5'-nucléotidase ont été associées à la portion canaliculaire des hépatocytes et à la membrane plasmique (Lin, 1989). Lors d'essais préliminaires, un signal a été obtenu par Sévigny (1997) sur Western Blot en utilisant l'anticorps "Ringo" dirigé sur la partie N-terminale de l'enzyme. Cependant, sur Northern blot avec des échantillons de foie humain, bovin et de rat, Kegel et al. (1997) et Kaczmarek et al. (1996) n'ont réussi qu'à obtenir un très faible signal en utilisant une sonde spécifique pour l'ATPDase (ribosonde antisense CD39). Ceci n'expliquerait pas le signal obtenu sur Western blot et suggérerait la présence d'un nouveau type d'ecto-ATPDase au niveau du foie.

### **1.3.2 Hypothèse de travail**

Les observations décrites à la section précédente nous ont amenés à formuler l'hypothèse suivante: parmi toutes les enzymes responsables de l'activité phosphohydrolase dans le foie de mammifères, il existerait une ATP-diphosphohydrolase ayant des caractéristiques différentes des ATPDases déjà connues jusqu'à maintenant. De plus, cette enzyme serait

localisée au niveau du parenchyme et des canaux biliaires. Celle-ci, de par son activité, aurait pour rôle principal de contrôler la concentration des nucléotides extracellulaires au niveau du foie.

### **1.3.3 Objectifs**

1. Purification partielle et caractérisation biochimique de l'enzyme du foie et étude de l'influence des sels biliaires.
2. Immunolocalisation de l'enzyme dans le foie afin de mieux définir ses rôles dans cet organe.



## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Matériel

L'anticorps anti-lapin IgG conjugué à une phosphatase alcaline, l'ATP, l'AMP, l'azide de sodium, l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA), le  $\beta$ -D-fructofuranosyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (sucrose), l'ammonium molybdate, 1,2,3-propanetriol (glycérine), le Ponceau S, le sodium déoxycholate, le tétramisole, l'imidazole, le vert de malachite, le tween 20, le Nitro blue tétrazolium (NBT), le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), l'inhibiteur de trypsine (SBTI), le phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF), la bile et les extraits biliars (acide taurocholique, acide taurodéoxycholique, acide sodium-glychocholique, acide déhydrocholique, acide cholique) provenaient de SIGMA Chemical CO., St-Louis, MO, USA. L'ADP, l'AMP, le Triton X-100 et le lumi-Phos 530 ont été achetés chez Boehringer-Mannheim, Laval, Québec Canada. Le  $\text{CaCl}_2$ , le  $\text{MgCl}_2$ , le paraformaldéhyde et le polyoxyéthylène [20] sorbitan monolaurate (Tween 20) étaient commandés à la compagnie Fisher Scientific Co. (Montréal, Québec, Canada). Nous nous sommes procurés l'albumine sérique bovine (BSA), la matrice d'agarose (DEAE Bio-Gel A), le SDS, les standards de poids moléculaires, l'Amido black, le bleu de Coomassie ainsi que la polyacrylamide à la compagnie Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada. Les membranes d'Immobilon-P ont été achetées chez Millipore Corp., Bedford, MA, U.S.A. Les foies de porcs provenaient de l'abattoir Bienvenue, St-Valérien, Québec, Canada.

## 2.2 Méthodes

### 2.2.1 Essais enzymatiques

Nous avons mesuré l'activité phosphohydrolase par la méthode colorimétrique au vert de malachite. Il s'agit d'une méthode très sensible, de l'ordre du nanomolaire (Baykov et al., 1988, Geladopoulos et al., 1990). Le réactif a une coloration initiale orangée. La présence de phosphate inorganique libéré dans le milieu d'incubation suite à la réaction enzymatique permet d'obtenir une coloration verte dont la densité optique est mesurée par spectrophotométrie à 630 nm.

Solutions     A: 7,5 % (p/v) de molybdate d'ammonium dissout dans l'eau nanopure  
                  B: 0,122 % (p/v) de vert de malachite dans l'acide sulfurique 6N  
                  C: 11 % (p/v) Tween 20

Le réactif colorimétrique est préparé dans les proportions de 2,5:10:0,2 ml de solutions A, B et C respectivement. L'enzyme est mise dans le tampon de dosage (Tris 50 mM, Imidazole 50 mM, calcium 8 mM et Tétramisole 50 mM (un inhibiteur de la phosphatase alcaline)) à pH 7,5. Le calcium est donc présent sous forme d'ion divalent:  $\text{Ca}^{2+}$ . La réaction débute avec l'ajout de 0,2 M de substrat (ADP ou ATP). Cette concentration de substrat correspond à environ vingt-cinq fois le  $K_m$  de l'enzyme et donne un faible bruit de fond pour la détermination de la concentration de phosphate inorganique produit. La réaction est arrêtée lorsque le réactif colorimétrique est ajouté (0,25 ml) au mélange. Des standards de phosphore inorganique permettent d'évaluer la quantité de phosphate libéré par l'enzyme.

L'activité mesurée est exprimée en unité d'enzyme. Une unité d'enzyme correspond à la quantité d'enzymes nécessaire au relâchement d'une micromole de phosphate inorganique/ min./ mg de protéines, à 37 °C (LeBel et al., 1980). Les protéines sont mesurées selon la méthode de Bradford (Bradford et al., 1976) en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard.

## **2.2.2 Purification de l'ATPDase porcine hépatique**

### **I. Fractionnement cellulaire**

Les activités ATPase et ADPase ont été purifiées selon la procédure décrite par Sévigny (1997). Quelques modifications ont été apportées puisque l'enzyme était instable dans ces conditions de purification. Le foie de porc provenait directement de l'abattoir et était découpé en fins morceaux puis homogénéisé au Polytron. Un homogénat de 10 % (v/v) a été effectué dans un tampon Tris 25 mM, sucrose 0,25 M, PMSF 0,1 mM et SBTI 20 µg/ml à pH 7,5, à 4°C. Après filtration sur coton-fromage triple épaisseur, l'homogénat a été centrifugé à 600 g (2100 rpm), 15 min. à 4°C avec le rotor JA-14. Cette étape permettait de se débarrasser des débris cellulaires et des noyaux (Ozols, 1990). Le surnageant recueilli est centrifugé de nouveau, mais cette fois-ci, à une vitesse de 22 000 g (12 000 rpm) durant 1h30, à 4°C en utilisant le même rotor que précédemment (JA-14). Le culot enrichi en mitochondries et en fractions microsomales (Ozols, 1990) a été resuspendu dans le tampon d'homogénéisation et broyé au Potter-Elvehjem avec embout de téflon. La suspension a ensuite été déposée sur un coussin de sucrose 40 %. Un maximum de 5 mg de protéines par ml doit être déposé. Après une centrifugation à 100 000 g durant 2h30, à 4°C (26 000 rpm; SW-28), la fraction enrichie en membranes a été recueillie. Deux lavages successifs avec NaHCO<sub>3</sub> 1 mM, puis EDTA 2 mM ont été

effectués. Puis, les échantillons ont été resuspendus et congelés dans un tampon contenant du Tris 5 mM à pH 8 et du glycérol 7,5 %. L'activité spécifique et la concentration de protéines de chacune des fractions recueillies ont été dosées afin de suivre l'activité tout au long des différentes étapes de purification. Le schéma de la figure 2-1 décrit les étapes de purification effectuées.

## **II. Solubilisation des protéines membranaires**

Les protéines membranaires ont été solubilisées dans du Triton X-100, un détergent non ionique. Une concentration de 15 % Triton X-100 est utilisée pour la solubilisation de l'ATPDase hépatique dans un tampon Tris 20 mM, à pH 8. Par la suite, ce mélange a été centrifugé à 100 000 g (35 000 rpm; 50.2 Ti) durant une heure à 4°C. Le surnageant est recueilli et déposé sur une colonne échangeuse d'ions.

## **III. Purification sur colonne échangeuse d'ions**

Une colonne DEAE-Agarose comprenant 18 ml de matrice et ayant une capacité d'environ 10 mg de protéines par ml de matrice a été utilisée pour cette purification. La colonne a été préalablement activée avec du NaOH 0,01 N puis rincée avec un tampon de base DEAE (Triton X-100 0,1 %, glycérol 7,5 % et Tris 5 mM pH 8, à 4°C). L'échantillon a été déposé et élué à une vitesse de 10 à 20 ml par heure (maximum 30 ml par heure). Les fractions ont été recueillies avec un collecteur de fractions LKB Bromma 2111 Multirac. Un gradient de NaCl variant de 0,05 M à 0,3 M a été appliqué sur la colonne pour permettre l'éluion des protéines. Les protéines résiduelles ont été décrochées de la colonne par une solution NaCl 2 M, Triton X-100 0,1 %. Les protéines et l'activité phosphohydrolase ont été dosées dans chacun des tubes recueillis.

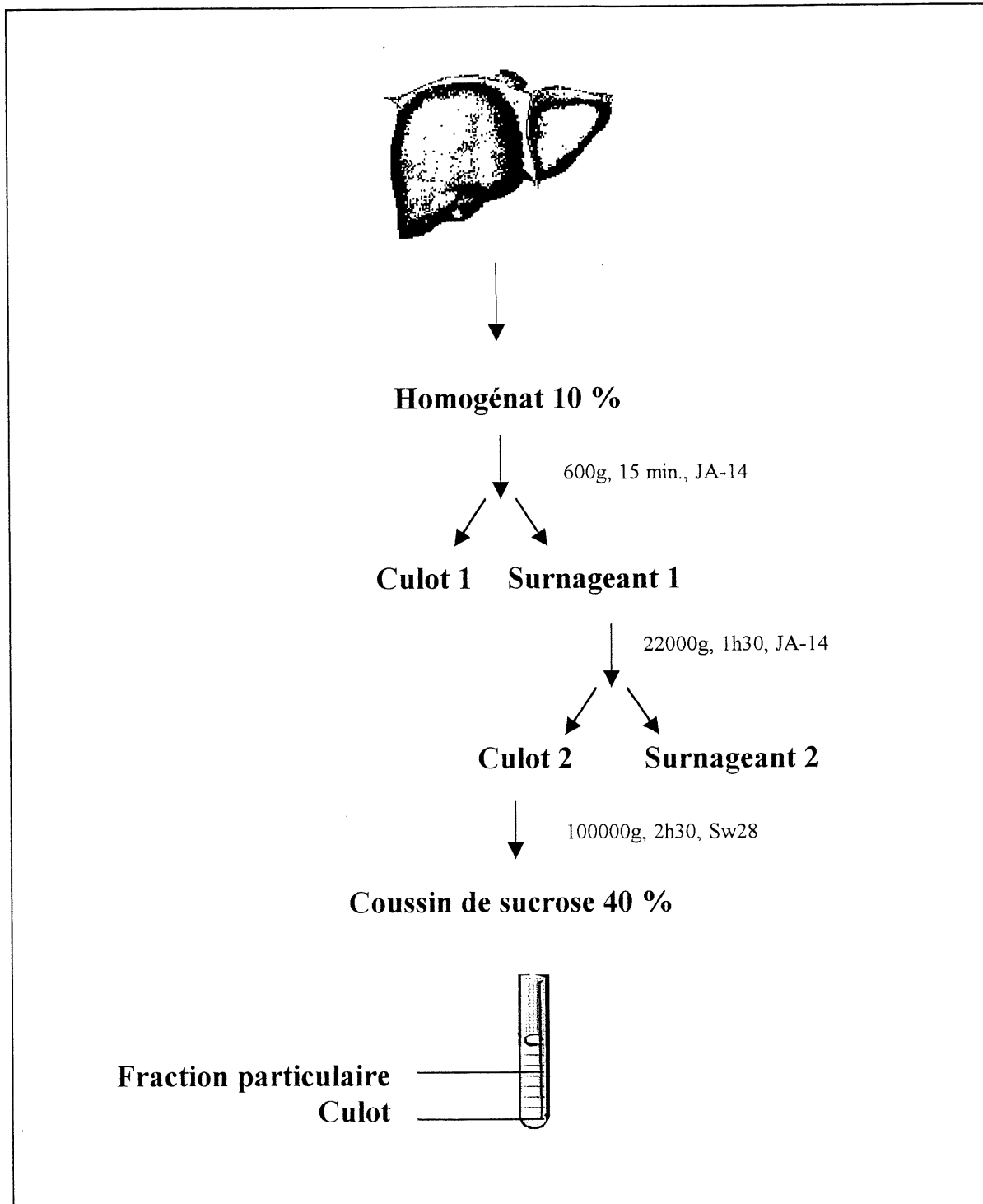


Figure 2-1. Schéma illustrant le fractionnement cellulaire du foie.

### **2.2.3 Électrophorèse des protéines et immunobuvardage de type Western**

#### **I. Gel SDS-PAGE**

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a été effectuée sur les fractions actives selon Laemmli (1970). 20 µg de protéines par puits ont été déposés sur mini-gels de polyacrylamide 11 %. Les protéines sur gel ont été visualisées par coloration au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie 0,25 %, isopropanol et acide acétique 10 %) durant 1h environ.

#### **II. Immunobuvardage de type Western: transfert et détection**

Le transfert des protéines sur membrane de nylon (Immobilon-P) a été effectué à l'aide d'un appareil de transfert « semi-dry ». La membrane de Nylon a été mouillée dans le méthanol durant quelques secondes, puis équilibrée dans le tampon de transfert (Tris-Base 25 mM, glycine 0,192 M, méthanol 15 % (v/v)) durant 10 min. Le gel a aussi été incubé dans ce même tampon. Le transfert des protéines a été effectué durant 30 min. sous tension de 15 V pour un mini-gel. Les protéines transférées sur la membrane ont été révélées par la méthode de coloration au Ponceau rouge: 2% Ponceau S (p/v), 30 % (p/v) acide trichloroacétique (TCA) et 30 % (p/v) acide sulfosalicylique. Le standard a été coloré dans une solution d'Amido Black (Amido Black 0,1 % (p/v), méthanol 10 % (v/v) et acide acétique 2 % (v/v)) durant 5 min. Cette coloration est plus sensible, plus stable et les bandes se visualisent très bien sur photo, sans utilisation de filtre.

Pour la détection de l'ATPDase, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la portion N-terminale de l'ATP-diphosphohydrolase (KSDTQETYGALDLGGA). La révélation a été effectuée à l'aide d'une technique utilisant la chemiluminescence (lumi-phos 530). L'anticorps utilisé, "Ringo", est un anticorps polyclonal reconnaissant les types I et II de l'ATP-diphosphohydrolase (Sévigny, 1997).

La membrane de Nylon a été humectée dans une solution de mouillage (NaCl 0,9 %, Tween 20 0,5 %, Tris 20 mM pH 7,4 et méthanol 25 %) durant 45 min. Ensuite, les sites non spécifiques ont été bloqués en incubant 10 min. dans la solution A de blocage (NaCl 0,9 %, Tris 20 mM, albumine sérique bovine (BSA) 0,2 %, lait en poudre 1 % et  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  10 mM, à pH 7,4, à 25 °C). La membrane a subi une seconde incubation, cette fois-ci de 50 min. dans la solution A fraîche. Après, deux rinçages de 5 min. ont été effectués avec la solution B (NaCl 0,9 %, BSA 0,1 % et Tris 20 mM à pH 7,4, à 25 °C). Ensuite, la membrane a subi une incubation de 2 heures avec l'anticorps primaire "Ringo" (anticorps dirigé contre l'ATP-diphosphohydrolase) dilué 1:10 000 dans la solution C (NaCl 0,9 %, BSA 1 %, Tween 20 0,02 % à pH 7,4, à 25 °C). Pour éliminer les anticorps libres nous avons fait 5 rinçages successifs de 4 min. avec la solution B. Une incubation de 1h30 avec l'anticorps secondaire dilué (1:10 000) dans la solution C a permis la liaison de l'anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline. Une nouvelle série de rinçages a été effectuée afin d'éliminer les anticorps secondaires libres.

Pour la révélation des bandes d'ATP-diphosphohydrolase à l'aide du substrat chemiluminescent, la membrane a tout d'abord été équilibrée dans le tampon pour la phosphatase alcaline (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M à pH 9,5, à 20 °C) durant 2 à 5 min., à 37 °C. Puis elle a été placée dans un sac scellé dans lequel nous avons déposé une dizaine de gouttes (environ 3 ml par  $\text{cm}^2$ ) de substrat pour la luminescence (lumi-phos 530). Le liquide a été étendu sur toute la membrane et le surplus est éliminé. Il est important d'éliminer la présence de toutes les bulles d'air avant de sceller de nouveau le sac. La membrane a été incubée 5 min. à la température de la pièce, puis 5 à 15 min., à 37 °C afin d'augmenter la réaction luminescente. Le film a été exposé durant 15 à 25 minutes à la température de la pièce, puis développé dans la chambre noire.

#### **2.2.4 Détection des activités enzymatiques par électrophorèse en conditions non dénaturantes (enzymogramme)**

Chaque échantillon a d'abord été solubilisé dans une solution contenant du Triton X-100 (0,7 %) et du déoxycholate de sodium (1,5 %) et déposé sur gel de polyacrylamide 10 % dans le tampon (3X) suivant : glycérol 30 %, Tris-base 195 mM et Bleu de Bromophénol 0,003 % à pH 6,8. Le gel de polyacrylamide contenait 0,1 % de Triton X-100 et déoxycholate de sodium. Il a été soumis à un courant de 10 mA pendant environ 1 heure. La migration doit se faire à la température de 4 °C afin de conserver l'activité enzymatique. Après la migration, le gel a été coupé et incubé à 37 °C dans le tampon de dosage (section 2.2.1) durant 10 min. afin d'acclimater le gel. Ensuite, on a ajouté le substrat (ATP ou ADP) à une concentration de 5 mM et cela toujours dans le même tampon. Les bandes sont visibles après 12 à 24 heures d'incubation, toujours à 37 °C. On observe des bandes blanches visibles grâce à la formation d'un dépôt de phosphate de calcium.

#### **2.2.5 Caractérisation de l'ATP diphosphohydrolase hépatique**

##### **I. Effet du pH sur l'enzyme et détermination du pH optimum :**

Afin de déterminer l'influence du pH sur l'activité catalytique de l'enzyme, nous avons utilisé les tampons d'incubation suivant : Tris 50 mM, imidazole 50 mM, calcium 8 mM et tétramisole 50 mM et avons fait varier le pH de 5 à 9, à 37 °C. L'expérience a été réalisée sur la fraction particulière du foie de porc.



## **II. Effet de l'azidure de sodium et du gossypol sur l'ATP diphosphohydrolase du foie et de la rate:**

L'azidure de sodium, un inhibiteur non spécifique des ATPDases, était fraîchement préparé et additionné au tampon de dosage pour obtenir une concentration finale de 10 mM. Le gossypol était ajouté pour obtenir une concentration finale de 0,035 mM. Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé les fractions particulières du foie de porc et de la rate de boeuf. Les essais étaient effectués à 37 °C dans 1 ml de milieu d'incubation (Tris-imidazole 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 8 mM et tétramisole 5,0 mM, à pH 7,5).

## **III. Influence du calcium (Ca<sup>2+</sup>) et du magnésium (Mg<sup>2+</sup>) sur l'ATPDase hépatique :**

Des concentrations croissantes de magnésium ou de calcium ont été ajoutées (0 à 10 mM) afin d'étudier leurs effets sur l'activité enzymatique de l'ATPDase. 1 mM EDTA est ajouté à la solution ne contenant pas de calcium ou de magnésium. Les essais ont été effectués sur la fraction particulière de foie de porc. Le tampon de dosage Tris-imidazole 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 8 mM et tétramisole 5,0 mM, à pH 7,5 a été utilisé lors de ces essais.

## **IV. Spécificité de substrat:**

Nous avons comparé la vitesse d'hydrolyse des triphospho-, des diphospho- et des monophosphonucléosides. Des concentrations finales de 200 μM de triphosphonucléosides (ATP, CTP), de diphosphonucléosides (ADP, GDP) et de nucléosides monophosphates (AMP, GMP et UMP) ont été utilisées pour les dosages sur la fraction particulière du foie de porc afin de déterminer la spécificité de l'enzyme pour certains substrats. Les essais étaient effectués dans le même tampon de dosage décrit précédemment.

## **V. Influence du Triton X-100 sur l'activité enzymatique:**

L'activité de l'enzyme a été mesurée dans un tampon contenant des concentrations de 0 à 15 % de Triton en utilisant la fraction particulaire du foie de porc dans un milieu d'incubation Tris-imidazole 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 8 mM et tétramisole 5,0 mM, à pH 7,5.

## **VI. Détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme du foie :**

Les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) ont été déterminés en utilisant des concentrations finales variant de 10 à 200  $\mu$ M de substrat, soit l'ADP ou l'ATP. Les essais cinétiques étaient effectués à 37 °C dans 1 ml de milieu d'incubation (Tris-imidazole 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 8 mM et tétramisole 5,0 mM, à pH 7,5). La réaction débutait par l'addition du substrat. Les essais ont été effectués avec la fraction purifiée de l'ATPDase de foie de porc.

## **VII. Effet des sels biliaries sur l'ATP diphosphohydrolase hépatique et de la rate :**

Pour déterminer l'influence des sels biliaries et leurs conjugués sur les fractions particulières de foie de porc et de la rate de boeuf, les dosages ont été effectués en utilisant le 7-déhydrocholate, le cholate, le glycocholate, le taurocholate et le taurodéoxycholate dans des concentrations finales variant de 0 à 2 mM en utilisant un tampon Tris-imidazole 250 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, pH 7.0, à 37 °C .

