

**PURIFICATION, CARACTÉRISATION ET LOCALISATION  
DES ATP DIPHOSPHOHYDROLASES DE MAMMIFÈRES,  
ET CLONAGE DE L'ADNc**

par

Jean Sévigny

thèse présentée au département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 1997



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.

0-612-26400-9

*Je dédie ma thèse aux trois  
femmes de ma vie:*

*à Colette et Sophie pour leur  
affection et leur soutien*

*à ma chère Maman qui m'a tout  
appris et tout donné*

## SOMMAIRE

L'intérêt pour les nucléotides extracellulaires s'est accru au cours des dernières années, au fur et à mesure qu'ont été élucidées leurs fonctions chez les organismes supérieurs. Ces nucléotides proviennent d'un bris cellulaire ou sont libérés par exocytose ou par des mécanismes encore mal connus. Les plaquettes sanguines, par exemple, entreposent des nucléotides dans des grains de sécrétion et les libèrent par exocytose lors de l'agrégation. Les nucléotides exercent leurs actions essentiellement par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques dont plusieurs fonctions sont connues, particulièrement dans les systèmes cardiovasculaire, respiratoire et nerveux. Ces fonctions peuvent être modulées par l'ATP diphosphohydrolase (ATPDase), une enzyme de surface qui convertit les triphospho- et diphosphonucléosides en nucléosides monophosphates.

Lors de leurs études doctorales, les docteurs D. LeBel, Y.P. Côté et M. Picher ont respectivement identifié des ATPDases dans le pancréas de porc, l'aorte et le poumon de boeuf. Bien que ces enzymes possèdent toutes les caractéristiques des ATPDases, elles diffèrent par leur pH optimum, leur courbe d'inactivation par la chaleur et par irradiation au  $^{60}\text{Co}$ , ainsi que par leur migration en gel d'électrophorèse dans des conditions non-dénaturantes. Ils ont proposé d'identifier ces différentes formes d'ATPDases: types I, II et III. Afin de caractériser ces enzymes et de mieux clarifier la relation structurelle entre ces isoformes, il devenait essentiel de les purifier. L'identification de la protéine permettrait ensuite la production d'anticorps et le clonage de son gène.

Une revue de la littérature nous avait indiqué que chez les mammifères l'ATPDase était une protéine membranaire intrinsèque qui, à cause de sa sensibilité aux détergents et de sa faible quantité dans les tissus, était qualifiée d'enzyme difficile à purifier. En plus, on sait maintenant que plusieurs articles traitant de la purification de cette enzyme avaient conduit à l'identification de la mauvaise protéine. La première partie de ce travail consistait donc à élaborer un protocole afin de

purifier les trois types d'ATPDases mis en évidence dans notre laboratoire. Ce protocole incluait dans l'ordre des étapes de centrifugations différentielles, une centrifugation sur coussin de sucrose, la solubilisation des protéines avec le Triton X-100, un fractionnement par trois chromatographies successives (colonnes DEAE-agarose, Affi-Gel Bleu et Concanavalin A- ou Wheat Germ Agglutinin-agarose) et séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions non-dénaturantes. Ces étapes de purification ont conduit à l'identification d'une protéine de 54 kDa dans le pancréas (ATPDase isoforme I), et de 78 kDa dans l'aorte et le poumon (isoforme II). La présence d'un site de liaison aux nucléotides sur chacune de ces protéines purifiées a été confirmée par marquage avec un analogue de l'ATP, le 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyladénosine (FSBA). La liaison à des lectines et le traitement à la N-glycosidase F ont montré que ces ATPDases sont des glycoprotéines possédant plusieurs chaînes N-glycosylées: de quatre à dix pour l'ATPDase du pancréas et de six à douze pour celles de l'aorte et du poumon. Une brève analyse des sucres en bout de chaîne de l'ATPDase de l'aorte bovine a montré la présence de groupements mannoses et/ou glucoses, et l'absence de *N*-acétylgalactosamine et de  $\alpha$ -L-fucose.

Les protéines purifiées du pancréas de porc et de l'aorte de boeuf ont été séquencées en collaboration avec madame F. Dumas de l'Institut de recherche en biotechnologie à Montréal. Les 19 acides aminés de la séquence N-terminale de l'ATPDase du pancréas ainsi que cinq séquences internes de 7 à 24 acides aminés de l'isoforme de l'aorte ont été obtenues. Nous avons produit un anticorps dirigé contre les seize premiers acides aminés de la séquence N-terminale de l'ATPDase du pancréas. Cet anticorps reconnaissait, après immunobuvardage, les deux isoformes de l'ATPDase (54 et 78 kDa), du porc, du boeuf et de l'humain. L'analyse de chacune des six séquences obtenues, avec les banques de données GenBank et EMBL, a montré une forte similarité entre leurs acides aminés et ceux de CD39 humaine, un marqueur des lymphocytes B matures et de plusieurs types de lymphocytes T activés. Aucune fonction ne lui avait été attribuée. D'autres informations venaient confirmer l'homologie entre CD39 et l'ATPDase: la masse moléculaire et le niveau de N-glycosylation de CD39 correspondaient parfaitement avec ceux des ATPDases de l'aorte et du poumon de boeuf. Nous avons

aussi montré qu'un anticorps commercial dirigé contre CD39 immunoprécipitait les activités ATPasique et ADPasique d'un extrait de cordons ombilicaux humains, un tissu riche en ATPDase. Nous avons alors établi une collaboration avec les docteurs F.H. Bach et S.C. Robson du Deaconess Hospital, Harvard Medical School à Boston, pour cloner l'ADNc de CD39. Ce dernier a été cloné dans un vecteur d'expression, puis exprimé par transfection transitoire dans les cellules COS. Cette expérience a démontré hors de tout doute que CD39 est une ATPDase. En effet, la protéine produite possédait les caractéristiques biochimiques des ATPDases: elle hydrolysait l'ATP et l'ADP, et était inhibée par l'azidure de sodium. De plus, l'antisérum développé contre l'ATPDase de porc ainsi que l'anticorps commercial contre CD39 humaine, reconnaissait tous deux la protéine exprimée par l'ADNc de CD39, tel que montré par détection après immunobuvardage. L'apparition d'une activité ATPDasique à la surface des cellules COS transfectées démontrait aussi que l'ATPDase/CD39 était une ectoenzyme. Cette dernière information était préalable à la définition des rôles physiologiques de l'enzyme. Plusieurs observations suggéraient que l'ecto-ADPase des cellules endothéliales vasculaires pouvait contrôler l'agrégation plaquettaire. Avec le gène cloné, nous possédions alors un bel outil pour vérifier cette fonction. Nous avons montré *in vitro* que l'ATPDase/CD39 produite dans les cellules COS pouvait inhiber l'agrégation plaquettaire induite par divers agonistes physiologiques, tels l'ADP, la thrombine et le collagène.

En plus de l'ADNc, nous avons développé d'autres outils qui facilitent l'étude des rôles des ATPDases en permettant de localiser ces enzymes. Nous avons produit plusieurs anticorps polyclonaux chez le lapin, dirigés contre diverses portions de la séquence primaire de l'ATPDase humaine et porcine, et contre l'enzyme purifiée du boeuf. Nous avons obtenu une variété d'anticorps, dont certains reconnaissent les deux isoformes de l'ATPDase, un autre est spécifique à l'isoforme I du pancréas de porc, et trois autres sont spécifiques à l'isoforme II. Nous avons alors entrepris l'étude de la distribution des ATPDases dans une variété de tissus de porcs, selon trois approches: l'approche enzymatique, immunologique et histo-immunologique. (1) Nous avons mesuré les activités ATPasique et ADPasique des fractions enrichies en membrane plasmique puis testé un inhibiteur des

ATPDases, l'azidure de sodium. L'existence des ATPDases a été vérifiée par des enzymogrammes, obtenus après électrophorèse des différentes fractions en gel de polyacrylamide dans des conditions non-dénaturantes suivie de la détection de l'activité enzymatique. (2) La présence des isoformes I et II de l'enzyme, dans les divers tissus, a été montrée par immunobuvardage et détection avec un anticorps anti-ATPDase. (3) Finalement, cet anticorps a permis de localiser la protéine par immunocytochimie chez le porc et le boeuf. Nous avons examiné sa distribution cellulaire dans les systèmes cardiovasculaire, respiratoire, immunitaire et digestif. L'ATPDase est exprimée dans de nombreuses cellules comme par exemple: les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, les cellules musculaires lisses en général, les cardiomyocytes, les cellules des fibres de Purkinje, les lymphocytes, les cellules mesothéliales, les chondrocytes et les cellules épithéliales en général.

Les ATPDases sont des enzymes relativement peu connues et leurs fonctions mal identifiées, à l'exception d'un rôle dans l'agrégation plaquettaire que nous avons démontré *in vitro*. Cette seule fonction de l'enzyme est capitale puisqu'une agrégation plaquettaire mal contrôlée est à la base de maladies cardiovasculaires, telle la thrombose. En résumé, nous avons montré que les ATPDases sont les principales ectonucléotidases des cellules de mammifères, et nous en avons purifié deux isoformes. Ce sont des glycoprotéines que nous avons identifiées à CD39 humaine, dont nous avons cloné et réexprimé l'ADNc. Nous avons également produit plusieurs anticorps polyclonaux de différentes spécificités, dirigés contre ces protéines. Nous avons ainsi développé de nouveaux outils qui nous permettront d'approfondir nos connaissances de ces enzymes.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord témoigner ma vive reconnaissance envers mon directeur de recherche le Dr. Adrien Beaudoin pour l'aide, la disponibilité, l'ouverture d'esprit, la franchise, la sagesse qu'il a su me démontrer ainsi que son éternel optimisme, particulièrement dans les moments les plus difficiles. J'espère avoir acquis quelques-unes de ses grandes qualités que j'ai eu maintes fois l'occasion de découvrir pendant mes études graduées. J'ai également beaucoup apprécié la confiance et la latitude qu'il m'a données tout au long de la réalisation de ce projet.

J'aimerais souligner le travail toujours bien fait et la collaboration fructueuse de M. Gilles Grondin et de Mme Johanne Proulx dans l'exécution du projet. J'exprime ma vive gratitude à Mme Marielle Martin pour son aide précieuse dans la préparation de mes affiches présentées dans divers congrès. Je tiens aussi à remercier les Dr. S.C. Robson et F.H. Bach de Deaconess Hospital, Harvard Medical School à Boston, qui m'ont permis d'effectuer un stage de deux mois dans leurs laboratoires, lequel a contribué à une plus grande productivité de nos deux équipes.

Je ne saurais passer sous silence les moments agréables passés auprès de mes amis du laboratoire qui ont su égayer notre environnement de travail: Yvan Côté, Maryse Picher, Salma Daoud, Alioua Abderahman, Hélène Douillard, Gilberte Bombardier, Pierre Rousseau, Daniel Proulx, Chantal Dunn, Francis Levesque, Alexandrine Pelletier, Fernand-Pierre Gendron, Marie-Claude Leclerc, Julie Roy, Maryse St-Georges, Hélène Roberge ainsi que le Dr. Ouhida Benrezzak que je remercie tout spécialement pour avoir fait une lecture critique de cette thèse.