### 2.2.6 Immunocytochimie

Le foie fraîchement coupé a été fixé dans une solution contenant du paraformaldéhyde 2 % et du glutaraldéhyde 0,17 % dans un tampon contenant du cacodylate de sodium 0,1 M et du sucrose 4 % à pH 7,4. Le tissu a été déshydraté en utilisant des concentrations croissantes d'éthanol et enrobés dans la paraffine. Des coupes de 4 µm de tissu ont été déposées sur des lames polyioniques (Superfrost Plus Fisher, Montréal, Canada). Après la solubilisation de la paraffine avec du xylène, les morceaux de tissus ont été réhydratés dans des solutions d'éthanol avec des quantités croissantes d'eau, puis rincés dans une solution NaCl 150 mM, Tris 0,1 M, pH 7,5 (tampon TBS). Les tranches ont ensuite été incubées dans le tampon TBS contenant de la glycine 0,1 M et soumis à un traitement à chaleur et pression élevées (Miller, 1995) induisant le recouvrement des épitopes et cela dans un tampon contenant du EDTA 1 mM et du Tris 10 mM, pH 8.0 durant 9 min. Après, un lavage a été effectué dans le tampon TBS supplémenté de BSA 1 % et de lait écrémé 1 % durant 30 minutes, à la température de la pièce, pour éliminer les sites de liaisons non spécifiques de l'anticorps. Les sections sont incubées à 4 °C durant toute une nuit avec l'antisérum de l'ATPDase (1:100) ou le sérum pré-immun puis lavées dans le tampon TBS plusieurs fois et incubées avec un anticorps monoclonal de souris (anti-IgG de lapin) conjugué à la phosphatase alcaline (1 :100) durant 2h à la température de la pièce. La visualisation de l'ATP-diphosphohydrolase se fait avec les substrats NBT/BCIP et des photos sont prises au microscope Zeiss, avec un film Kodak T Max 100.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Résultats

##### 3.1.1 Purification de l'ATPDase hépatique

Nous avons effectué la purification de l'ATP-diphosphohydrolase et mesuré l'activité nucléotidase au niveau du foie de porc pour chacune des étapes de purification effectuées. Les activités sont rapportées au tableau 3-1. Il s'agit des résultats d'une expérience qui a été reproduite 3 fois. Ces résultats montrent un enrichissement des fractions sans toutefois augmenter l'activité ATPasique et ADPasique. Un gel révélé au bleu de Coomassie démontre la progression de la purification (figure 3-2c). Une quantité de 10  $\mu\text{g}$  de protéines a été déposée dans chaque puits. On note une augmentation de l'activité dans la fraction particulière, celle-ci est de 22 fois plus élevée lorsque comparée à l'homogénat. Après la solubilisation au Triton X-100, il y a une perte considérable de l'activité enzymatique due à la sensibilité de l'enzyme aux détergents. La purification de l'enzyme à l'aide de la colonne DEAE-agarose échangeuse d'anions permet d'éliminer une grande quantité de protéines (figure 3-1). Cependant, on note aussi une perte considérable d'activité suite à cette étape de purification. Dans chacune des fractions dosées, l'activité de l'ATPDase est supérieure avec l'ATP plutôt qu'avec l'ADP.

Tableau 3-1. **Bilan de purification de l'ATP-diphosphohydrolase hépatique en utilisant l'ADP comme substrat.** L'expérience a été répétée 5 fois. Représentation d'une expérience effectuée en triplicata.

Étapes	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification	Ratio ADP/ATP
Homogénat	324	0.011	100	1.0	0.31
FP	139	0.243	43	22	0.82
Fraction solubilisée Triton 15 %	69.9	0.127	22	12	0.52
Colonne DEAE	8.9	0.09	6.4	8.2	0.62

L'enzyme a été localisée après électrophorèse effectuée en conditions non dénaturantes. La figure 3-2a permet d'identifier l'enzyme. Celle-ci est représentée sur le gel par une bande blanche visible par la présence d'un précipité de phosphate de calcium. Les substrats utilisés sont l'ATP et l'ADP. En utilisant comme substrat l'ADP, on observe deux bandes caractéristiques de l'ATP-diphosphohydrolase de la rate (témoin positif). Une bande de hauteur intermédiaire est observable sur le gel. En révélant avec l'ATP comme substrat, on observe sensiblement le même patron de migration qu'avec l'ADP. La bande inférieure se trouve à une position légèrement plus basse que la bande du témoin positif. La bande intermédiaire est toujours visible sur le gel. Ces résultats

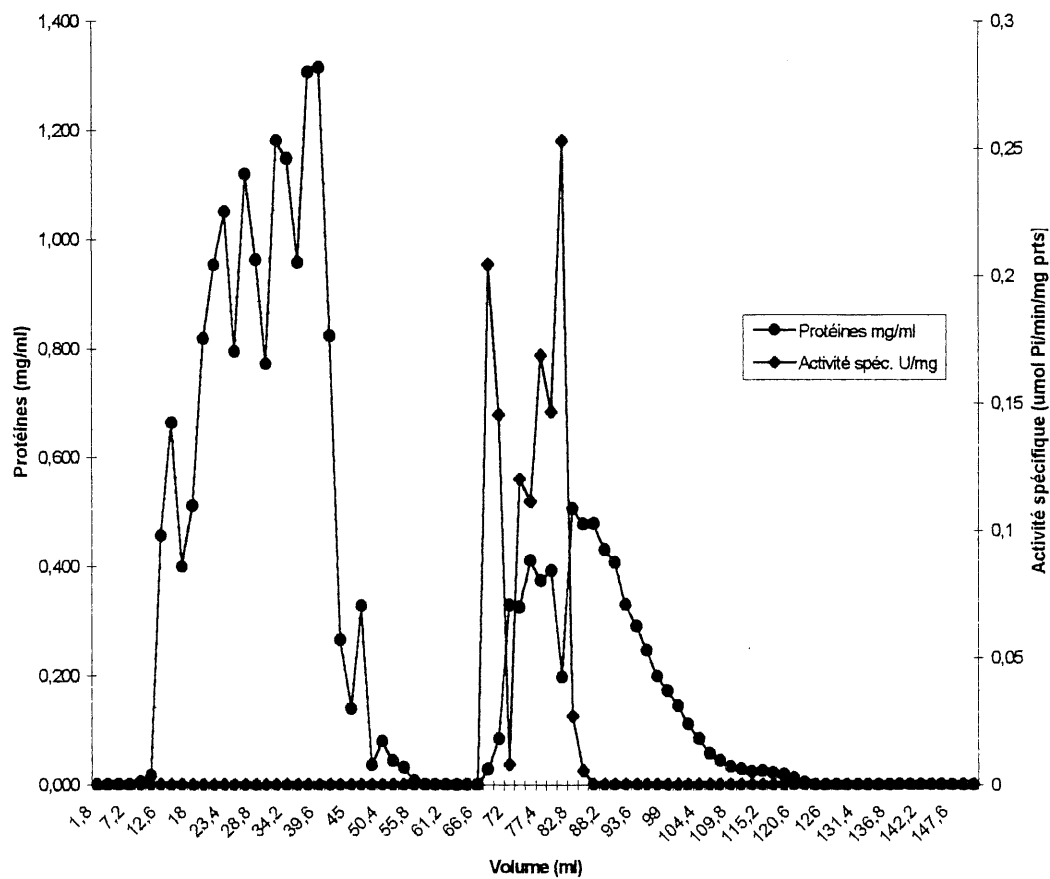


Figure 3-1. Profil de purification de l'ATP-diphosphohydrolase hépatique sur colonne échangeuse d'anions DEAE-agarose. L'expérience a été répétée au moins 4 fois. Représentation d'une expérience.

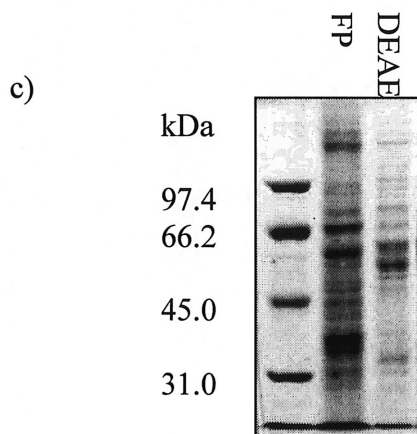
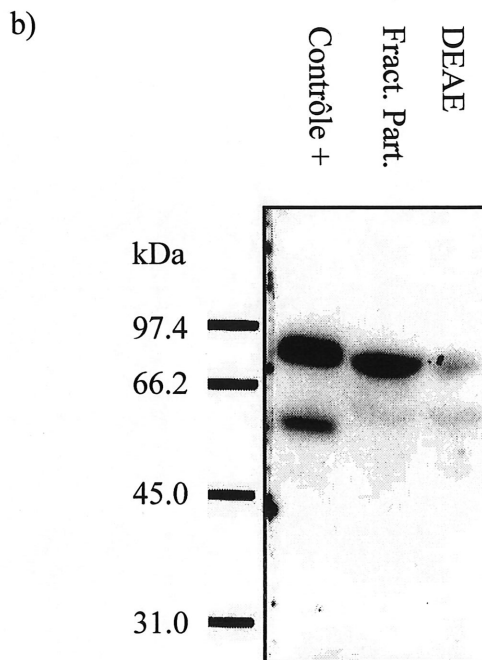
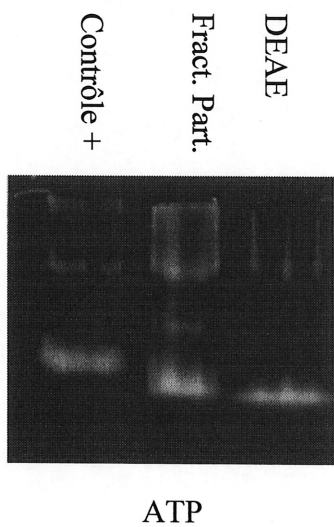
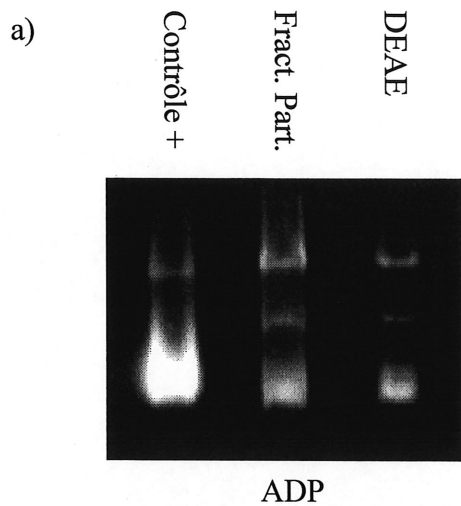


Figure 3-2. a) Gel effectué en conditions non dénaturantes, révélé avec l'ADP comme substrat permettant de démontrer la présence de l'ATP-diphosphohydrolase dans le foie. b) Immunobuvardage de type Western révélé par chemiluminescence. L'anticorps dirigé contre l'ATP-diphosphohydrolase du pancréas de porc réagit avec l'enzyme du foie de porc. c) Gel révélé au bleu de Coomassie.

montrent que les mêmes bandes pourraient être à la fois responsables des activités ATPasique et ADPasique et correspondre à l'ATP-diphosphohydrolase. Le patron de migration obtenu diffère légèrement entre la fraction de l'enzyme partiellement purifiée (FP) et celle récoltée suite à la colonne DEAE. Il semble que l'activité après la colonne DEAE soit trop faible pour que l'on puisse observer la bande intermédiaire ou que celle-ci ne soit tout simplement pas présente dans cette fraction.

L'anticorps primaire "Ringo" dirigé contre la partie N-terminale (16 premiers acides aminés) de l'ATP-diphosphohydrolase du pancréas de porc a permis d'identifier une ATPDase au niveau du foie (figure 3-2b). Ces résultats nous montrent une bande majeure correspondant approximativement à une masse moléculaire de 75 000, à une hauteur légèrement inférieure à l'ATPDase de type II de la rate de boeuf. Une seconde bande est observée légèrement au-dessus de la bande de 54 kDa. Il est à noter que le patron de migration obtenu est le même pour l'enzyme partiellement purifiée et celle purifiée par colonne chromatographique DEAE-agarose.

### 3.1.2 Caractéristiques biochimiques de l'ATPDase hépatique

Le pH optimal de l'enzyme partiellement purifiée a été déterminé en utilisant une série de tampons dont le pH variait de 5 à 9 unités et mesuré avec l'ATP ou l'ADP comme substrat. L'activité catalytique maximale de l'enzyme se situe à un pH légèrement acide. La figure 3-3 montre que le pH optimal de l'enzyme se situe autour de [6.5 - 7.0] pour l'ADP et l'ATP.

Nous avons ensuite étudié l'influence du calcium et du magnésium sur l'ATPDase hépatique partiellement purifiée. Les figures 3-4a et 3-4b montrent que l'enzyme est stimulée par la présence de calcium (sous forme  $Ca^{2+}$ ). L'activité demeure élevée (0,295



$\pm 0,003 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$  avec ADP et  $0,45 \pm 0,01 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$ ) pour des concentrations de 1 à 10 mM de calcium. Il est à noter qu'en utilisant l'ATP comme substrat, nous observons une légère baisse de l'activité à 2,5 mM. La figure 3-4b) montre l'influence du magnésium sur l'activité nucléotidase de la fraction particulaire. Avec ATP ou ADP comme substrat, l'activité maximale est presque atteinte à 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . À 2,5 mM, l'activité maximale est atteinte ( $0,370 \pm 0,004 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  pour l'ATP et  $0,248 \pm 0,004 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  pour l'ADP), puis redescend légèrement jusqu'à  $0,33 \pm 0,2 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$  pour l'ATP et  $0,224 \pm 0,002 \mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$  pour une concentration de 10 mM. L'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Mg}^{2+}$  supprime l'activité. Cette expérience permet de démontrer que les ions divalents sont nécessaires à l'activité de l'ATP-diphosphohydrolase hépatique.

La figure 3-5 illustre les effets de l'azidure de sodium (a) et du gossypol (b). Les résultats sont présentés en pourcentage d'activité relative au contrôle sans inhibiteur. Un test d'analyse de variance (ANOVA) *post hoc* de Tuckey a permis d'indiquer les différences significatives entre les échantillons contenant les inhibiteurs et le contrôle. L'azidure de sodium est connu comme un inhibiteur non spécifique des ATPDases et des ATPases mitochondriales (Côté et al., 1992c). On observe une inhibition de l'activité de l'ATPDase de la rate en présence de 10 mM d'azidure de sodium ou de 0,035 mM de gossypol. Ces effets ont été observés en utilisant l'ADP et l'ATP comme substrats. Pour ces mêmes concentrations d'inhibiteurs, aucun effet n'a été observé pour l'enzyme du foie pour le gossypol alors que pour l'azidure de sodium, on observe une différence significative seulement en utilisant l'ATP comme substrat. Il est à noter que l'enzyme du foie démontre une sensibilité moindre au gossypol et à l'azidure de sodium que l'enzyme de la rate.

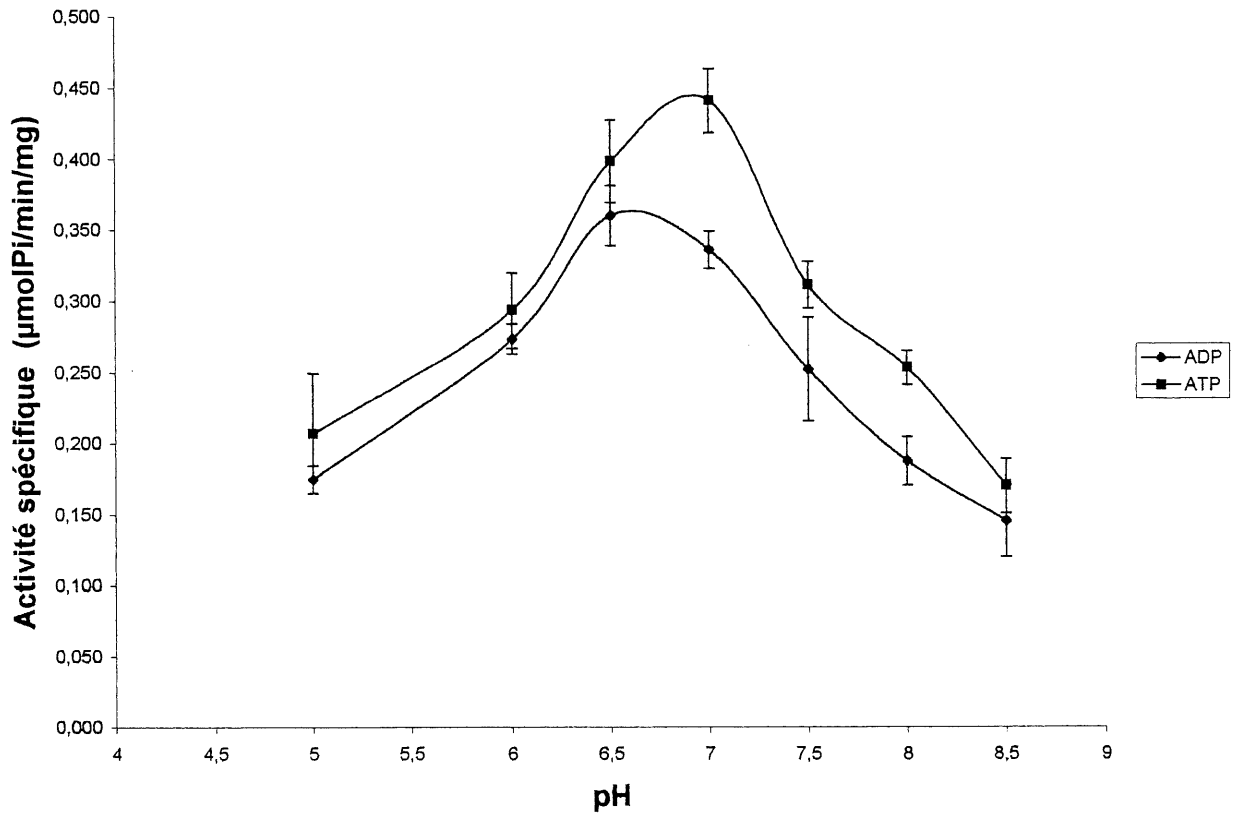
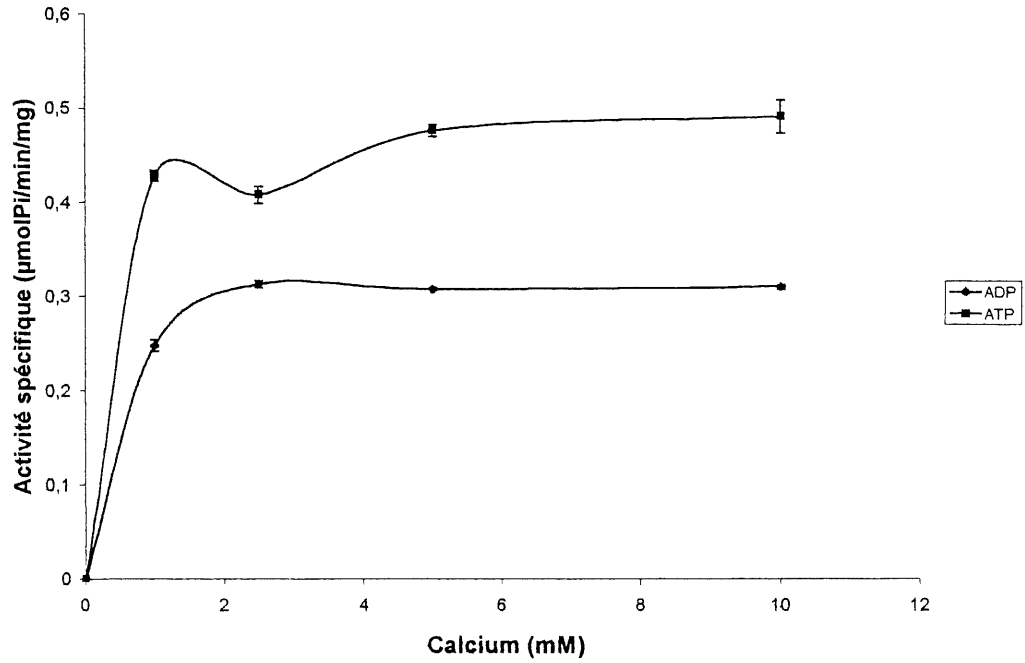


Figure 3-3. Détermination du pH optimal de l'ATP-diphosphohydrolase avec ADP ou ATP comme substrat. Résultat de 4 expériences distinctes effectuées en triplicata.

a)



b)

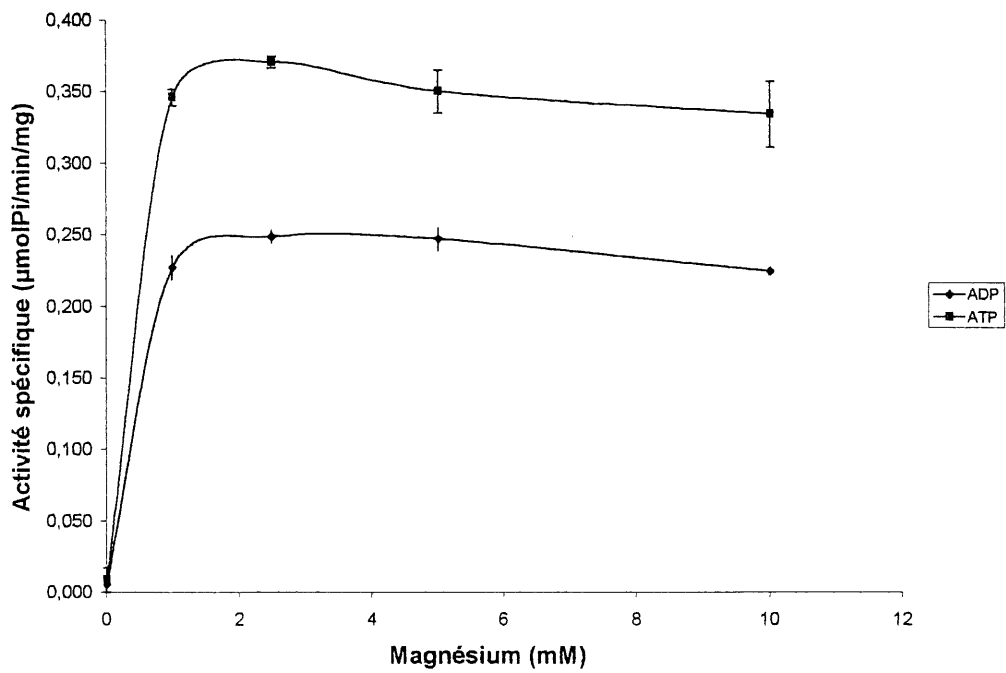


Figure 3-4. Influence du calcium (a) et du magnésium (b) sur l'hydrolyse de l'ATP et de l'ADP. Résultat de 2 expériences distinctes effectuées en triplicata.