Je remercie mes conseillers, les Drs. Michel Bégin et Ryszard Brzezinski, pour leur disponibilité et pour la confiance qu'ils m'ont témoignés, ainsi que le Dr.



Jean-Gilles Latour de l'institut de cardiologie de Montréal qui m'a fait l'honneur d'évaluer ma thèse comme examinateur externe.

Je remercie la direction du département de biologie de l'Université de Sherbrooke qui m'a permis d'entreprendre ces études et qui m'a donné l'opportunité d'acquérir de l'expérience en enseignement. En terminant, je remercie les Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), la Fondation des Maladies du Coeur du Canada ainsi que les Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) qui m'ont octroyé une bourse d'étude doctorale.

## TABLE DES MATIÈRES

Sommaire .....	ii
Remerciements .....	vi
Table des matières .....	viii
Liste des abréviations.....	xiii
Liste des tableaux .....	xvii
Liste des figures.....	xix
INTRODUCTION.....	1
Les nucléotides extracellulaires .....	1
Sources des nucléotides extracellulaires.....	2
Les récepteurs de nucléotides et de nucléosides.....	5
Fonctions des nucléotides extracellulaires.....	12
Les ectonucléotidases.....	17
Les ATP diphosphohydrolases.....	17
Caractéristiques et sources des ATP	
diphosphohydrolases .....	17
Rôle des ATP diphosphohydrolases .....	24
Purification des ATP diphosphohydrolases.....	29
Hypothèses et objectifs de travail .....	34
CHAPITRE 1.....	37
Purification et caractérisation de l'ATP diphosphohydrolase type I.....	37
Synopsis .....	39
Introduction .....	39
Experimental.....	40
Materials.....	40
ATPDase purification.....	41
ATPDase assays.....	42
N-glycosidase F treatment .....	42

Polyclonal antibodies to FSBA .....	43
FSBA labelling and SDS-PAGE.....	43
Immunoblotting procedure.....	44
Results.....	45
ATPDase purification.....	45
N-glycosidase F treatment .....	53
FSBA labelling.....	53
Discussion .....	58
Acknowledgements .....	60
References .....	61
CHAPITRE 2.....	65
Purification et caractérisation de l'ATP diphosphohydrolase type II, et immunolocalisation de l'enzyme dans l'aorte de boeuf.....	65
Abstract.....	67
Introduction .....	67
Materials and methods .....	69
Materials.....	69
ATPDase purification.....	69
Isolation of the particulate fraction .....	69
Solubilization and column chromatographies.....	70
ATPDase assays.....	72
PNGase F treatment .....	72
Sedimentation of ATPDase activity with lectin-agarose.....	72
FSBA labelling and SDS-PAGE.....	73
ATPDase antibodies .....	74
Immunoblotting procedure.....	74
Immunohistochemistry .....	75
Results.....	76
ATPDase purification.....	76
FSBA labelling of the ATPDase .....	84
The 78 kDa ATPDase a glycoprotein .....	84
Immunoreactivity with pig pancreas ATPDase antibodies.....	87

Discussion .....	99
Acknowledgements .....	102
References .....	102
 CHAPITRE 3.....	 108
 Purification et caractérisation de l'ATP diphosphohydrolase type III, et immunolocalisation de l'enzyme dans le poumon de boeuf .....	 108
Abstract .....	110
Introduction .....	110
Materials and methods .....	112
Materials.....	112
ATPDase purification and assays.....	113
N-glycosidase F treatment .....	114
FSBA labelling and SDS-PAGE.....	114
Immunoblotting procedure.....	115
Immunohistochemistry .....	115
Results.....	116
ATPDase purification.....	116
FSBA labelling of the ATPDase .....	125
The 78 kDa ATPDase is a glycoprotein.....	125
Immuloalization of the bovine lung ATPDase.....	128
Discussion .....	141
Acknowledgments .....	144
References .....	144
 CHAPITRE 4.....	 149
 Comparaison de différentes isoformes d'ATP diphosphohydrolase de mammifères et leur identification à CD39.....	 149
ATP diphosphohydrolases: a wide distribution.....	151
Purification of mammalian ATPDases .....	152
Pig pancreas ATPDase: isoform I.....	152
Bovine aorta ATPDase: isoform II.....	154

Bovine lung ATPDase: isoform II or III ? .....	156
Partial amino acid sequences of ATPDase isoforms I and II .....	157
An antibody .....	157
A putative conserved region involved in catalytic activity.....	159
Summary and conclusion.....	159
Acknowledgements .....	160
References .....	160
 CHAPITRE 5.....	 165
 Clonage et expression de l'ADNc de CD39/ATPDase: inhibition de l'agrégation plaquettaire .....	 165
Summary .....	168
Introduction .....	168
Materials and methods .....	170
Purification and sequencing of mammalian ATPDase.....	170
RT-PCR.....	171
Transient transfection.....	172
Immunocytochemistry .....	172
Cytofluorometric analysis of the expression of CD39.....	172
Cell lysate and cell membrane preparation .....	173
Western blotting.....	173
Polyclonal antibody to ATPDase .....	174
ATPDase activity measured by hydrolysis of ATP and ADP.....	174
ATPDase activity measured by hydrolysis of <sup>14</sup> C-ADP to AMP .....	174
Platelet aggregation assays .....	175
Effect of reactive oxygen intermediates on ATPDase activity .....	175
Northern analysis .....	176
Results.....	176
ATPDase sequence analysis.....	176
Isolation of CD39 cDNA and its expression in a mammalian system.....	179
Immunological identity between CD39 and ATPDase.....	179

ATPDase activity of CD39 .....	183
Effect of CD39/ATPDase on platelet aggregation.....	186
Effect of oxidative stress on ATPDases activity .....	186
Determination of a potentially important motif in CD39/ATPDase.....	190
Northern analysis .....	190
Discussion .....	193
Acknowledgments .....	197
References .....	197
 CHAPITRE 6.....	 200
 Distribution des ATP diphosphohydrolases dans les tissus de porc .....	 200
Introduction .....	200
Procédure expérimentale .....	201
Production des anticorps polyclonaux.....	201
Préparation des antigènes.....	201
Injections et prélèvements sanguins.....	202
Préparation des fractions particulières et essais enzymatiques.....	202
Gels d'électrophorèse, immunobuvardages et immuno- histochimie .....	203
Résultats.....	203
Production d'anticorps polyclonaux.....	203
Distribution des ATP diphosphohydrolases .....	206
Discussion .....	224
Remerciements.....	228
 DISCUSSION GÉNÉRALE.....	 229
 ANNEXES .....	 232
Articles produits au cours de ces études.....	232
Communications présentées au cours de ces études .....	234
Brevets déposés au cours de ces études.....	237
BIBLIOGRAPHIE .....	238

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN <sub>c</sub>	ADN complémentaire
ADO	Adénosine
ADP	Adénosine diphosphate
ADP $\beta$ S	Adénosine 5'-O-(2-thiodiphosphate)
ADPase	Adénosine diphosphatase
ADPasique	Adénosine diphosphatasique
AMP	Adénosine monophosphate
AMPasique	Adénosine monophosphatasique
AMP <sub>c</sub>	Adénosine monophosphate cyclique
AMPPD	3-(2'-spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetane
Ap <sub>3</sub> A	Diadénosine 5'-triphosphate
Ap <sub>4</sub> A	Diadénosine 5'-tétraphosphate
Ap <sub>5</sub> A	Diadénosine 5'-pentaphosphate
APCPP	Adénosine 5'-( $\alpha,\beta$ -méthylène) triphosphonate
APNEA	N <sup>6</sup> -2-(4-aminophényl) éthyladénosine
APPCP	Adénosine 5'-( $\beta,\gamma$ -méthylène) triphosphonate
APPNP	Adénylyl 5'-( $\beta,\gamma$ -imido) diphosphonate
Arg	Arginine
ATP	Adénosine triphosphate
ATP <sup>4-</sup>	Adénosine triphosphate ionisé
ATP $\gamma$ S	Adénosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)
ATPase	Adénosine triphosphatase
ATPasique	Adénosine triphosphatasique
ATPDase	ATP diphosphohydrolase
ATPDasique	ATP diphosphohydrolasique
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BSA	Albumine sérique de boeuf
BzATP	Benzoylbenzoïque-ATP
<sup>60</sup> Co	Cobalt 60

CAM	Protéine d'adhésion cellulaire
CCPA	2-chloro N <sup>6</sup> -cyclopentyl adénosine
cDNA	ADN complémentaire
CDP	Cytidine diphosphate
CGS 21680	2-[ <i>p</i> -(2-carbonyl-éthyl)-phényléthylamino]-5'- <i>N</i> -éthyl-carboxamido adénosine
Con A	Concanavalin A
CPA	N <sup>6</sup> -cyclopentyl adénosine
CV 1808	2-phénylamino adénosine
DAG	Diacylglycérol
DMEM	Milieu MEM modifié par Dulbecco
DMSO	Diméthyl sulphoxyde
DTT	1,4-dithiothréitol
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ("endothelium derived hyperpolarising factor")
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium ("endothelium derived relaxing factor")
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
FAD	Flavine adenine dinucléotide
FCS	Sérum de veau fœtal
FSBA	5'- <i>p</i> -fluorosulfonylbenzoyladénosine
GalNAc	<i>N</i> -acétylgalactosamine
GDH	Glutamate déshydrogénase
G <sub>i</sub>	GTPase inhibitrice
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
GMPc	GMP cyclique
G <sub>s</sub>	GTPase stimulatrice
GTP	Guanosine triphosphate
h	Heure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance ("high-performance liquid chromatography")
hre	Heure
HRP	Streptavidine-horseradish peroxidase



IgG	Immunoglobuline G
IP <sub>3</sub>	Phosphatidyl-inositol 1,4,5 triphosphate
IP <sub>4</sub>	Phosphatidyl-inositol 1,3,4,5 tétraphosphate
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
Kb	Kilo paires de bases
kDa	Kilo daltons
kg	Kilogramme
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis qui est la concentration de substrat permettant à une enzyme d'atteindre la moitié de sa vitesse maximale d'hydrolyse
2-MeSATP	2-méthylthio-ATP
M	Molaire
mA	Milliampère
mAb	Anticorps monoclonal
MEM	Milieu minimal essentiel de Eagle ("Eagle's minimum essential medium")
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
M <sub>r</sub>	Masse moléculaire
mRNA	Acide ribonucléique messenger
mU	Milliunité
NAD	Nicotinamide adenine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NBT	Bleu nitro de tétrazolium
NECA	5'-N-éthylcarboxamino adénosine
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthétase ("Nitrique oxide synthase")
<sup>32</sup> p	Phosphore 32
PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide
pb	Paires de bases
PBS	Tampon phosphate dans de la saline