Tableau 3-2. Influence du gossypol (0,035 mM) et de l'azidure de sodium (10 mM) sur l'activité des l'ATPDases de différents tissus.

Inhibiteur	Enzyme	ATP (% inhibition)	ADP (% inhibition)	Références
NaN <sub>3</sub>	Rate	48	67	Côté et al., 1992c
	Rate	43	57	
	Foie	13	4,6	Sévigny, 1997
	Foie	20	5	
	Aorte	32	55	Sévigny, 1997
Gossypol	Rate	65	47	
	Foie	2	0	
	Aorte	51	44	Côté et al., 1992c

Pour évaluer la spécificité de l'enzyme pour différents substrats, l'activité de la fraction particulaire du foie a été comparée avec différents nucléotides. Ces résultats sont représentés à la figure 3-6. Des concentrations de 200 µM finales de triphosphonucléotides (ATP, CTP), de diphosphonucléotides (ADP, GDP) et de nucléotides monophosphates (AMP, GMP et UMP) ont été utilisées pour les dosages. L'activité est comparée avec l'activité de l'enzyme avec ATP comme substrat et exprimée en activité relative par rapport à l'ATP qui correspond à 100 % d'activité. L'enzyme catalyse l'hydrolyse de l'ATP avec une grande vitesse. On observe aussi une grande spécificité pour le CTP et les diphosphonucléotides (ADP et GDP). Une très faible activité est mesurée avec les nucléotides monophosphates. L'hydrolyse des nucléotides monophosphates est effectuée présumément par la 5'-nucléotidase qui pourrait se retrouver dans cette fraction. La présence de cette enzyme au niveau de la membrane plasmique est d'ailleurs bien connue (Knowles, 1983). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par Côté et collaborateurs (1992c) où une activité de

catalyse plus élevée pour les triphosphonucléotides que pour les diphosphonucléotides a été observée, alors que l'activité pour les nucléotides monophosphates demeure très faible.

La présence de l'enzyme dans le système biliaire, nous a incité à étudier l'effet des sels biliaires et de leurs conjugués sur l'activité de l'ATPDase hépatique, en utilisant les fractions partiellement purifiées du foie et de la rate. Les résultats sont présentés en pourcentage d'activité par rapport à un contrôle sans sel biliaire (100 %) et ont été soumis à un test d'analyse de variance (ANOVA) *post hoc* de Tuckey. L'effet des sels biliaires a été mesuré sur l'ATPDase de la rate à titre comparatif en utilisant l'ADP comme substrat. Les sels biliaires et leurs conjugués utilisés sont le 7-déhydrocholate (fig. 3-7), le sodium cholate (fig. 3-8), le glycocholate (fig. 3-9), le taurocholate (fig. 3-10) et le taurodéoxycholate (fig. 3-11). Dans l'ordre du millimolaire, les sels biliaires ont un effet inhibiteur sur l'ATPDase de la rate et du foie. La fraction particulaire du foie montre une sensibilité moindre au glycocholate que la fraction particulaire de la rate. En effet, 1 mM de glycocholate cause une diminution significative de l'activité de l'enzyme de la rate alors que pour le foie on n'observe une baisse significative qu'à 2 mM. En présence du 7-déhydrocholate, seule l'activité de l'enzyme de la rate diminue et cela, de façon marquée pour une concentration de 1 mM (concentration maximale utilisée pour ce sel). Le taurodéoxycholate provoque une diminution de l'activité enzymatique à partir de 0,5 mM pour l'ATPDase de la rate de boeuf. Fait surprenant en ce qui concerne l'enzyme du foie, on observe une augmentation significative de l'activité spécifique à une concentration de 0,05 mM et une diminution de l'activité enzymatique à partir de 1 mM. En présence de taurocholate, une diminution de l'activité de la fraction particulaire de la rate est observée à partir de 1 mM alors qu'une augmentation est observée à 0,5 mM taurocholate pour l'enzyme du foie. Le cholate de sodium réduit l'activité à une concentration de 1 mM et cela, à la fois pour l'enzyme de la rate et celle du foie. Il apparaît clairement que l'enzyme du foie est moins sensible que l'enzyme de la rate aux différents sels biliaires utilisés et à leurs conjugués. Il est important de noter que le taurocholate à une concentration de 0,5 mM et le taurodéoxycholate à une concentration de 0,05 mM ont

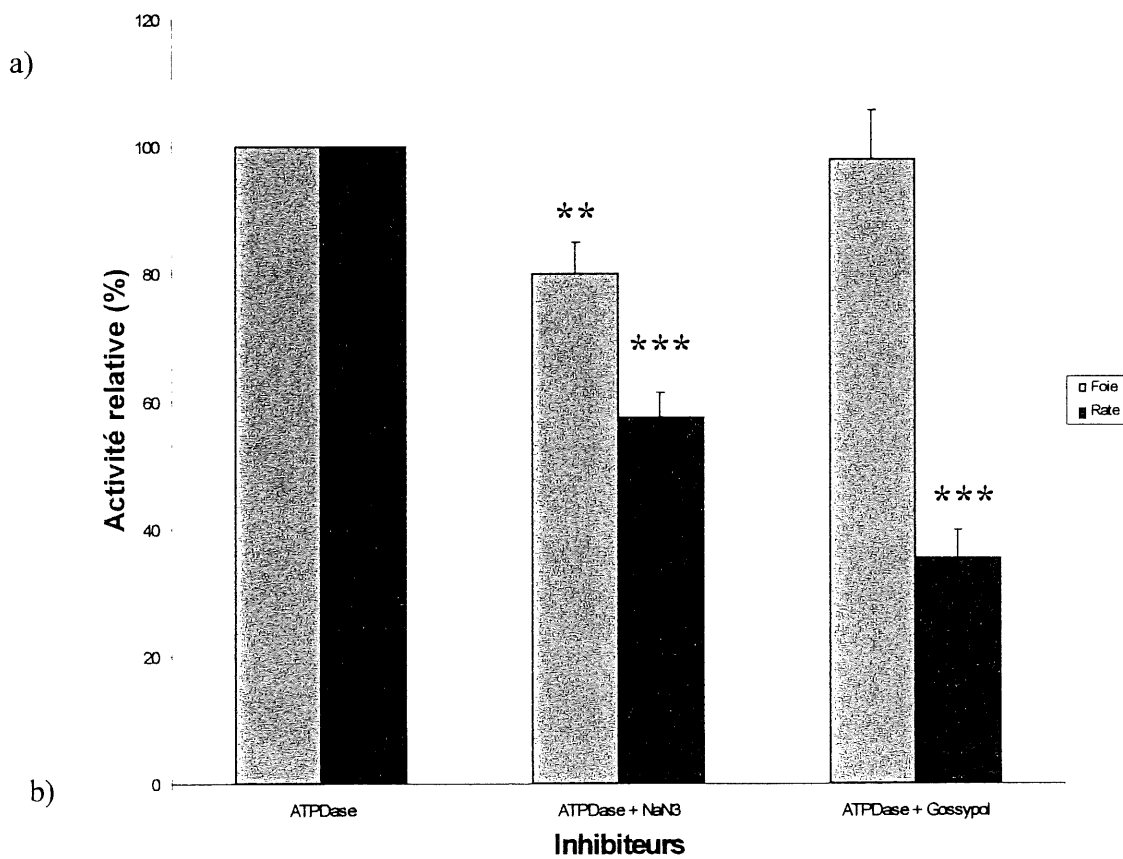
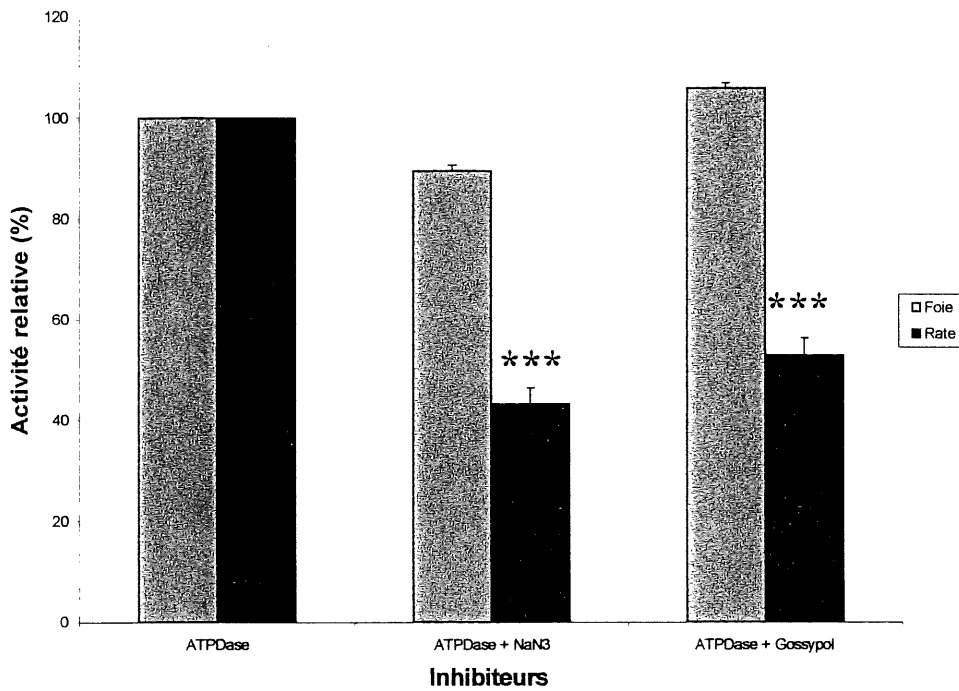


Figure 3-5. Effet du gossypol (0,035 mM) et de l'azidure de sodium (10 mM) sur l'activité de l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate, mesurée avec l'ADP (a)

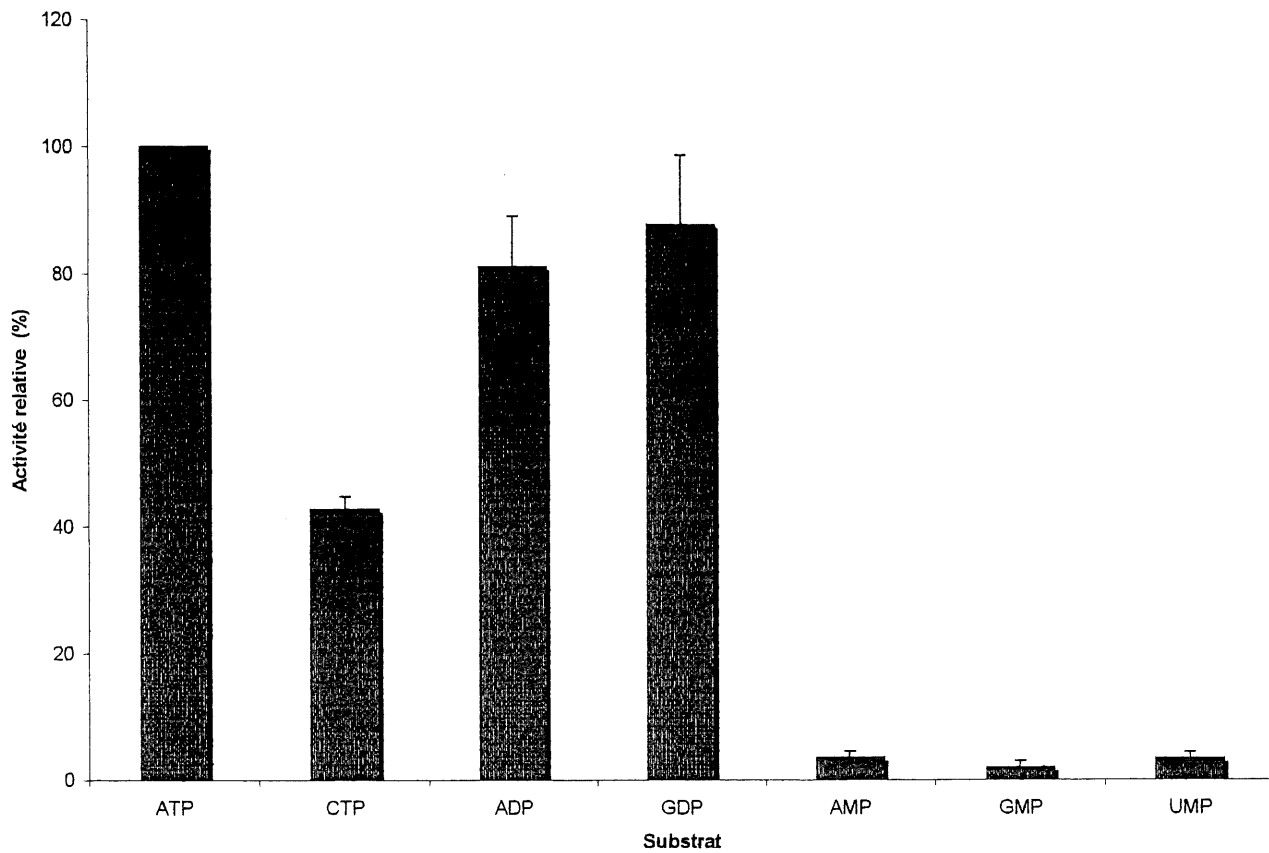


Figure 3-6. **Comparaison de l'activité de l'ATP-diphosphohydrolase hépatique en présence de divers substrats à une concentration finale de 200  $\mu\text{M}$  . Résultats de 4 expériences effectuées en triplicata.**

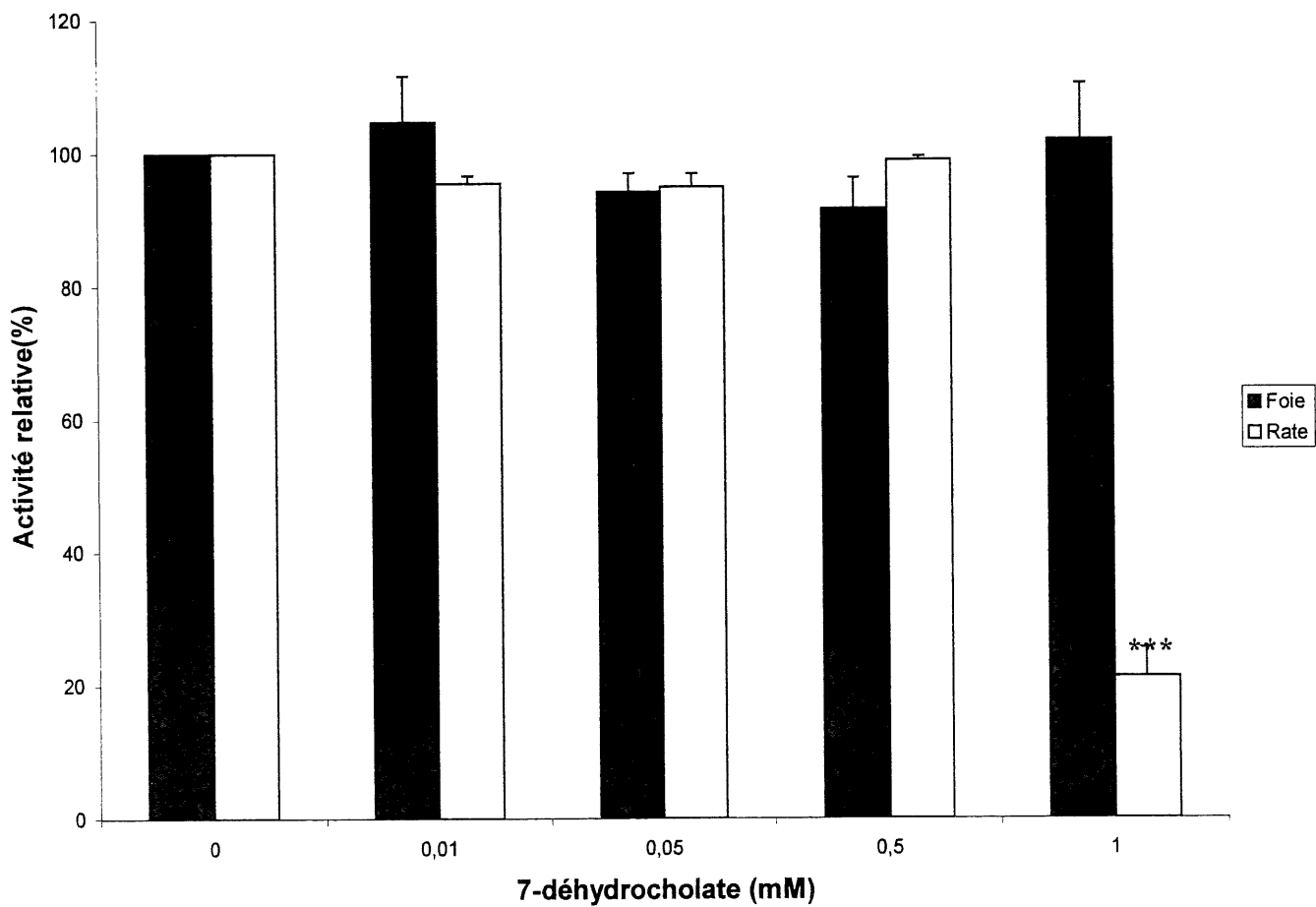


Figure 3-7. Effet du 7-déhydrocholate sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate avec ADP comme substrat. Résultats de 4 et 3 expériences distinctes pour le foie et la rate respectivement. Légende: \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$  et \*\*\* :  $p < 0,001$ .



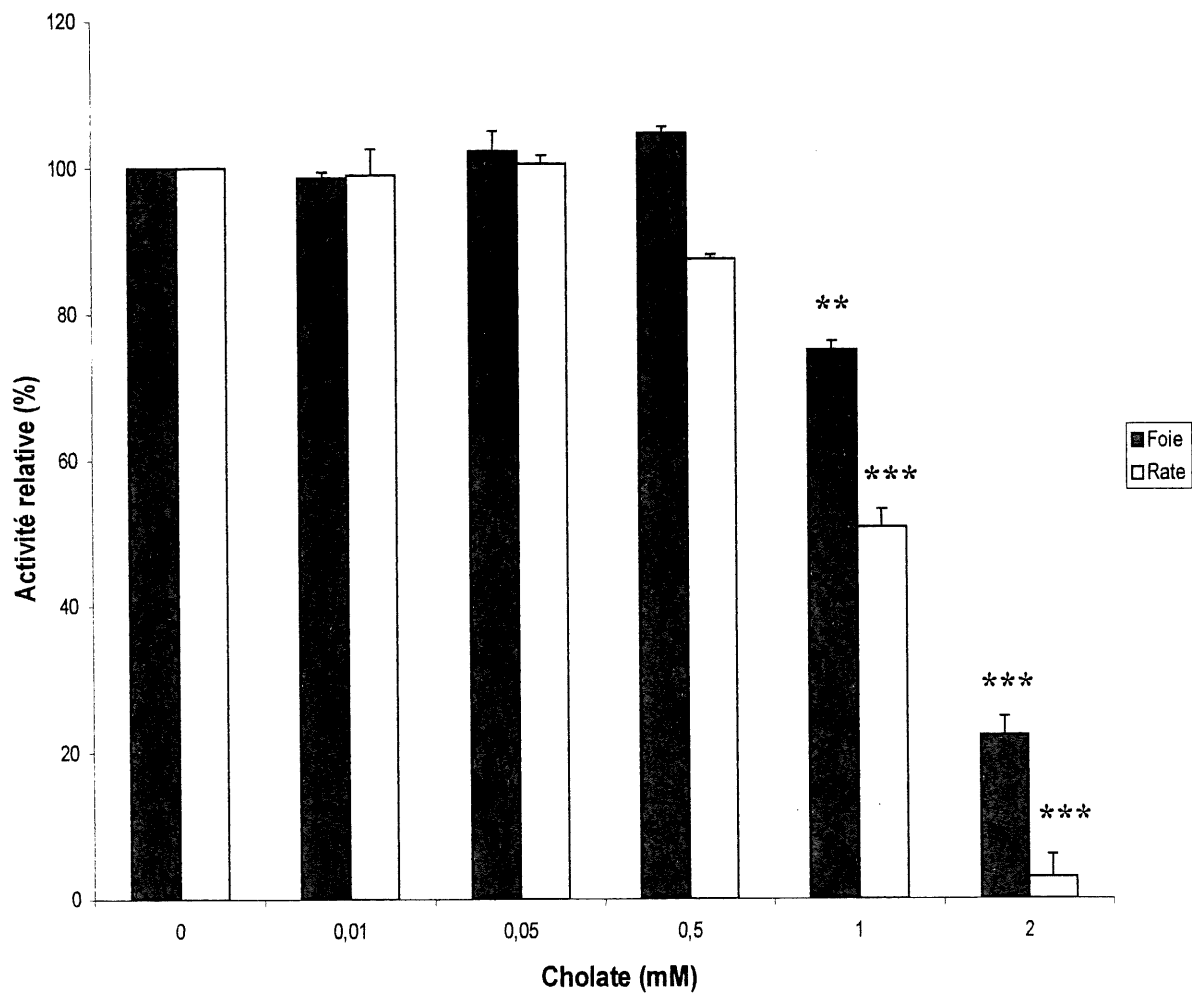


Figure 3-8. Effet du cholate sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate avec ADP comme substrat. Résultats de 3 et 2 expériences distinctes pour le foie et la rate respectivement. Légende: \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$  et \*\*\* :  $p < 0,001$ .