PCR	Réaction de polymérase en chaîne ("polymerase chain reaction")
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandine I <sub>2</sub> (prostacycline)
P <sub>i</sub>	Phosphate inorganique
PIPES	1,4-piperazinediéthane-sulfonate de sodium
PLC	Phospholipase C
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PNGase F	N-glycosidase F
R-NO	Radical d'oxyde nitrique
R-PIA	N <sup>6</sup> -(R-phénylisopropyl)-adénosine
RNA	Acide ribonucléique
RT-PCR	Transcriptase inverse suivi d'un PCR
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
U	Unité
UEA	<i>Ulex europaeus</i> I agglutinin
UTP	Uridine triphosphate
WGA	Wheat germ agglutinin
ZGM	Membrane de grains de zymogènes
μM	Micromolaire

## LISTE DES TABLEAUX

### INTRODUCTION

Tab. 1: Distribution et fonctions des récepteurs de nucléotides et de nucléosides .....	6
Tab. 1: suite .....	7
Tab. 2: Classification des récepteurs de nucléosides .....	8
Tab. 3: Classification des récepteurs de nucléotides .....	9
Tab. 4: Propriétés biochimiques des ATP diphosphohydrolases de plantes .....	19
Tab. 5: Propriétés biochimiques des ATP diphosphohydrolases d'invertébrés .....	20
Tab. 5: suite .....	21
Tab. 6: Propriétés biochimiques des ATP diphosphohydrolases de vertébrés .....	22
Tab. 6: suite .....	23

### CHAPITRE 1

Tab. 1: ATPDase purification .....	46
------------------------------------	----

### CHAPITRE 2

Tab. 1: ATPDase purification, from the particulate fraction .....	77
Tab. 2: ATPDase binding to lectin-agarose beads .....	88

### CHAPITRE 3

Tab. 1: ATPDase purification .....	117
------------------------------------	-----

## CHAPITRE 4

Tab. 1: Biochemical properties of mammalian ATP diphosphohydrolases purified in our laboratory.....	153
---	-----

## CHAPITRE 6

Tab. 1: Activité ATPDasique des fractions particulaires utilisées pour vérifier la spécificité des anticorps.....	204
Tab. 2: Anticorps et spécificité.....	205
Tab. 3: Distribution de l'activité ATPasique et ADPasique dans les tissus de porc .....	207
Tab. 3: suite.....	208

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

Fig. 1: Sources des nucléotides extracellulaires dans le système vasculaire.....	4
Fig. 2: Le contrôle du tonus vasculaire par les nucléotides.....	15
Fig. 3: ATP diphosphohydrolase et agrégation plaquettaire.....	27
Fig. 4: ATP diphosphohydrolase et tonus vasculaire.....	28

### CHAPITRE 1

Fig. 1: DEAE-agarose chromatography of the particulate fraction solubilized with Triton X-100.....	47
Fig. 2: Affi-Gel Blue chromatography of the active fraction from DEAE-agarose column.....	48
Fig. 3: Localization of the ATPDase by PAGE under non-denaturing conditions of the Affi-Gel Blue fraction.....	49
Fig. 4: SDS-PAGE protein patterns at the different steps of the purification procedure and after N-glycosidase F digestion of the Affi-Gel Blue fraction.....	51
Fig. 5: Characterisation of rabbit anti-FSBA antibodies.....	54
Fig. 6: Western blot of FSBA labelled samples from the Affi-Gel Blue column fraction.....	56

### CHAPITRE 2

Fig. 1: DEAE-agarose chromatography of the particulate fraction protein solubilized with Triton X-100.....	78
Fig. 2: Affi-Gel Blue chromatography of the active fraction eluted from the DEAE-agarose column.....	79
Fig. 3: Localization of ATPDase after PAGE under non-denaturing conditions of the Affi-Gel Blue fraction.....	80

Fig. 4: Protein composition at the different steps of the purification procedure as determined by SDS-PAGE.....	82
Fig. 5: Western blot of FSBA labelled protein isolated from Affi-Gel Blue column.....	85
Fig. 6: PNGase F treatment of Con A-agarose column purified fraction .....	89
Fig. 7: Western Blot of bovine and porcine tissues showing immunoreactivity with a rabbit antiserum against pig pancreas ATPDase .....	91
Fig. 7: suite.....	93
Fig. 8: Immunohistological localization of ATPDase in the bovine aorta.....	95
Fig. 9: Immunohistological localization of ATPDase in the tunica intima.....	97

### CHAPITRE 3

Fig. 1: DEAE-agarose chromatography of the particulate fraction solubilized with Triton X-100.....	118
Fig. 2: Affi-Gel Blue chromatography of the active fractions from the DEAE-agarose column .....	119
Fig. 3: Localization of the ATPDase by PAGE under non-denaturing conditions of the Affi-Gel Blue fraction.....	121
Fig. 4: SDS-PAGE analysis of the enzymogram obtained after separation of the Affi-Gel Blue fraction by PAGE under non-denaturing conditions .....	123
Fig. 5: Western blot of FSBA-labelled proteins from the DEAE and Affi-Gel Blue fractions.....	126
Fig. 6: N-glycosidase F treatment of the WGA-agarose purified fraction.....	129
Fig. 7: Immunodetection of the lung ATPDase with anti-ATPDase antibodies.....	131
Fig. 8: Immunohistological localization of the ATPDase in the bovine respiratory tract.....	133
Fig. 9: Immunohistological localization of the ATPDase at the level of bronchioles and alveoli .....	135
Fig. 10: Immunohistological localization of the ATPDase in alveolar sacs .....	137
Fig. 11: Immunohistological localization of the ATPDase at the level of the visceral pleura .....	139

## CHAPITRE 4

Fig. 1: Schematic representation of the enzymograms of the highly purified fractions of ATPDase from different sources .....	155
Fig. 2: Partial amino acid sequences of ATPDase isoforms I and II, and human CD39 .....	158

## CHAPITRE 5

Fig. 1: Primary sequence of CD39 (GenBank access No. S73813) .....	177
Fig. 2: Cytofluorometric analysis of the expression of CD39 .....	180
Fig. 3: Immunological confirmation of CD39/ATPDase expression by Western blotting .....	181
Fig. 4: Specific ATPDase biochemical activity of CD39 .....	184
Fig. 5: Anti-platelet aggregatory function of CD39 .....	187
Fig. 6: Effect of oxidants on the expressed CD39/ATPDase .....	188
Fig. 7: Tissue specific expression of CD39 mRNA .....	191

## CHAPITRE 6

Fig. 1: Enzymogramme des fractions particulières en gel de polyacrylamide dans des conditions non-dénaturantes .....	209
Fig. 2: Détection par immunobuvardage des ATPDases des fractions particulières .....	211
Fig. 3: Localisation immunohistologique des ATPDases dans la rate (fibres nerveuses) .....	214
Fig. 4: Localisation immunohistologique des ATPDases dans la rate (pulpes blanche et rouge) .....	216
Fig. 5: Localisation immunohistologique des ATPDases dans la rate (fort grossissement) .....	218
Fig. 6: Localisation immunohistologique des ATPDases dans les amygdales .....	220
Fig. 7: Localisation immunohistologique des ATPDases dans les plaques de Peyer de l'iléon .....	222

## INTRODUCTION

Au cours des dernières années, un nombre croissant d'études ont signalé la présence d'ATP, d'ADP et d'autres nucléotides dans le milieu extracellulaire des cellules eucaryotes des mammifères. D'autres travaux ont montré que l'ATP, l'ADP et l'adénosine reconnaissent des récepteurs, à la surface des cellules. En parallèle, plusieurs études ont mis en évidence des activités ectonucléotidasiques, aussi à la surface des cellules, qui sont l'oeuvre d'ectoenzymes. Ces enzymes sont des protéines intrinsèques de la membrane plasmique dont le site catalytique est orienté vers le milieu extracellulaire (Engelhardt, 1957; DePierre et Karnovsky, 1973). Notre laboratoire s'intéresse aux ectoenzymes qui hydrolysent les nucléotides extracellulaires. Les travaux présents ont porté sur les ATP diphosphohydrolases (ATPDases) des mammifères. Cette famille d'enzymes hydrolyse les groupements phosphates  $\gamma$  et  $\beta$  des triphospho- et diphosphonucléosides. Même si la fonction catalytique de ces enzymes est bien connue, on ne peut en dire autant des rôles physiologiques qu'elles exercent au niveau des divers systèmes de l'organisme. C'est au niveau du système circulatoire que la fonction des ATPDases est la mieux décrite. Une telle enzyme serait essentielle au contrôle de l'agrégation plaquettaire. Puisque nos travaux s'intéressent plus spécialement à l'ATPDase retrouvée au niveau des vaisseaux sanguins, et puisque les fonctions de cette enzyme ne peuvent se concevoir que par l'action de ses substrats, nous présenterons les nucléotides extracellulaires tout en portant une attention particulière à ceux présents dans le système vasculaire. Nous décrirons les sources de nucléotides extracellulaires, leurs rôles physiologiques et leurs modes d'actions. Nous présenterons ensuite les différentes ATPDases trouvées à ce jour, leurs fonctions probables et les méthodes utilisées afin de les purifier.

## LES NUCLÉOTIDES EXTRACELLULAIRES

Il est fort surprenant que l'on ait ignoré pendant si longtemps l'importance des nucléotides extracellulaires dans la physiologie de la cellule eucaryote. Ce n'est



en effet qu'au cours des dernières années, que l'on a pris conscience du rôle fascinant joué par ces molécules que l'on croyait exclusivement confinées à l'intérieur des cellules. On découvre non seulement le rôle des nucléotides extracellulaires, mais aussi leur façon de relayer leur message à l'intérieur de la cellule. C'est ainsi qu'on a pu identifier toute une panoplie de récepteurs sur une variété de types cellulaires. La notion de spécificité des ligands de ces récepteurs est importante et bien illustrée dans le cas des plaquettes sanguines. En effet, lorsque ces dernières sont mises en présence d'ADP, on observe une agrégation qui peut être inhibée par son dérivé déphosphorylé, l'adénosine. Les actions des nucléotides peuvent donc varier selon le type de récepteurs retrouvés sur les cellules cibles. Aussi, un même nucléotide peut induire une action inverse, déterminée par la cellule cible. Par exemple, au niveau artériel, l'ATP peut causer soit une vasodilatation ou une vasoconstriction, selon qu'il interagit avec les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses. De nombreuses autres actions des nucléotides sont plus ou moins bien définies; mentionnons des changements de perméabilité de la membrane plasmique, l'induction de sécrétions des glandes endocrines et exocrines, des modifications de la prolifération cellulaire et même des modulations de l'excitation nerveuse. Quoique la majorité des travaux sur les effets des nucléotides extracellulaires aient porté sur l'ATP et ses dérivés, il ne faudrait pas pour autant sous-estimer le rôle potentiel joué par d'autres nucléotides. C'est ainsi que des récepteurs liant la pyrimidine UTP ont été localisés sur différents types cellulaires. Avant d'étudier les fonctions des nucléotides extracellulaires, penchons-nous d'abord sur leur origine.