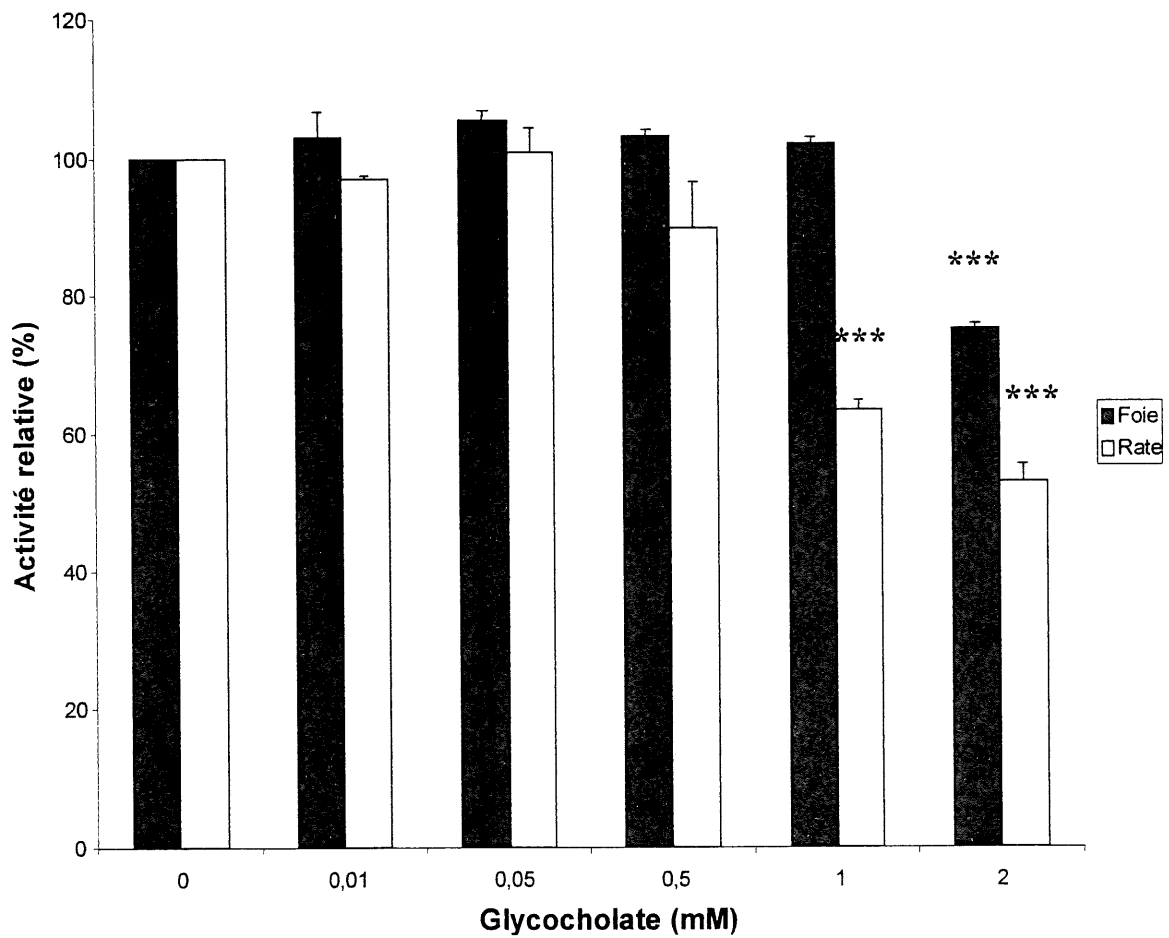


Figure 3-9. Effet du glycocholate sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate avec ADP comme substrat. Résultats de 3 et 2 expériences distinctes pour le foie et la rate respectivement. Légende: \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$  et \*\*\* :  $p < 0,001$ .

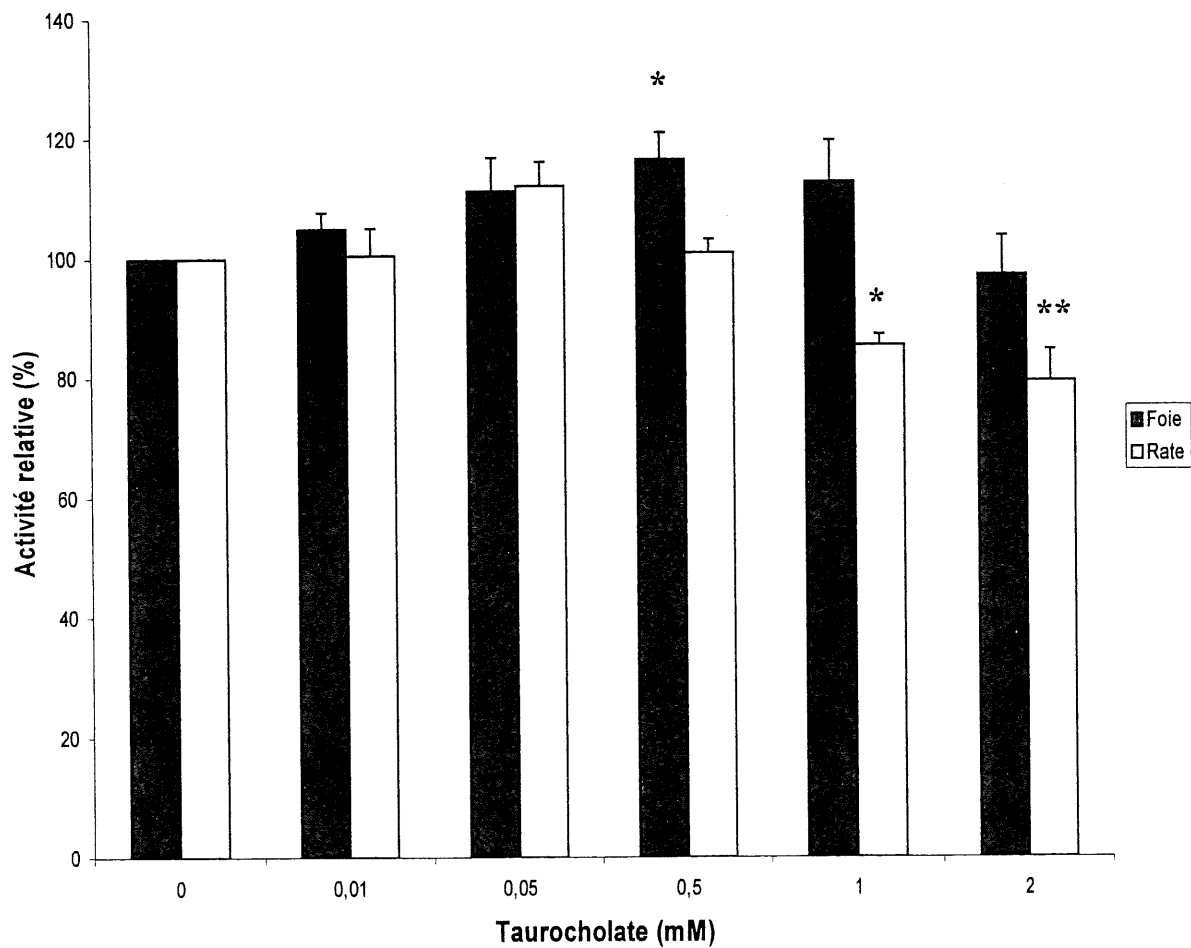


Figure 3-10. Effet du taurocholate sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate avec ADP comme substrat. Résultats 3 expériences distinctes pour le foie et la rate. Légende: \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$  et \*\*\* :  $p < 0,001$ .

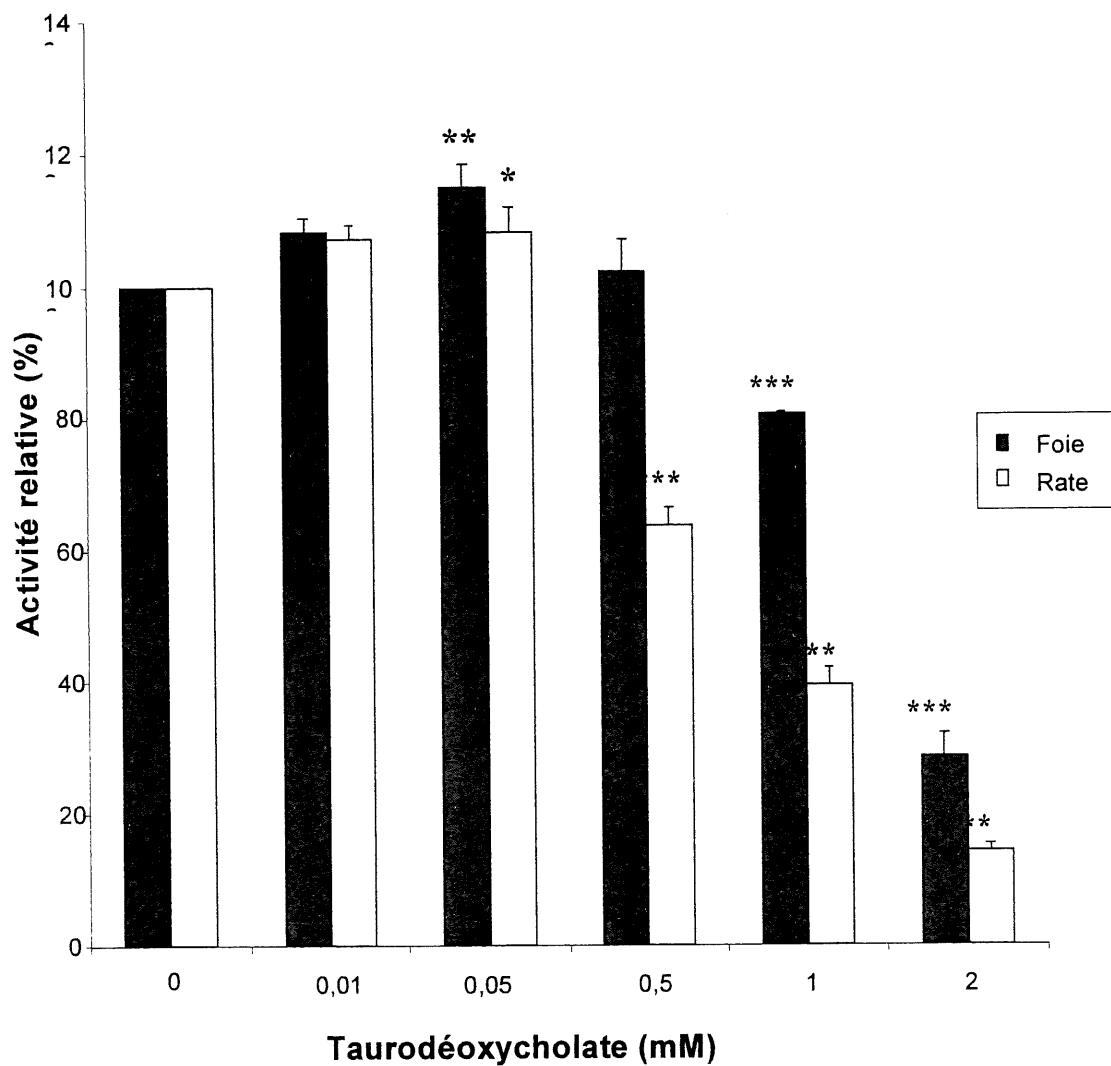


Figure 3-11. Effet du taurodéoxycholate sur l'ATP-diphosphohydrolase du foie et de la rate avec ADP comme substrat. Résultats de 3 expériences distinctes pour le foie et la rate. Légende: \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$  et \*\*\* :  $p < 0,001$ .

pour effet d'augmenter de façon significative l'activité spécifique de la fraction particulaire du foie. L'expérience a été réalisée dans des conditions sous les concentrations micellaires critiques. En effet, les concentrations micellaires critiques pour le cholate, le taurocholate et le taurodéoxycholate sont entre 13 et 15 mM, 10 et 15 mM et 2 et 6 mM respectivement (Dawson et al., 1985).

La purification de l'ATPDase, une enzyme membranaire, nécessitait qu'elle soit solubilisée avant d'être déposée sur colonne DEAE-agarose. Les résultats obtenus lors des essais permettant de vérifier la sensibilité de l'ATPDase de la fraction particulaire à un détergent non-ionique, le Triton X-100, sont d'ailleurs inattendus. La figure 3-12 démontre l'effet de différentes concentrations de Triton sur l'activité de l'enzyme. Il est à noter qu'une forte concentration de Triton (jusqu'à 15 %) a été utilisée lors des essais enzymatiques. Les résultats découlant de ces essais montrent qu'il y a une perte plus élevée de l'activité phosphohydrolase pour de faibles concentrations. En utilisant des concentrations de 0 à 2,5 % de Triton, l'activité relative au contrôle qui ne contenait pas de détergent est de moins de 30 %. Cependant, pour des concentrations de 10 %, on conserve 80 % de l'activité alors que pour une concentration de 14-15 %, l'activité demeure sensiblement à son maximum. Une même concentration de protéines a été utilisée soit 1 mg/ml pour chacun des essais d'activité.

Ensuite, nous avons poursuivi la caractérisation de l'ATPDase hépatique en procédant à la détermination des paramètres cinétiques de l'ATPDase hépatique. La fraction purifiée sur colonne DEAE a été utilisée lors des expériences pour la détermination des paramètres cinétiques. Les figures 3-13a et 3-13b illustrent les courbes ayant permis de déterminer les caractéristiques cinétiques de l'enzyme. Le  $K_m$  et le  $V_{max}$  de l'ATPDase pour l'ADP et l'ATP de l'enzyme ont été obtenus par la méthode graphique de Woolf-Augustinson-Hofstee. Une droite de pente négative et ne passant pas par l'origine est obtenue. Sur cette droite, l'ordonnée à l'origine représente  $V_{max}$  et le  $K_m$  est déterminé par l'inverse de la pente (Dixon et Webb, 1979). Le  $K_{m_{app}}$  a été estimé à 21  $\mu$ m et le

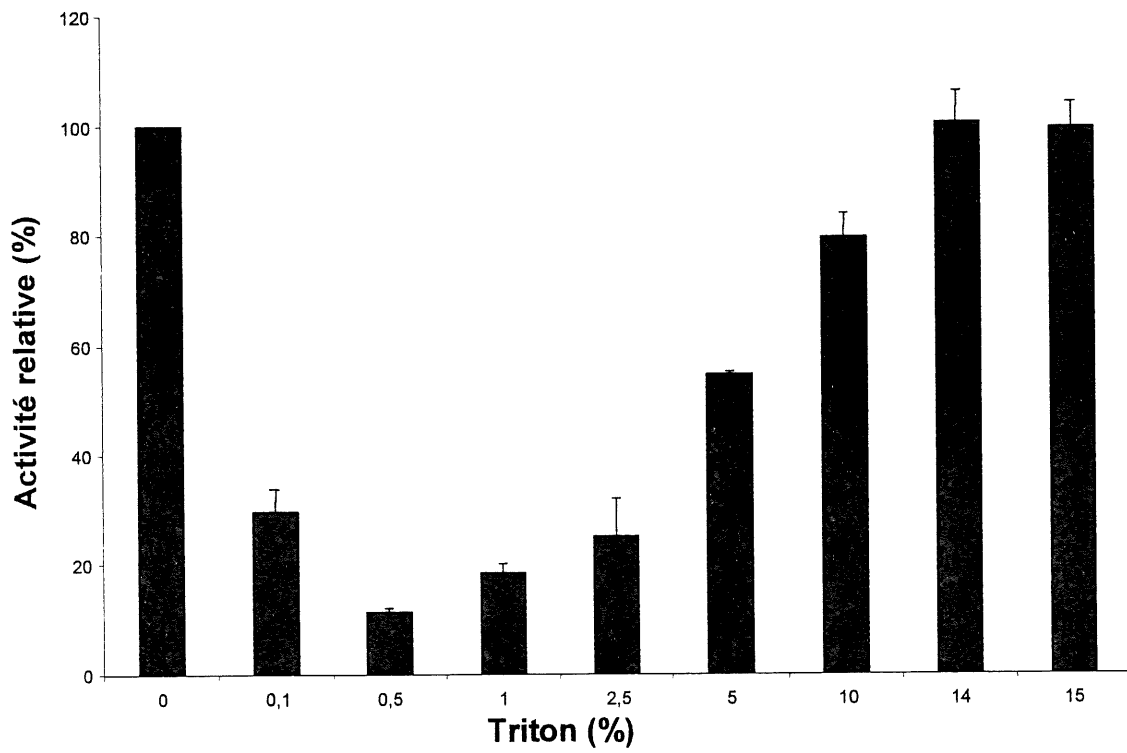


Figure 3-12. Effet d'un détergent, le Triton X-100, sur la fraction particulière du foie avec ADP comme substrat. Résultats de 3 expériences distinctes.

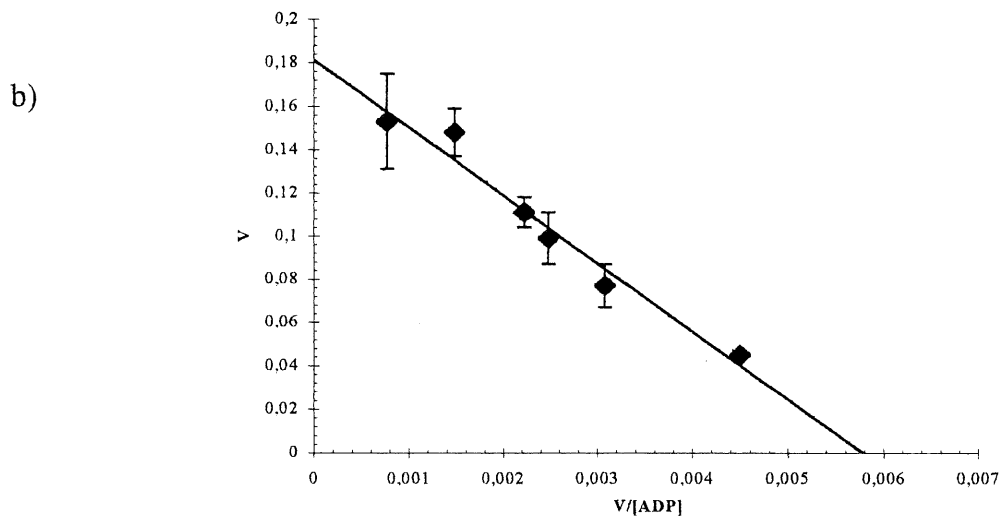
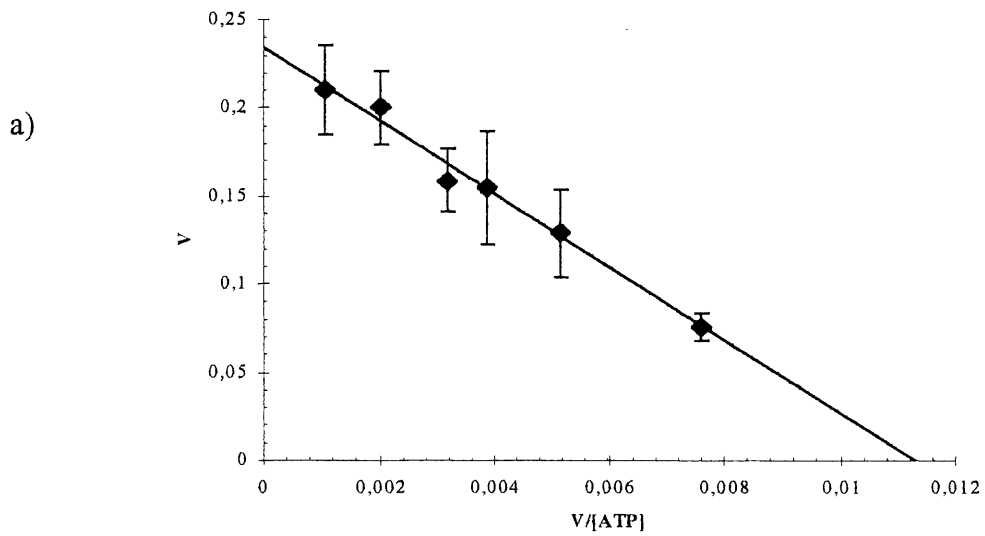


Figure 3-13. Détermination des paramètres cinétiques par la méthode graphique de **Wolf-Augustinon-Hofstee** avec comme substrats l'ATP ou l'ADP. Résultats de trois expériences distinctes.

$V_{max_{app}}$  à 0,24  $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$  avec l'ATP comme substrat. Le  $K_{m_{app}}$  pour l'ADP a été estimé à 31  $\mu\text{M}$  et le  $V_{max_{app}}$  à 0,18  $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{mg}$ .

### 3.1.3 Immunolocalisation

L'immunolocalisation a permis de montrer que l'enzyme est localisée principalement dans le domaine membranaire du canal biliaire. On observe d'ailleurs un fort signal au niveau des canalicules biliaires et du canal biliaire. Au niveau lobulaire, le signal des ATPDases est variable d'un lobule à l'autre. De plus, l'intensité des signaux varie parmi les cellules à l'intérieur d'un même lobule. Les cellules de la zone périlobulaire sont définitivement plus réactives que celles localisées dans la zone centrale et en périphérie de la zone centrolobulaire. La zone périlobulaire comprend des cellules considérées pour être les plus actives autant du point de vue métabolique que prolifératif (Sigal et al, 1992) ce qui expliquerait la forte immunoréactivité dans cette région. Tel qu'attendu, les cellules musculaires lisses sont aussi immunoréactives.

La figure 3-14a illustre la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine du parenchyme du foie de porc. Cette coloration fait ressortir la configuration lobulaire du foie avec la veine centrolobulaire et la triade hépatique comprenant une ramification de la veine porte, le canal biliaire et une artériole hépatique. La figure 3-14b démontre que les cellules parenchymales réagissent positivement à l'anticorps, avec une variation d'intensité d'un lobule à l'autre et que les cellules situées dans la zone périlobulaire étaient plus réactives. À plus fort grossissement, on peut observer une réaction très intense au niveau du canalicule biliaire et des hépatocytes avoisinants (figure 3-15a). La figure 3-15b montre une forte activité de l'endothélium vasculaire, des cellules canaliculaires et des hépatocytes. Le contrôle négatif a été effectué avec du sérum pré-immun (figure 3-15c).



Figure 3-14. **Immunocytochimie du foie.** A. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine du parenchyme du foie de porc démontre la configuration lobulaire du foie avec la veine centrolobulaire (flèche), une ramification de la veine porte (flèche courbée), le canal biliaire (flèche ondulée) et une artériole hépatique (grosse flèche) (125X). B. Immunolocalisation de l'ATPDase au niveau des cellules parenchymales. Les cellules localisées dans la zone périlobulaire (triangle isocèle) sont plus réactives que celles situées dans la zone centrolobulaire (triangle équilatéral). La triade hépatique est aussi réactive (flèches courbées) (125 X).

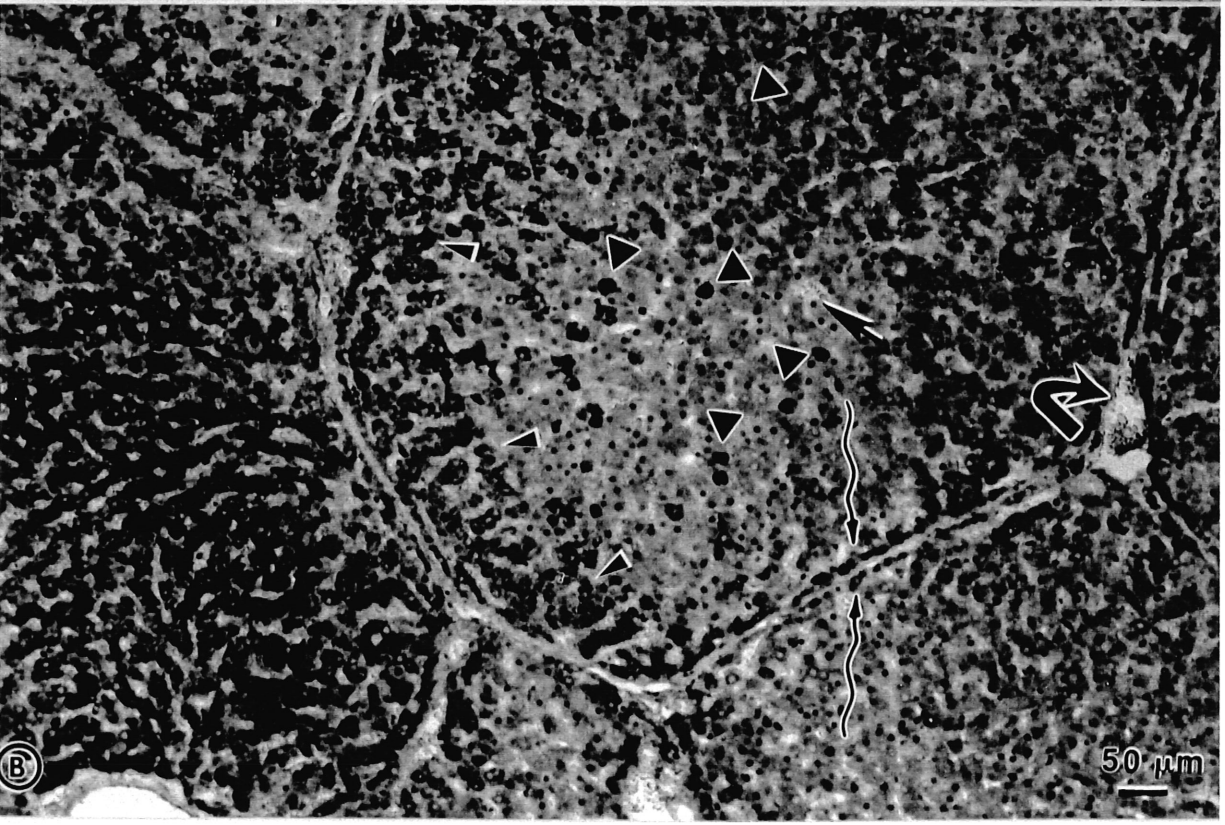
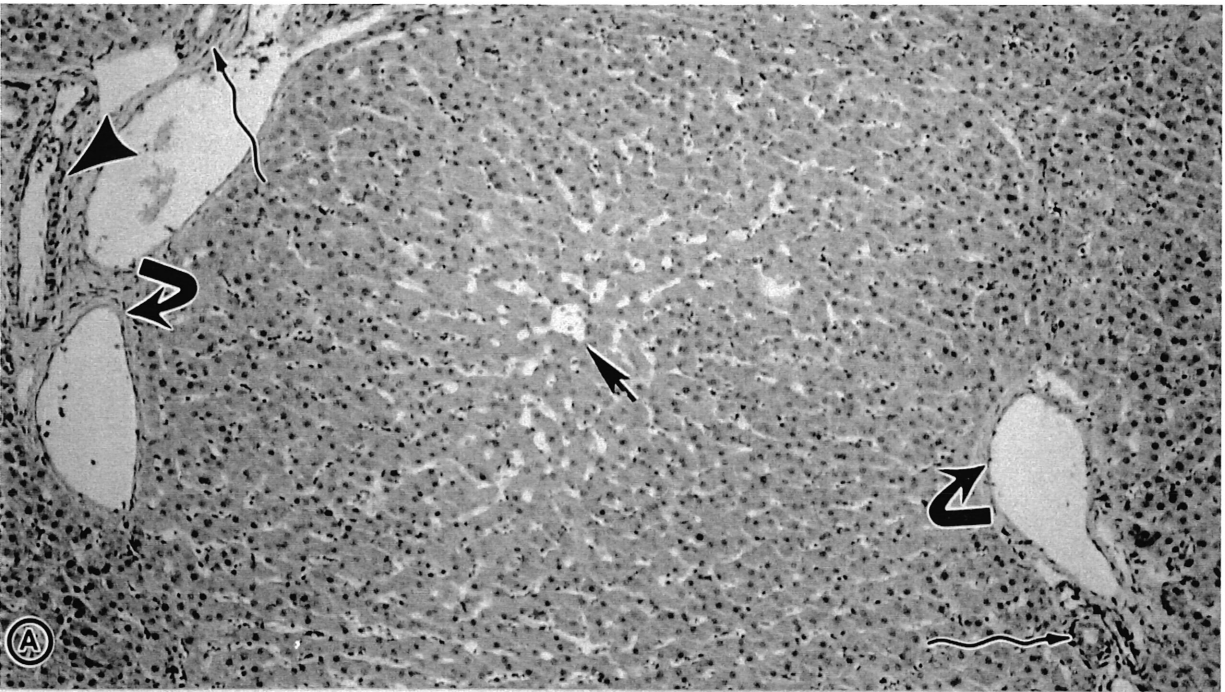
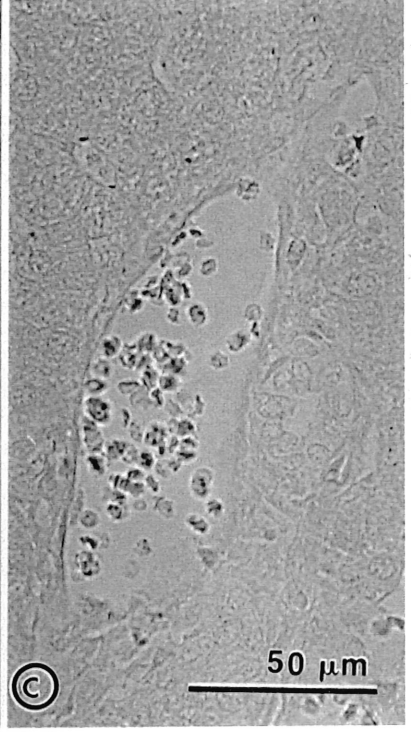


Figure 3-15. **Immunocytochimie du système canaliculaire biliaire.** A. Une coloration intense est observée au niveau des canalicules biliaires (flèche) avec un signal intense sur les hépatocytes voisins (triangle équilatéral) (200 X). B. La triade hépatique comprenant une veine dont l'endothélium démontre une forte activité. Les cellules canaliculaires (flèche) et les hépatocytes (triangle équilatéral) réagissent positivement (500 X). C. Contrôle négatif avec le sérum pré-immun. Aucune réaction n'est observée (500 X).



### 3.2 Discussion

Des travaux d'immunolocalisation réalisés par Novikoff et Essner ont montré la présence d'une ATPase dans le foie de mammifères (Novikoff et Essner, 1960). Depuis, plusieurs activités ATPasiques (Emmelot et al., 1964, 1968; Ohkubo et al., 1980; Lotersztajn et al., 1981; Ezaki et al., 1981; Lin et Fain, 1984; Mego, 1984) et ADPasiques (Wattiaux-de-Coninck et Wattiaux, 1969; Ezaki et al., 1981) ont été décrites dans la littérature. Dans les hépatocytes, l'ecto-ATPase et la 5'-nucléotidase sont principalement localisées dans le domaine canaliculaire de la membrane plasmique (Knowles, 1983). En 1980, notre laboratoire a rapporté la présence d'une ATP-diphosphohydrolase (ATPDase) dans le pancréas de porc (LeBel, 1980). Depuis, l'enzyme a été purifiée à homogénéité et localisée par immunohistochimie dans plusieurs organes et tissus (Côté et al, 1992a; Beaudoin et al., 1996). Le cDNA de cette enzyme a ensuite été cloné et séquencé. La séquence correspondant à la protéine clonée est la séquence du CD39, un marqueur cellulaire situé à la surface des lymphocytes. Puis, récemment, l'équipe de Che et collaborateurs a suggéré que l'ATPDase serait responsable de l'activité ATPase dans le foie et serait associée aux canalicules biliaires (1997).

Ces recherches nous ont alors menés vers la purification et la caractérisation d'une ATPDase au niveau du foie. Nos résultats montrent la présence d'une ATP-diphosphohydrolase hépatique possédant des caractéristiques différentes des ATPDases de mammifères déjà connues. La purification de l'enzyme par la méthode utilisée donne un enrichissement en activité ADPasique de la fraction particulière de 22 fois par rapport à l'homogénat. La fraction particulière de l'ATPDase de l'aorte montre un enrichissement de 33 fois en activité ADPasique comparativement à l'homogénat (Côté et al., 1991; Sévigny et al., 1997a). La purification sur colonne échangeuse d'anions permet d'éliminer environ 75 % des protéines sans toutefois qu'il y ait augmentation de l'activité spécifique, ce qui traduit une inactivation importante de l'enzyme. Nous avons constaté que l'enzyme n'était pas stable au cours de nos manipulations, malgré les précautions

employées : utilisation d'inhibiteurs de protéases, travail à 4 °C et rapidité de manipulations. La solubilisation de l'enzyme posait aussi un grand problème puisque de faibles concentrations de Triton X-100 ne permettaient pas de conserver une activité assez élevée pour être déposée sur colonne comparativement à l'enzyme de l'aorte où après solubilisation au Triton (0,3 %), la fraction particulaire pouvait être déposée sur colonne échangeuses d'ions (Sévigny et al., 1997). L'utilisation de concentrations élevées de Triton X-100, soit 15 % permettait de conserver une bonne activité soluble de l'ATPDase hépatique pour des purifications ultérieures. Lors de la purification sur colonne échangeuse d'anion, le Triton est éliminé avant que ne soit récoltée notre protéine d'intérêt. Il est possible qu'en utilisant une concentration élevée de Triton, un environnement hydrophobe soit créé autour des protéines, ce qui permettrait de conserver une plus grande partie de leur activité. Nous avons utilisé des techniques de purification favorisant l'activité de l'ATP-diphosphohydrolase hépatique. La purification de l'enzyme se faisait à un pH près de la neutralité, dans des tampons permettant la stabilité des protéines, en évitant les changements de conditions physiques brusques (gel-dégel), en conservant des concentrations élevées de protéines et en utilisant des inhibiteurs de protéases. Malgré les précautions prises, l'enzyme semble très sensible lorsqu'elle se trouve hors de son milieu naturel. Pour de meilleurs résultats, les futures purifications pourraient être effectuées dans des tampons au pH optimal de catalyse de l'enzyme soit 7,0 au lieu de 7,5.

Nous avons confirmé la présence de différentes isoformes de l'ATPDase hépatique par des analyses biochimiques, des enzymogrammes et par immunobuvardage. Les résultats d'immunobuvardage montrent une bande majeure correspondant à une masse moléculaire d'environ 75 000, à une hauteur légèrement inférieure à celle de l'ATPDase de type II de la rate de boeuf. Une seconde bande, située légèrement au-dessus de la bande de 54 kDa, apparaît beaucoup plus faiblement. Ce patron de migration se retrouve à la fois sur la fraction particulaire et la fraction purifiée sur colonne échangeuse d'anions. Sur les enzymogrammes, un patron de migration légèrement différent a été obtenu. On observe

les deux bandes caractéristiques du témoin positif comprenant les ATPDases de types I et II. Une bande intermédiaire est aussi observée dans la fraction particulaire et cela, en utilisant l'ATP ou l'ADP comme substrat. La fraction particulaire du foie de rat et la fraction purifiée sur colonne DEAE contiennent les deux isoformes correspondants aux types I et II de l'ATPDase.

Les ATP-diphosphohydrolases hépatiques possèdent des caractéristiques biochimiques uniques. Tout d'abord, il s'agit d'enzymes dont le pH optimal de catalyse est légèrement acide. Il est de 6,5-7,0 avec comme substrat l'ATP ou l'ADP ce qui est inférieur aux pH obtenus pour les ATPDases purifiées jusqu'à maintenant. Le pH optimal de catalyse est de 7,5 et 8,0 pour les ATPDases de type II et de type I respectivement (Sévigny, 1997). L'activité enzymatique des fractions particulières étudiées dépend de leur contexte membranaire. Ceci peut expliquer les différentes caractéristiques de l'ATPDase du foie comparativement aux ATP-diphosphohydrolases déjà purifiées, dont son efficacité de catalyse plus élevée à un pH plus acide.

Nos résultats ont aussi montré que l'ATPDase hépatique était moins sensible aux sels biliaires et à leurs conjugués que l'enzyme de la rate. Dans l'ordre du millimolaire, les sels biliaires ont un effet inhibiteur sur l'ATPDase de la rate et du foie. L'ATPDase hépatique montre une sensibilité moindre au glycocholate que la fraction particulaire de la rate. L'activité enzymatique de la fraction particulaire du foie est diminuée significativement à une concentration de 2 mM glycocholate comparativement à 1 mM pour l'enzyme de la rate. En présence du 7-déhydrocholate, seule l'activité de l'enzyme de la rate diminue et cela, de façon marquée pour une concentration de 1 mM. Le taurodéoxycholate provoque une diminution de l'activité enzymatique à partir de 0,5 mM pour l'ATPDase de la rate de boeuf. Pour le taurocholate, la diminution de l'activité de la fraction particulaire de la rate est observé à partir de 1 mM. On observe une augmentation significative de l'activité spécifique à une concentration de 0,05 mM taurodéoxycholate et à 0,5 mM taurocholate pour l'enzyme du foie. De plus, le taurodéoxycholate cause une diminution de l'activité enzymatique de l'ATPDase du foie

à partir de 1 mM. Le cholate de sodium réduit l'activité à 1 mM de l'enzyme de la rate et du foie. Ces résultats mettent en évidence une nouvelle caractéristique de l'enzyme du foie; celle-ci est moins sensible aux différents sels biliaires et conjugués utilisés que l'enzyme de la rate.

Une autre particularité de l'ATPDase hépatique est sa sensibilité moindre aux inhibiteurs des ATPases (gossypol et azidure de sodium) que l'ATPDase de la rate de boeuf. Une inhibition de l'activité de l'ATPDase de la rate en présence de 10 mM d'azidure de sodium et aussi en présence de 0,035 mM de gossypol. Ces effets ont été observés en utilisant l'ADP et l'ATP comme substrats. Pour ces mêmes concentrations d'inhibiteurs, aucun effet n'a été observé pour l'enzyme du foie pour le gossypol. En utilisant l'azidure de sodium comme inhibiteur, on observe une différence significative seulement en utilisant l'ATP comme substrat. Ces observations confirment les résultats antérieurs obtenus par Sévigny et collaborateurs (1997) et par l'équipe de Côté (1992c) (voir tableau 3-2) sur la rate et l'aorte de boeuf.

Selon Kegel et ses collaborateurs et Kaczmarek et al., seul un signal très faible est obtenu sur Northern blots, en utilisant une sonde spécifique pour l'ATPDase (ribosonde antisense CD39) alors qu'un niveau d'activité élevé est mesuré dans le foie. Ces résultats et les résultats obtenus par Kegel et collaborateurs (1997) et Kaczmarek et al. (1996) permettent de supposer qu'il existerait des différences structurales entre l'ATPDase hépatique et celles déjà purifiées chez les mammifères. Les caractéristiques différentes peuvent être associées à une structure primaire spécifique ou à de modifications cellulaires différentes lors de la maturation (glycosylation, phosphorylation ou acylation). Un environnement lipidique différent peut aussi jouer dans la spécificité de l'enzyme. Le contexte membranaire de l'enzyme joue un rôle prépondérant dans la détermination de ses caractéristiques. Ceci pourrait aussi expliquer qu'elle soit moins sensible aux sels biliaires que l'ATPDase de la rate.



Les paramètres cinétiques ont été calculés à partir des courbes tracées par la méthode de Woolf-Augustinson-Hofstee. Le  $K_{m_{app}}$  de l'enzyme est de 21  $\mu\text{M}$  pour l'ATP et de 31  $\mu\text{M}$  pour l'ADP. Les  $V_{max}$  calculées sont de 0,24 et 0,18  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  pour l'ATP et l'ADP respectivement. En se référant au tableau 1-3, nous pouvons observer que l'enzyme possède une affinité pour l'ADP et l'ATP comparable aux différents tissus ou organes représentés. La vitesse maximale de l'enzyme du foie est inférieure aux  $V_{max}$  retrouvées dans la littérature. La  $V_{max}$  pour l'aorte est de 1,09  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  (Côté et al., 1992c), celle du poumon est de 1,1  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  (Picher et al., 1992) et celle de la trachée est de 1,9  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  (Picher et al., 1994). Le degré de pureté de la fraction utilisée aurait pu affecter les paramètres cinétiques mesurés et expliquerait que  $V_{max}$  serait moins élevée que pour les autres fractions. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sont nécessaires pour l'activité de l'enzyme. L'ATPDase de l'aorte (Côté et al., 1992c), du poumon (Picher et al., 1992) et de la trachée (Picher et al., 1994) requièrent aussi la présence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  pour qu'il y ait réaction enzymatique.