### **Sources des nucléotides extracellulaires**

Il est difficile de définir des principes généraux concernant l'origine des nucléotides extracellulaires. On sait cependant que la concentration cytosolique de l'ATP est de l'ordre du millimolaire (Gordon, 1986). Une rupture de la membrane plasmique entraîne donc une augmentation significative de la concentration des nucléotides au voisinage des cellules éclatées. Les cellules peuvent également libérer des quantités considérables d'ATP sans qu'il y ait bris cellulaire. Le cas

des cellules qui concentrent les nucléotides dans des grains de sécrétion, libérant leur contenu lors de leur fusion à la membrane plasmique, est bien connu. Cependant, pour les cellules qui ne forment pas de granules, les mécanismes de libération des nucléotides sont encore mal connus. On a récemment suggéré que la glycoprotéine-P, produite par le gène *mdr 1* ("multidrug resistance gene"), serait impliquée dans l'expulsion d'ATP cellulaire (Abraham *et al.*, 1993).

Les sources de nucléotides extracellulaires ont été particulièrement étudiées dans le cas du système circulatoire et du système nerveux (voir pour revue Lüthje, 1989; Dubyak et Fedan, 1990). En conditions normales, la concentration sanguine des nucléotides est inférieure à 0,1 micromolaire (Coade et Pearson, 1989), niveau qui est la résultante de multiples variables comprenant la libération par les cellules, la dégradation par des ectonucléotidases et la capture des nucléotides déphosphorylés par les cellules (Côté *et al.* 1993). Parmi les éléments sanguins, les érythrocytes représentent une source importante d'ATP qui est libérée par l'hypoxie, les forces de cisaillement du flux sanguin, et/ou simplement par leur éclatement (Schmid-Schönenbein *et al.*, 1969; Bergfeld et Forrester, 1992; Ellsworth *et al.*, 1995). Les nucléotides peuvent aussi être sécrétés par les cellules de la paroi des vaisseaux sanguins. En effet, les cellules endothéliales et musculaires lisses peuvent relâcher jusqu'à 60% de leur contenu en ATP, sans que leur viabilité n'en soit affectée. Dans le cas des cellules endothéliales, ce phénomène peut être induit par la thrombine, la trypsine, la chélation du calcium à la surface cellulaire, la noradrénaline et les forces de cisaillement du flux sanguin (Pearson et Gordon, 1979, 1985; Lollar et Owen, 1981; Sedaa *et al.*, 1990; Milner *et al.*, 1990a,b; Ralevic *et al.*, 1992). Quant aux cellules des muscles lisses, elles peuvent libérer de l'ATP suite à une stimulation par la noradrénaline ou par de l'ATP provenant du système nerveux périphérique efférent (Katsuragi *et al.*, 1991; Vizi *et al.*, 1992). Un exercice physique prolongé, ou des conditions d'hypoxie provoquent une sécrétion de nucléotides des cardiomyocytes et des cellules des muscles squelettiques (Forrester et Lind, 1969; Paddle et Burnstock, 1974; Forrester et Williams, 1977; Clemens et Forrester, 1981; Borst et Schrader, 1991). La Figure 1 illustre quelques-unes de ces sources de nucléotides dans le système circulatoire.