Les résultats ont montré que l'ATP-diphosphohydrolase de foie avait une activité catalytique plus élevée pour les triphosphonucléotides que pour les diphosphonucléotides, alors que l'activité pour les nucléotides monophosphates demeure très faible. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par Côté et collaborateurs pour l'ATPDase de l'aorte (1992c). L'activité d'hydrolyse des nucléotides monophosphates peut être due à la présence de la 5'-nucléotidase dans la fraction partiellement purifiée utilisée pour les dosages.

La présence des récepteurs  $P_2$  ( $P_{2u}$  et  $P_{2y}$ ) et  $P_1$  ( $A_2$ ) au niveau du foie a permis d'identifier leurs rôles au niveau de la glycogénolyse (Keppens et De Wulf, 1986; Keppens, 1993), de la contraction canaliculaire (Nathanson 1991; Che et al., 1992, 1997), de la perméabilité cellulaire des jonctions serrées (Nathanson, 1991, 1992), de la sécrétion biliaire (Nathanson, 1991), de la genèse de l'urée (Guinzberg et al., 1987), de la néoglucogénèse (Koike et al., 1992), de l'accroissement du niveau de phosphatidates (Bocckino et al., 1987; Keppens, 1993) et de la contraction/relaxation des vaisseaux

sanguins irriguant le foie (Haüssinger et al., 1988; Mathie et al., 1991). L'identification des récepteurs purinergiques dans le foie laissait présager la présence d'une ATPDase au niveau hépatique. Les travaux d'immunolocalisation ont permis de confirmer la présence de l'enzyme au niveau hépatique.

Tel que décrit dans le chapitre 1, l'ATP diphosphohydrolase a été localisée dans plusieurs organes et tissus. On la retrouve notamment au niveau des cellules des muscles lisses des différents systèmes physiologiques et tel qu'attendu, l'enzyme est aussi présente dans les muscles lisses et dans l'épithélium des vaisseaux irriguant le foie. Elle contribuerait au contrôle des nucléotides impliqués dans la contraction des muscles lisses irrigant le foie. On retrouve aussi l'enzyme en bordure des canalicules biliaires et au niveau des différents hépatocytes. Un rôle dans le contrôle de la sécrétion biliaire, dont l'un des modes de transport dépend de l'ATP, pourrait alors lui être attribué puisque la présence de l'ATPDase à ces endroits stratégiques permettrait le contrôles des nucléotides. Selon Sigal (1992), l'activité décroît de la périphérie vers le centre. On a pu constater qu'au niveau lobulaire, le signal des ATPDases est variable d'un lobule à l'autre et que l'intensité des signaux variaient parmi les cellules à l'intérieur d'un même lobule, les cellules de la zone périlobulaire étant plus réactives que celles localisées dans la zone centrale et en périphérie de la zone centrolobulaire. L'ATP-diphosphohydrolase est localisée dans la zone péri-lobulaire dite d'activité permanente, là où le transport biliaire est effectué de façon prédominante (Coujard et al., 1980; Sigal, 1992). Une fois de plus, ces résultats montrent l'implication possible de l'ATPDase dans le contrôle des nucléotides agissant au niveau des différents systèmes métaboliques du foie.

## CHAPITRE 4

### CONCLUSION GÉNÉRALE

De nombreuses études sur les cellule hépatiques et différentes fractions cellulaires du foie ont montré la présence d'activités ATPasique et ADPasique élevées associées à la membrane plasmique (Novikoff et Essner, 1960; Emmelot et al., 1964, 1968; Wattiaux-de-Coninck et Wattiaux, 1969; Ohkubo et al., 1980; Lotersztajn et al., 1981; Ezaki et al., 1981; Lin et Fain, 1984; Mego, 1984). Dans une revue récente, Che et ses collaborateurs (1997) ont suggéré la présence d'une apyrase dans le système canaliculaire biliaire.

Dans le cadre de cette maîtrise, nous avons montré la présence d'une ATP-diphosphohydrolase au niveau du foie et que celle-ci possédait des propriétés biochimiques uniques. De plus, l'immunolocalisation de l'ATPDase au niveau du foie a été effectuée.

Les analyses biochimiques, les expériences d'immunobuvardage et les enzymogrammes ont confirmé la présence d'une apyrase ou ATPDase au niveau du foie. En comparaison avec les différentes ATPDases déjà caractérisées, l'ATPDase hépatique démontre des caractéristiques biochimiques différentes. Premièrement, son pH optimal de catalyse est légèrement inférieur aux ATPDases de mammifères déjà purifiées. Son pH optimal de catalyse est de 6,5-7,0 avec comme substrat l'ATP ou l'ADP, alors qu'il est de 7,5 et 8,0 pour les ATPDases de type II et de type I respectivement. Deuxièmement, cette enzyme a la particularité d'être insensible au gossypol et d'avoir une sensibilité moindre à l'azidure de sodium que les autres types d'ATPDases. L'effet des sels biliaires (cholate, 7-déhydrocholate, glycocholate, taurocholate et taurodéoxycholate) sur l'ATP-diphosphohydrolase hépatique démontre aussi une particularité nouvelle de l'enzyme comparativement à celle de la rate. Ainsi, l'ATPDase du foie démontre une sensibilité

moindre aux sels biliaries. Et étonnamment, des concentrations de 0,05 mM de taurodéoxycholate et 0,5 mM de taurocholate augmentent de façon significative l'activité de l'enzyme. Le patron de migration obtenu par immunobuvardage montre que l'ATPDase du foie est différente de celle contenue dans la rate. Une bande majoritaire est observée à une hauteur de 75 kDa, ce qui est légèrement inférieur à l'ATPDase de type II. On observe aussi une bande plus faible, autour de 54 kDa, correspondant possiblement au type I de l'ATPDase.

La caractérisation de l'enzyme s'est poursuivie par la détermination des paramètres cinétiques, les besoins de l'enzyme en ions calcium et magnésium et la spécificité de l'ATPDase hépatique pour différents substrats. Le  $K_{m_{app}}$  de l'enzyme est de 21  $\mu$ M pour l'ATP et de 31  $\mu$ M pour l'ADP. Les  $V_{max}$  calculés sont de 0,24 et 0,18  $\mu$ mol/min/mg pour l'ATP et l'ADP respectivement. De cette étude, nous avons pu conclure que les ions  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  sont nécessaires pour l'activité de l'enzyme. L'enzyme hydrolyse les triphosphonucléosides et les diphosphonucléosides de façon préférentielle. La faible quantité de phosphate mesuré lors de l'hydrolyse des nucléotides monophosphates est effectuée par la 5'-nucléotidase. De plus, une étude sur l'influence du Triton X-100 sur l'activité de l'enzyme a permis d'observer que l'enzyme résistait à de grandes concentrations de Triton (jusqu'à 15 %).

Par l'immunolocalisation, on a pu démontrer que l'enzyme était principalement présente dans le domaine membranaire du canal biliaire, au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux irriguant le foie, en bordure de l'épithélium vasculaire et au niveau des différents hépatocytes. Ainsi, elle contribuerait au contrôle des nucléotides extracellulaires impliqués dans la contraction des muscles lisses irrigant le foie, dans la sécrétion biliaire et au niveau des différents systèmes métaboliques du foie (glycogénolyse, génèse de l'urée). Le signal des ATPDases est variable d'un lobule à l'autre et l'intensité des signaux varie aussi parmi les cellules à l'intérieur d'un même lobule. Les cellules de la zone périlobulaire sont plus réactives que celles localisées dans

la zone centrale et en périphérie de la zone centrolobulaire. L'ATP-diphosphohydrolase est localisée dans la zone péri-lobulaire dite d'activité permanente, là où le transport biliaire est effectué de façon prédominante (Coujard et al., 1980; Sigal, 1992). Ces résultats montrent l'implication possible de l'ATPDase dans le contrôle des nucléotides agissant au niveau des différents systèmes métaboliques du foie via les récepteurs purinergiques.

En conclusion, les analyses biochimiques ont permis de démontrer la présence de l'ATP-diphosphohydrolase au niveau hépatique et que celle-ci possédait des caractéristiques nouvelles. De plus, étant donné la présence de récepteurs  $P_2$  ( $P_{2u}$  et  $P_{2y}$ ) et  $P_1$  ( $A_2$ ) au niveau du foie, cela suggère que l'enzyme serait impliquée dans les trois grands systèmes contrôlés par les nucléotides soit le transport biliaire dépendant de l'ATP, la contraction et relaxation des vaisseaux sanguins irriguant le foie ainsi que la glycogénolyse. La localisation de l'ATP-diphosphohydrolase a permis de montrer que l'ATPDase était présente au niveau de ces grands systèmes métaboliques et cela supporte l'idée selon laquelle cette ectonucléotidase serait un modulateur prédominant de l'action des nucléotides extracellulaires. Cette étude sur l'ATPDase hépatique ouvre la voie au clonage de son gène. L'étude des variations de l'enzyme dans les différents systèmes métaboliques du foie permettrait d'étudier les différentes pathologies associées aux différentes fonctions du foie (sécrétion biliaire, glycogénolyse, genèse de l'urée). De plus, les recherches sur l'ATPDase hépatique constitue un pas important pour la connaissance d'un des paramètres qui affectent la composition et le niveau de sécrétion biliaire dans les conditions normales ou pathophysiologiques.

**ANNEXE I**

**CARACTÉRISATION DU PEPTIDES S**

## INTRODUCTION

Dans le cadre d'études sur les ectonucléotidases de mammifères, plusieurs enzymes ont été mises en évidence au niveau des vaisseaux sanguins. Des travaux préliminaires effectués par Daoud (1997) ont démontré la présence d'une protéine soluble ayant une activité nucléotide phosphatase et ayant aussi la particularité d'être résistante à la chaleur (70 °C). Étant donné que les enzymes sont généralement très sensibles à la chaleur, la purification de cette protéine dotée d'une activité ADPasique, appelée peptide S, est devenue d'un grand intérêt.

La protéine a été purifiée et le séquençage du peptide S a été effectué, ce qui nous a permis de déterminer le poids moléculaire de la protéine qui se situe aux alentours de 14 500 daltons (Daoud, 1997). De plus, nous avons pu démontrer qu'il s'agissait, en fait, d'un peptide dérivé d'une protéine connue, la calponine (calmodulin-actin-and-tropomyosin-binding protein), une protéine associée aux filaments fins des muscles lisses. Il s'agit d'une protéine importante impliquée dans le mécanisme secondaire dépendant du calcium de régulation de la contraction de muscles lisses (Walsh, 1991 et Winder, 1991). Le peptide S possède une séquence homologue de 93 % avec la calponine (Daoud, 1996). Cette protéine a la propriété d'inhiber l'activité de la magnésium ATPase (Makuch et al. 1991; Walsh, 1991 et Winder, 1991). L'activité inhibitrice de la calponine dépend de son état de phosphorylation. C'est dans son état non phosphorylé que la calponine lierait l'actine et inhiberait la  $Mg^{2+}$ -ATPase de la myosine (Winder, 1990). La figure 1-1 illustre le rôle attribué à la calponine dans la régulation de l'interaction actine-myosine au niveau du muscle lisse.

Relaxation

Contraction

État intermédiaire [ $\text{Ca}^{2+}$ ]

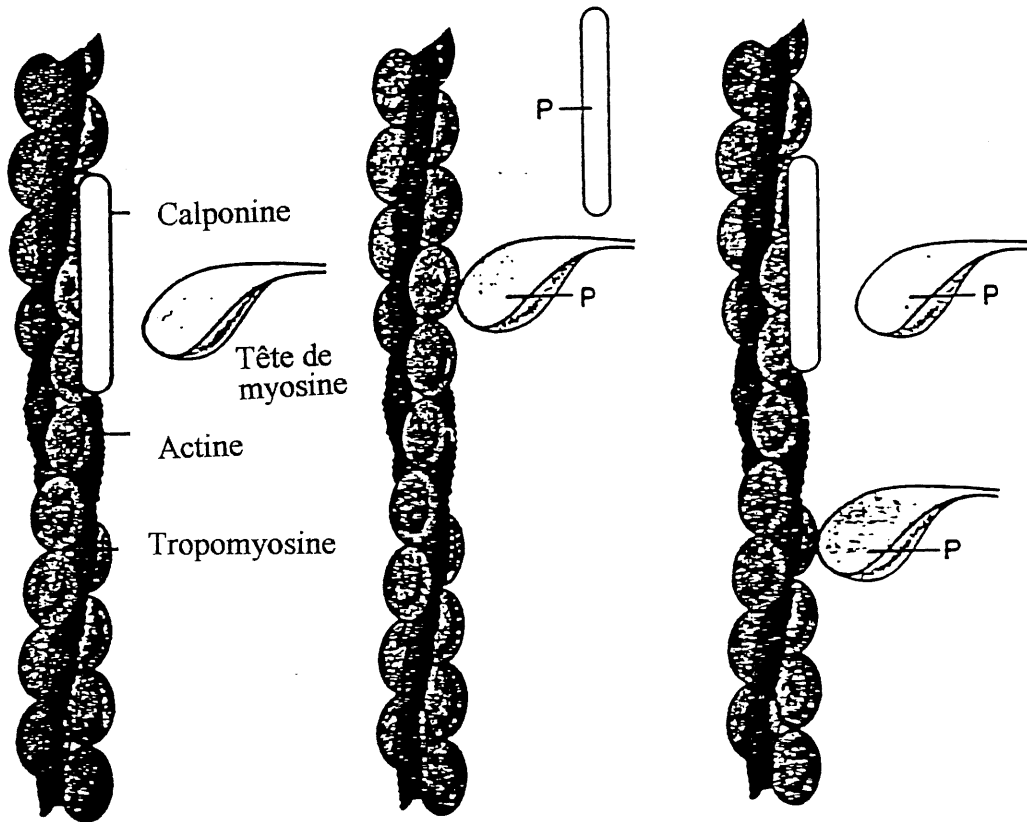


Figure 1-1. Modèle illustrant le rôle possible de la calponine dans la régulation de l'interaction actine-myosine au niveau des muscles lisses (Walsh, 1991).



Le fragment purifié de la calponine semble démontrer des propriétés catalytiques inhabituelles, c'est-à-dire qu'il démontre une activité phosphatase non spécifique et que la réaction ne semble pas se compléter.

Les cellules musculaires lisses de l'aorte peuvent être stimulées à se dédifférencier, notamment suite à un bris cellulaire, et à perdre leurs propriétés contractiles. Il y a alors prolifération de ces cellules. Cela peut conduire à la formation des plaques athérosclérotiques. La calponine peut servir de marqueur de la différenciation cellulaire dans les muscles lisses (Gimono, 1990; Maguchi et al., 1995), puisqu'il existe quatre isoformes différentes de l'enzyme et qu'elles ne sont pas toutes présentes au même stade de différenciation cellulaire ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et  $\iota$ ). Son expression est dépendante de l'état de différenciation des cellules musculaires lisses (Maguchi et al., 1995). Il serait intéressant de connaître ce qui arrive à ce fragment lors du développement d'une maladie telle l'athérosclérose ou lors de la (dé)différenciation cellulaire. L'étude du peptide S serait donc d'un grand intérêt au niveau médical.

Le peptide S semble accroché à un polyphosphate. La présence d'un polyphosphate lié à un fragment d'une protéine impliquée dans la contraction musculaire (calponine) pourrait servir de réservoir d'énergie dans la contraction musculaire lisse. Le phosphate servirait à former de l'ATP pour une meilleure réponse lors de la contraction des muscles lisses (Kornberg, 1995).

## **HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**

### **Prémisses**

Le peptide S, purifié dans notre laboratoire, a été identifié comme un fragment de la calponine, une protéine impliquée dans la contraction musculaire lisse (Daoud, 1996). Ce fragment de la calponine semble démontrer des propriétés catalytiques inhabituelles. La réaction est rapide (en deçà de 10 secondes), comporte une hydrolyse spontanée et ne semble pas se compléter. De plus, il semblerait qu'un polyphosphate soit étroitement lié à ce peptide.

### **Hypothèse de travail et objectifs**

Les observations énoncées ci-dessus, nous ont menés à formuler l'hypothèse que le peptide S serait responsable d'une activité nucléotidase soluble et qu'il serait étroitement lié à un polyphosphate. En premier lieu, nous voulions effectuer la séparation du peptide S et du polypyphosphate pour ensuite procéder à la caractérisation du peptide S.

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 1. Matériel

Se référer à la partie 2.1 du chapitre 2 de ce présent mémoire pour le matériel utilisé dans le cadre de cette partie expérimentale. Les vaisseaux utilisés (*veina cava*) proviennent de l'abattoir Giroux, à Bromptomville, Québec

## 2. Méthodes

### 2.1 Extraction du peptide S

Dès le sacrifice de l'animal, les vaisseaux sanguins (*veina cava*) étaient isolés et mis sur glace pour le transport jusqu'au laboratoire. Les vaisseaux sanguins étaient ensuite émincés en fins morceaux et passés au Polytron dans un tampon Tris-Base en présence des inhibiteurs de protéases (PMSF et SBTI), à un pH de 7,5. L'homogénat ainsi obtenu a été filtré sur trois épaisseurs de coton-fromage. Puis l'homogénat a été passé trois fois au Potter Elvehjem et centrifugé pendant 15 min., à 600 g, à 4 °C en utilisant le rotor JA-14. Cette première centrifugation permettait d'éliminer les gros débris cellulaires. Le surnageant était ensuite soumis à une nouvelle centrifugation, mais cette fois-ci, à une force de 28 000 g, durant 90 min., à 4 °C, toujours avec le rotor JA-14. Le surnageant était conservé et chauffé à 70 °C durant 15 min. Ensuite, une nouvelle centrifugation a été effectuée afin d'éliminer les protéines dénaturées. Une dernière étape a été effectuée pour concentrer l'échantillon. Il s'agit d'une centrifugation sur membrane sélective avec des Centripreps de Amicon. Les tubes ont été soumis à une force de 3000g (3500 RPM) pendant 30 min., à 4 °C. Cette opération était répétée deux fois pour une durée de 15

min. et était suivie d'une centrifugation de 5 min. pour récupérer le maximum de protéines dans le surnageant.

## **2.2 Séparation du phosphate du peptide S à l'aide d'une colonne chromatographique G-25**

Les fractions obtenues après centrifugation à l'aide des membranes sélectives étaient lyophilisées et resuspendues dans un minimum d'eau nanopure avant d'être déposées sur colonne. Le phosphate inorganique a été séparé du peptide S à partir d'une colonne chromatographique G-25. La colonne était équilibrée avec le tampon d'élution (50 mM histidine, 50 mM Hepes et 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, à pH 8,0). Des fractions de 0,5 ml ont été recueillies de la colonne par un collecteur de fraction LKB Bromma 2111 Multirac. Les fractions contenant du phosphate ont été identifiées par la méthode au vert de malachite en utilisant un échantillon avec seulement du tampon de dosage comme contrôle. Ensuite, les protéines de chaque fraction et l'activité phosphohydrolase des fractions contenant du phosphate ont été mesurées selon les méthodes décrites à la section 2.2.1 du chapitre 2 en utilisant un tampon de dosage différent: 50 mM histidine, 50 mM Hepes et 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, à pH 8,0.

## **2.3 Effet de la phosphatase alcaline sur le polyphosphate détaché du peptide S**

Au tampon contenant le polyphosphate séparé de la protéine, on ajoutait 20 µl de phosphatase alcaline (0,028 unités). Le dosage du phosphate était effectué, à des temps différents, par la méthode au vert de malachite telle que décrite à la section 2.2.1 du chapitre 2, mais en utilisant le tampon de dosage décrit à la section précédente.

## RÉSULTATS

Lors de la purification de cette protéine, une grande quantité de phosphate empêchait de bien évaluer l'activité phosphohydrolase de la protéine. Plusieurs méthodes ont été utilisées afin de séparer le phosphate de la protéine. Une colonne de Séphadex G-25 a permis de séparer la protéine du phosphate (que l'on soupçonne être un polyphosphate) (se référer à la figure 1-2).

Le peptide dépourvu de tout phosphate ne démontre pas d'activité phosphohydrolase. L'activité du peptide S a été dosée et la protéine ne contient pas d'activité nucléotidase. Nous avons mesuré l'activité de la calponine purifiée. Celle-ci a été gracieusement fournie par le laboratoire du docteur Michael P. Walsh, Calgary. Les résultats de notre expérience démontrent que la calponine ne possède pas d'activité ATPasique ou ADPasique.

La figure 1-3 nous montre l'effet de la phosphatase alcaline sur le polyphosphate. On observe qu'un maximum d'hydrolyse est atteint après 10 minutes d'incubation avec la phosphatase alcaline. L'hydrolyse du polyphosphate semble incomplète. Il devient impossible, dans ces conditions, de déterminer la longueur de ce polyphosphate.

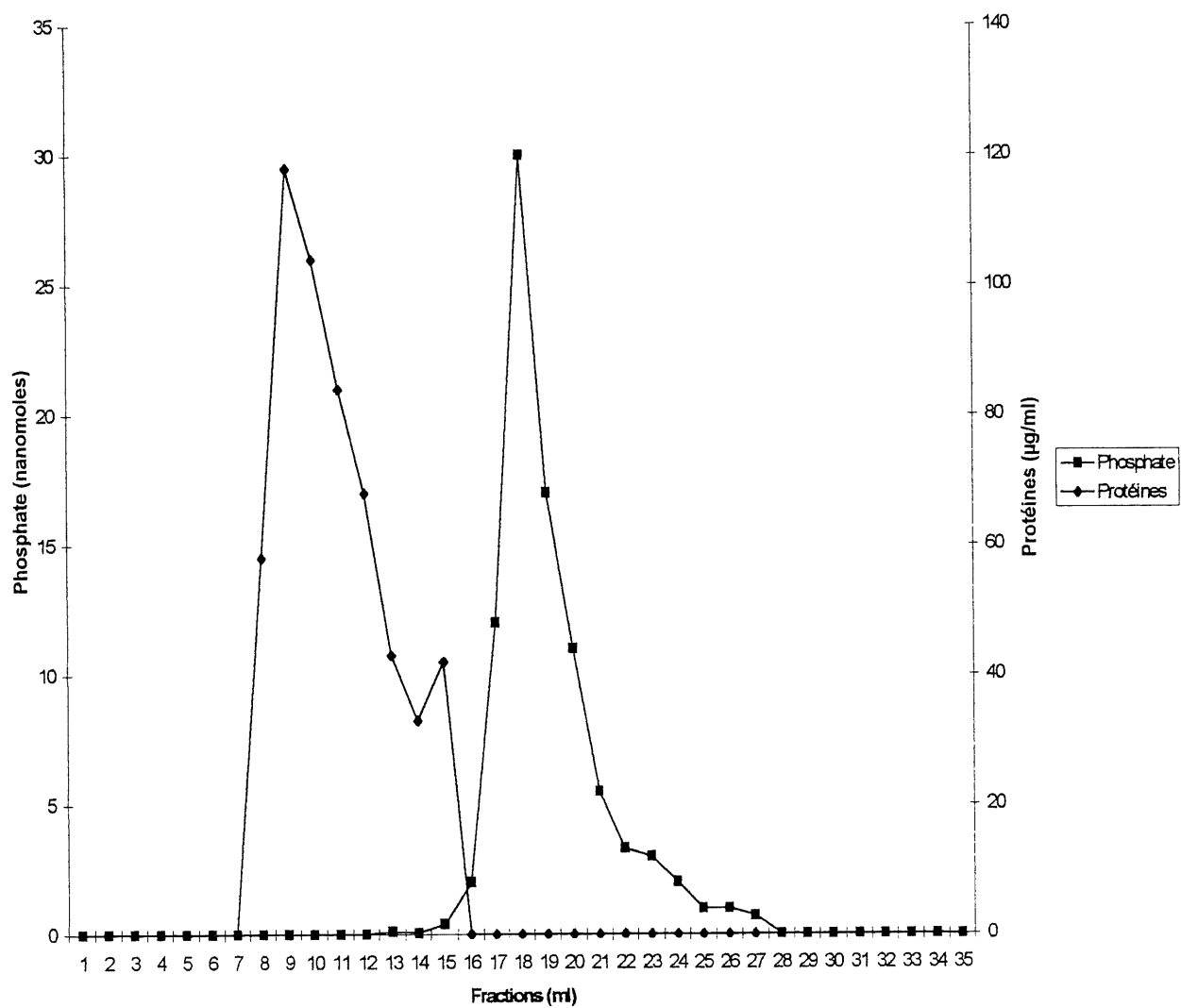


Figure 1-2. Séparation du polyphosphate lié au peptide S à l'aide d'une G-50. Résultat de 4 expériences distinctes.

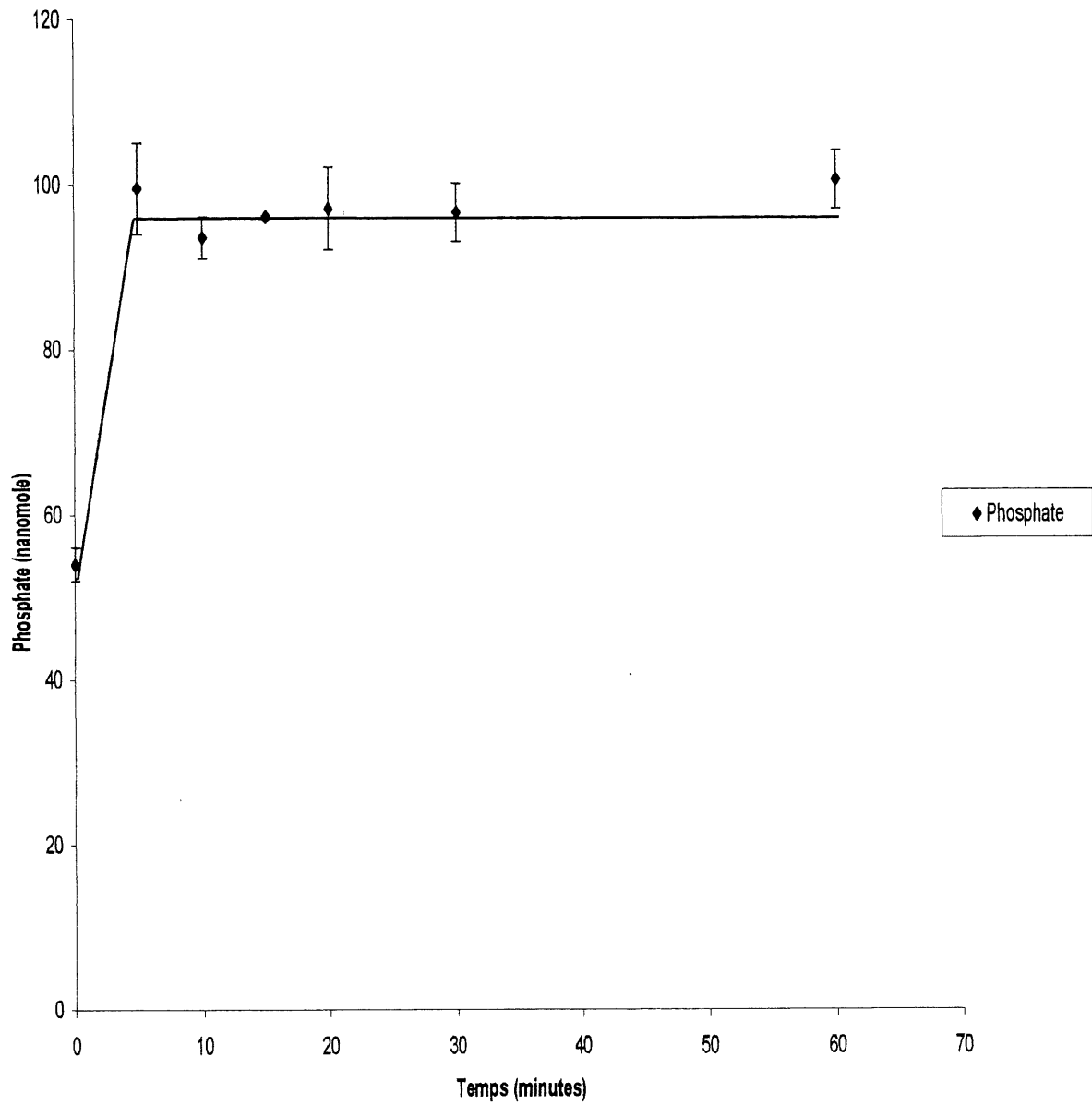


Figure 1-3. **Effet de la phosphatase alcaline sur le peptide S, accumulation du produit avec le temps.** Moyenne de 4 expériences distinctes effectuées en triplicata.

## CONCLUSION

Dans le cadre de la purification de nouvelles nucléotidases, nous avons mis en évidence une protéine soluble démontrant des propriétés catalytiques phosphatases inhabituelles. La protéine semblait étroitement liée à un polyphosphate. Une fois le polyphosphate séparé du fragment de la calponine, celui-ci ne démontre plus d'activité phosphatase. Le peptide S n'est donc pas une nucléotidase. Il a été possible de doser la calponine entière et les résultats ont démontré que la calponine ne possédait pas d'activité phosphohydrolase. Des expériences d'hydrolyse du phosphate à l'aide de la phosphatase alcaline ne nous ont pas permis d'évaluer la taille de ce polyphosphate.

La protéolyse peut constituer un problème à plusieurs étapes de la purification. La présence de protéases peut mener à des conclusions erronées. La calponine étant très sensible aux protéases (Mak, 1997)<sup>1</sup>, il est aussi possible que lors de la purification la calponine ait été fragmentée par des protéases et que nous soyons en présence d'un produit de la protéolyse de la calponine. Ce fragment de la calponine pourrait jouer un rôle important dans l'étude du développement de l'artériosclérose ou lors de la (dé)différenciation cellulaire puisque l'expression de la calponine est, elle-même, dépendante de l'état de différenciation cellulaire des cellules musculaires lisses (Magushi et al., 1995). De plus, la découverte d'un polyphosphate dans la cellule pourrait être d'un intérêt tout aussi grand. La présence de ce polyphosphate pourrait servir de réservoir d'énergie: le phosphate servant à former de l'ATP, pour une réponse efficace lors de la contraction musculaire lisse (Kornberg, 1995).

---

(1) MAK, A.S. Juin 1997. Can. Fed. Of Biol. Soc. Québec. Canada. (Communication personnelle).



## BIBLIOGRAPHIE

AGREN, G., J. PONTEN, G. RONQUIST et B. WESTMARK. 1971. Demonstration of an ATPase at the cell surface of intact normal and neoplastic tumor cells in culture. *J. Cell. Physiol.* 78 : 171-176.

ALVAREZ, A., L. CHAYET, M. GALLEGUILLOS, L. GARCIA, A.M. KETTLUN, L. COLLADOS, A. TRAVERSOCORI, M. MANCILLA et M.A. VALENZUELA. 1996. Characterization of ATP diphosphohydrolase from rat mammary gland. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28: 75-79.

AURIVILLIUS, M., O.C. HANSEN, M.B.S. LAZREK, E. BOCK et B. ÖBRINK. 1990. The cell adhesion molecule Cell-CAM 105 is an ecto-ATPase and a member of the immunoglobulin superfamily. *FEBS Lett.* 264 : 267-269.

BATTASTINI, A.M.O., J.B. D.A. ROCHA, C.K. BARCELLOS, R.D. DIAS et J.J. SARKIS. 1991. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (E.C. 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16: 1303-1310.

BAYKOV A.A., O. A., EVTASHENKO et S.M. AVAEVA. 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* 171; 266-70.

BEAUDOIN, A.R., J.-F. LALIBERTÉ, D. LEBEL, A. LORD, G. GRONDIN, S. PHANEUF et P. ST-JEAN. 1980. Localization and physiological role of the ATP-diphosphohydrolase in the pancreatic acinar cell. In : *Biology of Normal and Cancerous Exocrine Pancreatic Cell* (Ribet A., Pradayrol, L. and Susini., editions) INSERM Symposium No. 15. pp. 273-280. Elsevier , North Holland Press.

BEAUDOIN, A.R., J. SÉVIGNY, G. GRONDIN, S. DAOUD et F.P. LÉVESQUE. 1997. Purification, characterization, and localization of two ATP diphosphohydrolase isoforms in bovin heart. *Am. J. Physiol.* 273 : H1-H9.

BEAUDOIN, A.R., J. SÉVIGNY, AND M. PICHER. 1996. ATP-diphosphohydrolase, apyrase and nucleotide phosphorylases: biochemical properties and functions. *Biomembranes*. vol. 5. A.G. Laa ed. JAI Press Inc, Greenwich . pp. 367-399.

BECKER, A., L. LUCKA, C. KILIAN, C. KANNICHT et W. REUTTER. 1993. Characterization of ATP-dependant taurocholate-carrier protein (gp110) of hepatocyte canalicular membrane. *Eur. J. Biochem.* 214 : 539-548.

BENREZZAK, O., G. GRONDIN, J. SÉVIGNY, F.-P. GENDRON, E. ROUSSEAU, P. D'ORLÉANS-JUSTE et A.R. BEAUDOIN. 1998. Identification and distribution of the ATP diphosphohydrolase in lymphoid organs. En préparation.

BOARDER, M.R., G.A. WEISMAN, J.T. TURNER et G.F. WILKINSON. 1995. G protein-coupled P<sub>2</sub> purinoceptors : from molecular biology to functional responses. *TIPS*. 16 : 133-139.

BOCCKINO, S.B., P.F. BLACKMORE, P.B. WILSON et J.H. EXTON. 1987. Phosphatidate accumulation in hormone-treated hepatocytes via phospholipase D mechanisms. *J. Biol. Chem.* 262 : 15309-15315.

BOWDITCH, J., S. NIGDIKAR, A.K. BROWN et J.W. DOWN. 1985. 5'-nucleotidase activity of isolated mature rat cardiac myocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 845 : 21-26.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-54.

BURNSTOCK, G. 1997. The past, present and future of purine nucleotides as signaling molecules. *Neurophysiology*. 36(9) : 1127-1139.

BURNSTOCK, G. 1980. Purinergic nerves and receptors. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 16 : 141-154.

BURNSTOCK, G. 1978. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. Cell membrane receptors for drugs and hormones. L. Bolis and R. Straub editors. Raven Press. New York. pp. 107-118.

CHAKRAVARTY, N. et Z. ECHETEBU. 1978. Plasma membrane adenosine triphosphatase in rat mast cells and macrophages : the relation of the mast cell enzyme to histamine release. *Biochem. Pharmacol.* 27 : 1561-1569.

CHAKRAVARTY, N. et H. NIELSEN. 1980.  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -activated adenosine triphosphatase in plasma and granule membranes in non-secreting mast cells. An electron microscopic histochemical study. *Exper. Cell. Res.* 130 : 175-184.

CHAMBERS, J.A.A. et D. DICKWOOD. 1993. *Biochemistry Labfax*. Bios Scientific Publishers. Academic Press. U.S.A. 361 p.

CHAREST, R., P.F. BLACKMORE et J.H. EXTON. 1985. Characterization of responses of isolated rat hepatocytes to ATP and ADP. *J. Biol. Chem.* 260 (29) : 15789-15794.

CHE, M., Z. GATMAITAN et I.M. ARIAS. 1997. Ectonucleotidases, purine nucleoside transporter, and function of bile canalicular plasma membrane of the hepatocyte. *FASEB J.* 11 : 101-108.

CHE, M., T. NISHIDA, Z. GATMAITAN et I.M. ARIAS. 1992. A nucleoside transporter is functionally linked to ectonucleotidases in rat liver canalicular membrane. *J. Biol. Chem.* 267 (14) : 9684-9688.

CHRISTOFORIDIS, S., T. PAPAMARCAKI, D. GALARIS, R. KELLNER et O. TSOLAS. 1995. Purification and properties of human placental ATP-diphosphohydrolase. *Eur. J. Biochem.* 234 : 66-74.

COMMUNI, D., M. PARMENTIER et J.M. BOEYNAEMS. 1996. Les récepteurs  $\text{P}_2$  : une famille en pleine expansion. *Med. Sci.* 12 (5) : 614-619.

COOPER, P.H. et D.R. STANWORTH. 1977. Effect of removal of calcium-activated adenosine triphosphatase from rat mast cells by treatment with sodium glycocholate. *Biochem. J.* 168 : 583 : 585.

CÔTÉ, Y. P., CHINTAMANI, P.T. et BEAUDOIN, A. R. 1992a. The control of nucleotides in blood vessels: role of the ATP diphosphohydrolase (apyrase). *Current Topics Pharmacology*. 1: 83-93.

CÔTÉ, Y.P., J. G. FILEP, B. BATTISTINI, J. GAUVRAU, P. SIROIS et A.R. BEAUDOIN. 1992b. Characterization of ATP-diphosphohydrolase activities in the intima and media of the bovine aorta : evidence for a regulatory role in platelet activation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta*. 1139 : 133-142.

CÔTÉ, Y.P., S. OUELLET et A.R. BEAUDOIN. 1992c. Kinetic properties of type-II ATP diphosphohydrolase from tunica media of bovine aorta. *Biochem. Biophys. Acta*. 1160 : 246-250.

CÔTÉ, Y.P., M. PICHER, P. ST-JEAN, R. BÉLIVEAU, M. POITIER et A.R. BEAUDOIN. 1991. Identification and localization of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) in bovine aorta : relevance to vascular tone and platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1078 : 187-191.

COUJARD, R., J. POIRIER et J. RACADOT. 1980. Précis d'histologie humaine. Les Presses de l'Université Laval, Québec, pp. 482-490.

DAOUD, S. 1996. Mise en évidence de nucléotides phosphohydrolases du système cardiovasculaire du boeuf : purification et caractérisation d'un fragment de la calponine. Thèse de doctorat. Sherbrooke. Canada. 159 pp.

DAWSON J.M., N.D. COOK, S.B. COADE, H. BAUM et T.J. PETERS. 1985. Demonstration of plasma membrane adenosine diphosphatase activity in rat lung. *Biochim. Biophys. Acta*. 856 : 566-570.

DEPIERRE, J.W. et M.L. KARNOWSKY. 1974a. Ecto-enzymes of guinea-pig polymorphonuclear leukocyte. I. Evidence for an ecto-adenosine monophosphatase, -adenosine triphosphatase, and -p-glycerophenylphosphatase. *J. Biol. Chem.* 249 : 7111-7120.

DEPIERRE, J.W. et M.L. KARNOWSKY. 1974b. Ecto-enzymes of guinea-pig polymorphonuclear leukocyte. II. Properties and suitability as marker for the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 249 : 7121-7129.

DIXON, M. et E.C. WEBB. 1979. Enzymes. 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press. New York. U.S.A. 1116 p.

DORNAND, J., J.C. MANI, M. MOUSSERON-CANET et B. PAU. 1974. Propriété d'une ATPase  $\text{Ca}^{2+}$ - ou  $\text{Mg}^{2+}$ -dépendante des membranes plasmiques de lymphocytes. Effet de la concavaline A sur les ATPases membranaires. *Biochimie (Paris)*. 56 : 851-857.

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

ELIAS, H., PAULY, J.E. et R.E. BURNS. 1978. Histology and human microbiology. John Wiley & Sons. Toronto. pp. 327-350.

EL-MOATASSIM, C., J. DORNAND et J. C. MANI. 1992. Extracellular ATP and cell signalling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1134: 31-45.

EMMELOT, P., E.L. BOS, E.L. BENEDETTI et P. RUMKE. 1964. Studies on plasma membranes. I. Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*. 90 : 126-145.

EMMELOT, P., E.L. BOS, E.L. BENEDETTI et H. PEETERS. 1968. Protides of the biological fluids. 15<sup>th</sup> Colloquium Bruges. Vol. 15. Elsevier. Amsterdam.

ENGELHARDT, W.A. 1957. Enzymes as structural elements of physiological mechanisms. *Proc. Int. Symp. Enzyme Chem. (Tokyo and Kyoto)*. 2 : 163-166.

EZAKI, J., M. HIMENO et K. KATO. 1992. Purification and characterization of ( $\text{Ca}_2+$ - $\text{Mg}_2+$ )-ATPase in rat liver lysosomal membranes. *J. Biochem.* 112 (1) : 33-39.

FRASSETTO, S.S., R.D. DIAS et J.J.F. SARKIS. 1993. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, E.C. 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol. Cell. Biochem.* 129: 47-55.

FREDHOLM, B.B., M.P. ABBRACCHIO, G. BURNSTOCK, J.W. DALY, T.K. HARDEN, K.A. JACOBSON, P. LEFF et M. WILLIAMS. 1994. VI. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46 (2) : 143-156.

GANONG, W.F. 1983. *Review of medical physiology.* 11<sup>th</sup> edition. Langemedical publications. California. pp. 401 à 405.

GELADOPOULOS, T.P., T.G. SOTIROUDIS et A.E. EVANGELOPOULOS. 1991. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity, *Anal. Biochem.* 192 : 112-6.

GIMONO, M., M. HERZOY, J. VANDEKERCKHOVE et J.V. SMALL. 1990. Smooth muscle specific expression of calponin. *FEBS.* 274 (1,2) 159-162.

GOODMAN, A.G., L.S. GOODMAN et A. GILMAN. 1980. *The pharmacological basis therapeutics.* 6<sup>th</sup> edition. Collier MacMillan Canada Ltd. Toronto. pp. 998-1009.

GRANNER, D. K., P. A. MAYERS, R. K. MURRAY et V. W. RODWELL. 1989. *Précis de Biochimie.* 7<sup>e</sup> édition. Les Presses de l'Université Laval. Québec. 797p.

GUINZBERG, R., I. LAGUNA, A. ZENTELLA, R. GUZMAN et E. PINA. 1987. Effect of adenosine and inosine on ureagenesis from lactate in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 245 : 371-374.

HANDA, M. et G. GUIDOTTI. 1995. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Co.* 218 : 916-923.

HARPER, H.A., V.W. RODWELL et P.A. MAYES. 1982. *Précis de biochimie.* 5<sup>e</sup> édition (française). Les Presses de l'Université Laval, Québec, 838 p.

HAÜSSINGER, D., E. BUSSHARDT, T. STEHLE, B. STOLL, M. WETTSTEIN et W. GEROK. 1988. Stimulation of thromboxane release by extracellular UTP and ATP from perfused rat liver. Role of icosanoids in mediating the nucleotide responses. *FEBS.* 178(1) : 249-256.

HAÜSSINGER, D., T. STEHLE et W. GEROK. 1987. Actions of extracellular UTP and ATP in perfused rat liver. A comparative study. *Eur. J. Biochem.* 167 (65) : 65-71.

HEYNS, A.P., D.J. VAN DEN BERG, G.M. POTGIETER et F.P. RETIEF. 1974. The inhibition of platelet aggregation by an aorta intima extract. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 32 : 417-431.

HOULD, R. 1982. *Histologie descriptive et éléments d'histopathologie.* Décarie éditeurs. Montréal. P.148-151.

HORNER-ANDREWS, W.H. 1979. *Studies in biology n° 105, liver.* University Park Press. Baltimore. 56 p.

INOUE, M., K.R. TRAN et I.M. ARIAS. 1982. The taurocholate transport by rat liver sinusoidal membrane vesicles : evidence of sodium cotransport. *Hepatology.* 2 : 572-579.

KALCKAR, H.M. 1944. Adenylpyrophosphatase and myokinase. *J. Biol. Chem.* 153 : 355-367.

KACZMAREK, E., K. KOZIAK, J. SÉVIGNY, J.B. SIEGEL, J. ANRATHER, A.R. BEAUDOIN, F.H. BACH et S.C. ROBSON. 1996. Identification and characterization of CD39/vascular ATP-diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 271 : 33116-33122.

KAST, C., B. STIEGER, K.H. WINTERHALTER et P.J. MEIER. 1994. Hepatocellular transport of bile acids. Evidence for distinct subcellular localizations of electrogenic and ATP-dependant taurocholate transport in rat hepatocyte. *J. Biol. Chem.* 269 (7) : 5179-5186.

KEGEL, B., P. HEINE, C.R. MALISZEWSKI et H. ZIMMERMANN. 1997. An ecto-ATPase and an Ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neurophysiology.* 26 (9) : 1189-1200.

KEPPENS, S. 1993. The complex interaction of ATP and UTP with isolated hepatocytes. How many receptors ? *Gen. Pharmac.* 24 (2) : 283-289.

KEPPENS, S. et H. DE WULF. 1986. Characterization of the liver P2-purinoceptor involved in the activation of glycogen phosphorylase. *Biochem. J.* 240 : 367-371.

KETTLUN, A.M., A. ALVAREZ, R. QUINTAR, M.A. VALENZUELA, L. COLLADOS, E. ARANDA, A. BANDA, L. CHAYET, M. CHIONG, M. MANCILLA et A. TRAVERSO-CORI. 1994. Human placental ATP-diphosphohydrolase: Biochemical characterization, regulation and function. *Int. J. Biochem.* 26: 437-448.

KNOWLES, A. F. 1995. The rat liver ecto-ATPase/C-CAM cDNA detects induction of carcinoembryonic antigen but not the mercurial-insensitive ecto-ATPase in human hepatoma Li-7A cells treated by epidermal growth factor and cholera toxin. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 207 (2): 529-535.

KNOWLES, A.F., R.E. ISLER et J.F. REECE. 1983. The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 731 : 88-96.

KOIKE, M., T. KASHIWAGURA et N. TAKEGUCHI. 1992. Gluconeogenesis stimulated by extracellular ATP is triggered by the initial increase in the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration of the periphery of hepatocytes. *Biochem. J.* 283(1) : 265-272.

KORNBERG, A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177 (3): 491-496.

KRAGBALL, K. et J. ELLEGAARD. 1978. ATPase activity of purified human normal T- and B- lymphocytes. *Scand. J. Heamatol.* 20 : 271-279.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680-685.

LALIBERTÉ, J.F. et BEAUDOIN, A.R. 1983. Sequential hydrolysis of the  $\gamma$ - and  $\beta$ -phosphate groups of ATP by ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. *Biochim. Biophys. Acta.* 742: 9-15.



LALIBERTÉ, J.-F., P. ST-JEAN et A.R. BEAUDOIN. 1982. Kinetic effect of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  on ATP hydrolysis by purified ATP-diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 257 : 3869-3874.

LEBEL, D., G.G. POIRIER, S. PHANEUF, P. ST-JEAN, J.F. LALIBERTÉ et A.R. BEAUDOIN. 1980. Characterization and purification of a calcium sensitive ATP-diphosphohydrolase from a pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 255(3) : 1227-33.

LEESON, T.S. et LEESON C.R. 1971. *Histologie*. Masson et C<sup>ie</sup> éditeurs. Paris. 451 p.

LIN, S.H. 1989. Localisation of the ecto-ATPase (ectonucleotidase) in the rat hepatocyte plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 264: 14403-14407.

LIN, S.H., O. CULIE, D. FLANAGAN et D.C. HINSON. 1991. Immunological characterization of two isoforms of rat liver ecto-ATPase that show an immunological and structural identity with a glycoprotein cell-adhesion molecule with Mr-105000. *Biochem. J.* 278 : 155-161.

LIN, S.H. et G. GUIDOTTI. 1989. Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. The primary structure of the ecto-ATPase is similar to that of the human biliary glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 264 : 14408-14414.

LORENSON, M.Y., Y.-C. LEE et L.S. JACOBS. 1981. Identification and characterization of anion-sensitive  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in pituitary secretory granule membranes. *J. Biol. Chem.* 256 : 12802-12810.

LOTERSZTANJ, S., J. HANOUNE et F. PECKER. 1981. A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependant ATPase in rat liver plasma membranes. Dependence on an endogenous protein activator distinct from calmodulin. *J. Biol. Chem.* 256 (21) : 11209-11215.

LÜTHJE, J. 1989. Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. *Klin. Wocheschr.* 67 : 317-327.

MAGUCHI, M., W. NISHIDA, K. KOHARA, A. KUWANO, I. KONDO et K. HIWADA. 1995. Molecular cloning and gene mapping of human basic and acidic calponins. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 217 (1): 238-244.

MAKUCH, R., K. BIRUKOV, V., V. SHIRINSKIY et R. DABROWS. 1991. Functional interrelation between calponin and caldesmon. *Biochem. J.* 280: 33-38.

MARGOLIS, R.N., M.J. SHELL. S.I. TAYLOR et A.L. HUBBARD. 1990. Hepatocyte plasma membrane ecto-ATPase (pp120/HA4) is a substrate for tyrosine kinase activity of the insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 166 (2) : 562-566.

MATHIE, R.T., B. ALEXANDER, V. RALEVIC et G. BURNSTOCK. 1991. Adenosine-induced dilatation of the rabbit hepatic arterial bed is mediated by A<sub>2</sub>-purinoceptors. *Brit. J. Pharmacol.* 103 (1) : 1103-1107.

MEDZIHRADESKY, F., E.I. CULLEN, H.L. LIN et G.G. BOLE. 1980. Drug-sensitive ATPase in human leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 29 : 2285-2290.

MEGO, J.L. 1984. Separation of rat liver lysosome membrane adenosine triphosphatase activities by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* 766 : 592-596.

MEIER, P.J. 1995. Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am. J. Physiol.* 269 : G801-G812.

MEYERHOF, O. 1945. The origin of the reaction of harden and young cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.* 157 : 105-119.

MILLER, R.T. et C. ESTRAN. 1995. Heat-induced epitope retrieval with pressure cooker. *Appl. Immunohistochemistry.* 3 : 190-93.

MIURA, Y. K., HIROTA, Y. ARAI et K. YAGI. 1987. Purification and partial characterization of adenosine triphosphatase activity in bovine aorta microsomes. *Thromb. Res.* 46 : 685-695.

MOODIE, F.D.L., H. BAUM, P.J. BUTTERWORTH et T.J. PETERS. 1991. Purification and characterization of bovine spleen ADPase. *Eur. J. Biochem.* 202: 1209-1215.

NAGY, A. et M.D. ROSENBERG. 1981. Adenosine triphosphate activity at the external surface of synaptosomes. *Eighth Meet. Int. Soc. Neurochem.* 40 : 226-234.

NAGY, A., T.A. SHUSTER et M.D. ROSENBERG. 1983. Adenosine triphosphatase activity at the external surface of chicken brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 40 : 226-234.

NAJJAR, S.M., N. PHILIPPE, S.I. TAYLOR et D. ACCILI. 1994. Molecular cloning of pp120/ecto-ATPase, an endogenous substrate of the insulin receptor kinase. Edited by D. LeRoith and M.K. Raizada. Plenum Press. New York. pp. 169-174.

NATHANSON, M.H., A.D. BURGSTAHLEER, A. MENNONE et J.L. BOYER. 1996. Characterization of cytosolic Ca<sup>2+</sup> signaling in rat bile duct epithelia. *Am. J. Physiol.* 271 : G86-G96.

NATHANSON, M.H., A. GAUTMAN, O.C. NG, R. BRUCK et J.L. BOYER. 1992. Hormonal regulation of paracellular permeability in isolated rat hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 262 : G1079-G1086.

NATHANSON, M.H. et J.L. BOYER. 1991. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology.* 14 : 551-566.

NISHIDA, T., Z. GATMAITAN, M. CHE et I.M. ARIAS. 1991. Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependant bile acid transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 6590-6594.

NOVIKOFF, A.B. et E. ESSNER. 1960. The liver cell. Some new approaches to its study. *Am. J. Med.* 29: 102-131.

OCHS, D.L. et P.W. REED. 1984. Ca<sup>2+</sup>-stimulated, Mg<sup>2+</sup>-dependant ATPase activity in neutrophil plasma membranes vesicles. Coupling to Ca<sup>2+</sup>-transport. *J. Biol. Chem.* 259 : 102 -106.

OHKUBO, I., T. ISHIBASHI, N. TANIGUCHI et A. MAKITA. 1980. Purification and characterization of nucleoside diphosphatase from rat-liver microsomes. Evidence for metalloenzyme and glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 112 : 111-118.

OZOLS, J. 1990. Preparation of Membrane Fractions. *Methods in Enzymology.* 182 (17) : 226-33.

PEARSON, J.D., J.C. CARLETON et J.L. GORDON. 1980. Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem. J.* 190 : 421-429.

PETIT, P., M.M. LOUBATIÈRES-MARIANI, S. KEPPENS et M.J. SHEEHAN. 1996. Purinergic receptors and metabolic function. *Drug Development Research.* 39 : 413-425.

PICHER, M., R. BÉLIVEAU, M. POITIER, D. SAVARIA, E. ROUSSEAU et A.R. BEAUDOIN. 1994. Demonstration of an ecto-ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in non-vascular smooth muscles of the bovine trachea. *Biochim. Biophys. Acta.-Gen Subjects.* 11200 : 167-174.

PICHER, M., Y.P. CÔTÉ, R. BÉLIVEAU, M. POITIER et A.R. BEAUDOIN. 1993. Demonstration of a novel type of ATP-diphosphohydrolase (E.C. 3.6.1.5) in the lung. *J. Biol. Chem.* 268 : 4699-1703.

PICHER, M., J. SÉVIGNY, P. D'ORLÉANS-JUSTE et A.R. BEAUDOIN. 1996. Hydrolysis of P-purinoceptor agonists by a purified ectonucleotidase from the bovine aorta, the ATP-diphosphohydrolase. *Biochem. Pharmacol.* 51: 1453-1460.

PIEBER, M., M.A. VALENZUELA, A.M. KETTLUN, M. MANCILLA, E. ARCANDA, L. COLLADOS et A. TRAVERSO-CORI. 1991. ATPase-ADPase activities of rat placental tissue. *Comp. Biochem. Biophys.* 100B: 281-285.

PLESNER, L. 1995. Ecto-ATPases: Identities and functions. *International Review of Cytology.* 158: 141-215.

ROMAN, R.M., Y. WANG, S.D. LIDOFSKY, A.P. FERANCHAK, N. LOMRI, B.F. SCHARSCHMIDT et J.G. FITZ. 1997. Hepatocellular ATP-binding cassette protein expression enhances ATP release and autocrine regulation of cell volume. *J. Biol. Chem.* 272 (35) : 21970-21976.

RYAN, JW et SMITH U. 1971. Metabolism of adenosine 5'-monophosphate during circulation through the lungs. *Trans. Assoc. Am. Physicians.* 84: 297-306.

SANDOVAL, S., L. GARCIA, M. MANCILLA, A.M. KETTLUN, L. COLADOS, L. CHAYET, A. ALVAREZ, A. TRAVERSO-CORI et M.A. VALENZUELA. 1996. ATP-diphosphohydrolase activity in rat renal microvillar membrane and vascular tissue. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28: 591-599.

SCHADECK, R.J.G., J.F.F. SARKIS, R.D. DIAS, H.M.M. ARAUJO et D.O.G. SOUZA. 1989. Synaptosomal apyrase in the hypothalamus of adults rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 22: 303-314.

SCHLENKER, T., J.M. ROMAC, A.I. SHARARA, R.M. ROMAN, S.J. KIM, N. LARUSSO, R.A. LIDDLE et J.G. FITZ. 1997. Regulation of biliary secretion through apical purinergic receptors in cultured rat cholangiocytes. *Am. J. Physiol.* 273 (5pt1) : G1108-G1117.

SÉVIGNY, J. 1997. Purification, caractérisation et localisation des ATP-diphosphohydrolases de mammifères et clonage de l'ADNc. Thèse de doctorat. Sherbrooke. Canada. 271 pp.

SÉVIGNY, J. et A.R. BEAUDOIN. 1994. Le monde des nucléotides extracellulaires. *Med. Sci.* 10 (8/9): 836-844.

SÉVIGNY, J., Y.P. CÔTÉ et A.R. BEAUDOIN. 1995. Purification of pancreas type I ATP-diphosphohydrolase and identification by affinity labelling with the 5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenine ATP analogue. *Biochem. J.* 312 : 351-356.

SÉVIGNY, J., GRONDIN, G., GENDRON, F.- P., ROY, J. et A.R. BEAUDOIN. 1998. Demonstration and immunolocalization of ATP diphosphohydrolase in the pig digestive system. *Am. J. Physiol.* (Présentement sous presse, accepté le 6 mai 1998).

SÉVIGNY, J., F.P. LÉVESQUE, G.GRONDIN et A.R. BEAUDOIN. 1997a. Purification of blood vessel ATP-diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochim. Biophys. Acta.* 1334 : 73-88.

SÉVIGNY, J., M. PICHER, G. GRONDIN et A.R. BEAUDOIN. 1997b. Purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase in bovine lungs. *Am. J. Physiol.* 272 : L939-L950.

SIGAL, S.H., S. BRILL, A.S. FIORINO et L.M. REID. 1992. The liver as a stem cell and lineage system. *Am. J. Physiol.* 263 : G139-G148.

SIPPEL, C. J., P. A. DAWSON, T. SHEN et D. H. PERLMUTTER. 1997. Reconstitution of bile acid transport in a heterologous cell by cotransfection of transporters for bile acid uptake and efflux. *J. Biol. chem.* 272 (29) : 18290-18297.

SIPPEL, C. J., M.J. McCOLLUM et D.H. PERLMUTTER. 1994. Bile acid transport by the rat liver canalicular bile acid transport/ecto-ATPase protein is dependent on ATP but not on its own ecto-ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 269 (4) : 2820-2826.

SMITH, G.P. et T.J. PETERS. 1981. Subcellular localization and properties of adenosine diphosphatase activity in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 673 : 234-242.

SMITH, G.P., T. SHAH, A.D.B. WEBSTER et T.J. PETERS. 1981. Studies on the kinetic properties and subcellular localization of adenosine diphosphatase in human peripheral blood lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 46 : 321-326.

SMOLEN, J.E. et G. WEISSMANN. 1978. Mg<sup>2+</sup>-ATPase as a membrane ecto-enzyme of human granulocytes. Inhibitors, activators and response to phagocytosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 512 : 525-538.

SORENSEN, R.G. et H.R. WEISSMANN. 1982. Localization of endogenous ATPase at the nerve terminal. *J. Bioenerg. Biomembr.* 14 : 527-547.

STEFANOVIC, V., J. CIESIELSKI-TRESKA, A. ABEL et P. MANDEL. 1974. Nucleoside triphosphate activity at the external surface of neuroblastoma cells. *Brain Res.* 81 : 427-441.

STEFANOVIC, V., M. LEDIG et P. MANDEL. 1976. Divalent cation activated ecto-nucleoside triphosphatase activity of nervous cells in tissue culture. *J. Neurochem.* 27 : 799-805.

SUCHY, F.J., J. SIPPEL et M. ANANTHANARAYANAN. 1997. Bile acid transport across the hepatocyte canalicular membrane. *FASEB J.* 11 : 199-205.

THORSTEN, S., J.M.-J. ROMAC, A.I. SHARARA, R.M. ROMAN, S.J. KIM, N. LARUSSO, R.A. LIDDLE et J.G. FITZ. 1997. Regulation of biliary secretion through apical purinergic receptors in cultured rat cholangiocytes. *Am. J. Physiol.* 273 : G1108-G1117.

TINTON, S.A., S.C. CHOW, P.M. BUC-CALDERON et G.E.N. KASS. 1996. Adenosine stimulates calcium influx in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 238 : 576-581.

TRAUNER, M., M. ARRESE, C.J. SOROKA, M. ANANTHANARAYANAN, T.A. KOEPPPEL, S.F. SCHLOSSER, F.J. SUCHY, D. KEPPLER et J.L. BOYER. The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. 1997. *Gastroenterology.* 113 : 255-264.

VALENZUELA, M.A., J. LOPEZ, M. DEPIX, M. MANCILLA, A.M. KETTLUN, L. CATALAN, M. CHIONG, J. GARRIDO et A. TRAVERSO-CORI. 1989. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 911-919.

VALENZUELA, M.A., L. COLLADOS., A.M. KETTLUN, M. MANCILLA, H. LARA, J. PUENTE, E. ARANDA, L. CHAYET, A. ALVAREZ et A. TRAVERSO-CORI. 1992. Changes in apyrase activity in uterus and mammary gland during lactogenic cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 113-118.

VALENZUELA, A.M. KETTLUN, S. SANDOVAL, L. GARCIA, M. MANCILLA, G. NECKELMANN, L. CHAYET, A. ALVAREZ, F. CUEVAS, L. COLLADOS, V.

ESPINOSA, A. TRAVERSO-CORI, I. BRAVO, C.G. ACEVEDO et E. ARANDA. 1996. Comparison of the biochemical properties, regulation and function of ATP-diphosphohydrolase from placenta and rat kidney. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 29: 589-597.

VANDER, A.J., J.H. SHERMAN, D.S. LUCIANO et J.R. GONTIER. 1989. *Physiologie humaine*. 2<sup>e</sup> édition. McGraw-Hill éditeurs. Montréal. pp. 488-490.

VANSTAPEL, F., M. WAEBENS, P. VAN HECKE, C. DECANNIERE et W. STALMANS. 1991. Modulation of maximal glycogenolysis in perfused rat liver by adenosine and ATP. *Biochem. J.* 277 : 597-602.

WALSH, M. P. 1991. Calcium-dependant mechanisms of regulation of smooth muscle contraction. *Biochem. Cell Biol.* 69 (12): 771-800.

WANG, Y., R. ROMAN, S.D. LIDOFKY et J.G. FITZ. 1996. Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 : 12020-12025.

WATTIAUX-DE-CONINCK S. et R. WATTIAUX. 1969. Nucleosidediphosphatase activity in plasma membrane of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 183 : 118-128.

WEISS, B. et L. SACHS. 1977. Differences in surface membrane ecto-ATPase and ecto-AMPase in normal malignant cells. I. Decrease in ecto-ATPase in myeloid leukemic cells and the independent regulation of ecto-ATPase and ecto-AMPase. *J. Cell. Physiol.* 93 : 183-188.

WHITE, T.D. 1978. Release of ATP from a synaptosomal preparation by elevated extracellular potassium and by veratridine. *J. Neurochem.* 30 : 329-336.

WILSON, P.D., G.J. RUSTIN, G.P. SMITH et T.J. PETERS. 1981. Electron microscopic cytochemical localization of nucleoside phosphatase in normal and chronic granulocytic human neutrophils. *Histochem.* 13 : 73-84.

WINDER, S.J., C. SUTHERLAND et M.P. WALSH. 1991. Purification and functional characterization of smooth muscle calponin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 304: 37-51.



WINDER, S.J. et M. P. WALSH. 1990. Smooth muscle calponin: Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 265: 10148-10155.

WINDSCHEIF, U. 1996. Purinoceptors : from history to recent progress. A review. *J. Pharmacol.* 48 : 993-1011.

WOLKOFF, L.I., R.D. PERRONE, S.A. GRUMAN, D.W. LEE, S.P. SOLTOFF, L.C. ROGERS, M. BEINBORN, S.L. FANG, S.H. CHENG et D.M. JEFFERSON. 1995. Purinoceptor P<sub>2U</sub>: identification and function in human intrahepatic biliary epithelial cell lines. *Cell Calcium.* 17 (5) : 375-383.

YAGI, K., Y. ARAI, N. KATO, K. HIROTA et Y. MIURA. 1989. Purification of ATP diphosphohydrolase from bovine aorta microsomes. *Eur. J. Biochem.* 180: 509-513.

YAGI K., M. SHINBO, M. HASHIZUME, L.S. SHIMBA, S. KURIMURA et Y. MIURA. 1991. ATP diphosphohydrolase is responsible for ecto-ATPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 180 : 1200-1206.

YAGI, K., N. KATO, M. SHINBO, L.S. SHIMBA et Y. MIURA. 1992. Purification and characterization of adenosine diphosphatase from umbilical vessels. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 2143-2146.