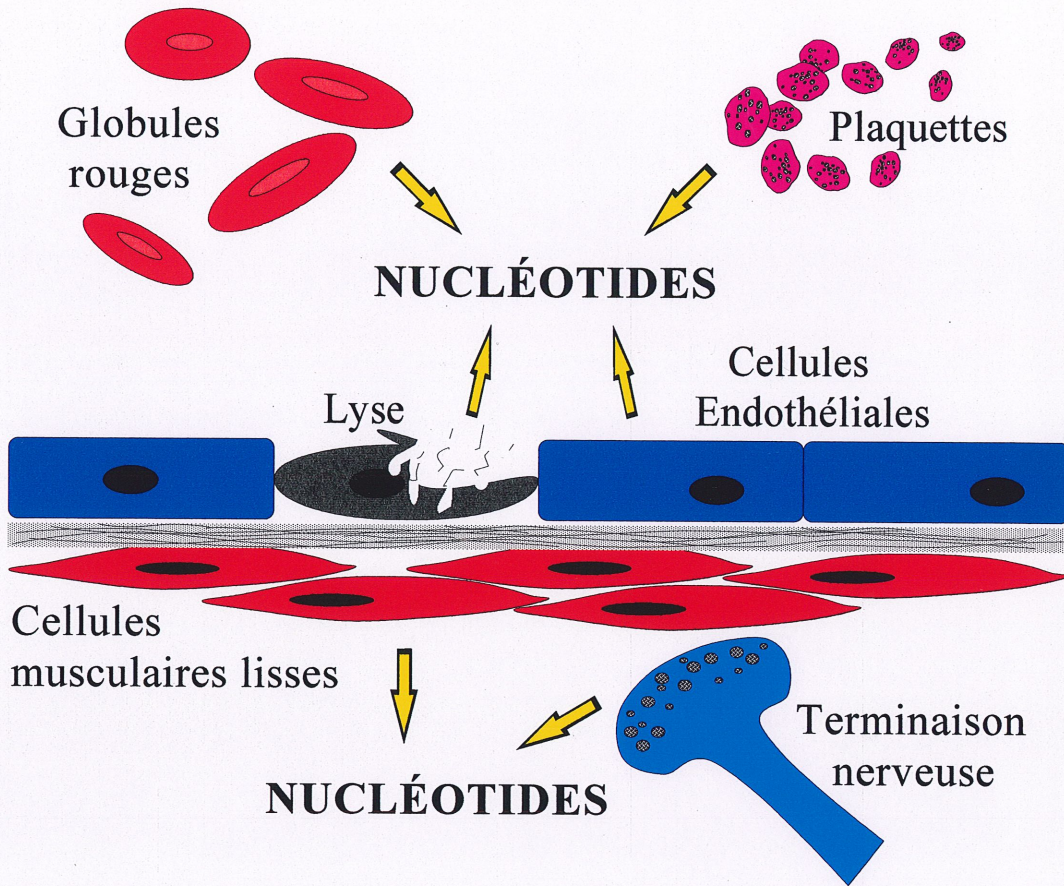


Figure 1. Sources des nucléotides extracellulaires dans le système vasculaire. Les globules rouges, les plaquettes, les cellules endothéliales et musculaires lisses des vaisseaux, de même que les terminaisons nerveuses sont des sources importantes de nucléotides extracellulaires.

Les plaquettes ou thrombocytes représentent une source importante de nucléotides. Dans ce cas particulier, les nucléotides sont concentrés dans les grains de sécrétion appelés corps denses. On y trouve l'ATP, l'ADP, l'UTP ainsi que les dinucléotides Ap<sub>3</sub>A et Ap<sub>4</sub>A (Flodgaard et Klenow, 1982; Lüthje et Ogilvie, 1983). Les concentrations combinées d'ATP et d'ADP y atteignent l'ordre du molaire (D'Souza et Glueck, 1977; Holmsen et Weiss, 1979; Born et Richardson, 1980). Ces nucléotides sont sécrétés par exocytose, comme c'est le cas des cellules nerveuses. Même si le système nerveux libère une quantité totale de nucléotides relativement faible, le fait que la terminaison nerveuse soit localisée à proximité immédiate de la cellule cible lui permet d'exercer une action efficace (Burnstock, 1972; Lloyd et Stone, 1983; White, 1985; Williams, 1990). Les cellules chromaffines de la médullosurrénale possèdent des grains contenant, outre l'adrénaline et l'ATP, des quantités appréciables d'ADP, d'UTP, de GTP et de CTP qui sont déversées par exocytose dans la circulation sanguine (Hillarp, 1958; Burgoyne, 1984; Phillips et Pryde, 1987). Mentionnons en dernier lieu les mastocytes dont les grains d'histamine contiennent aussi de l'ATP (Weil-Malherbe et Bone, 1958; Marquardt *et al.* 1984). Les nucléotides libérés dans l'espace extracellulaire par l'une ou l'autre de ces sources peuvent ensuite exercer une action autocrine ou paracrine par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

### **Les récepteurs de nucléotides et de nucléosides**

Les nucléotides et nucléosides agissent sur la majorité des systèmes de l'organisme et influencent une variété d'effets physiologiques. Par exemple, dans le système circulatoire ils agissent sur le rythme cardiaque, la contractilité du coeur, le tonus vasculaire et l'agrégation plaquettaire (Tableau 1). Les purines agissent par l'intermédiaire de récepteurs que l'on a nommés purinorécepteurs (voir pour revue Burnstock, 1972, 1993; Stone, 1991; Stiles, 1992; Abbracchio *et al.*, 1993; Dubyak et El-Moatassim, 1993; Fredholm *et al.*, 1994; Conigrave et Jiang, 1995; Communi *et al.*, 1996). La nomenclature originale de ces récepteurs les regroupait en deux catégories: P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub>. Les purinorécepteurs P<sub>1</sub> répondent à l'adénosine alors que les purinorécepteurs P<sub>2</sub> sont activés par l'ATP et l'ADP. Les

Tableau 1 Distribution et fonctions des récepteurs de nucléotides et de nucléosides

Tissus/Cellules	Récepteur	Agonistes	Réponses physiologiques
<b>Système circulatoire</b>			
Coeur			
oreillettes	A <sub>1</sub>	ADO	action inotrope négative
	A <sub>3</sub>	ADO	action inotrope négative
ventricules (myocytes)	P <sub>2Y</sub>	ATP	action inotrope négative
	P <sub>2X</sub>	ATP	action inotrope positive
Artères (coronaires, fémorales, mésentériques, aorte...)			
cellules musculaires lisses	A <sub>2</sub>	ADO	vasodilatation
	P <sub>2X</sub>	ATP	vasoconstriction
	P <sub>2U</sub>	UTP et ATP	PGI <sub>2</sub> ↑ et vasodilatation
cellules endothéliales	P <sub>2Y</sub>	ATP	NO, PGI <sub>2</sub> ↑; vasodilatation, agrégation plaquettaire ↓
	P <sub>2U</sub>	UTP et ATP	PGI <sub>2</sub> ↑ et vasodilatation
Cellules sanguines			
plaquettes	A <sub>2</sub>	ADO	agrégation induite par l'ADP ↓
	P <sub>2T</sub>	ADP	agrégation des plaquettes ↑
neutrophiles	P <sub>2U</sub>	UTP et ATP	adhérence ↑
lymphocytes B	P <sub>2</sub>	ATP	activation, prolifération cellulaire ↑
lymphocytes T	P <sub>2Z</sub>	ATP <sup>4-</sup>	perméabilisation ↑
<b>Système digestif</b>			
Estomac	P <sub>2</sub>	ATP	acide ↑
Intestin			
cellules épithéliales	P <sub>2</sub>	ATP	transport ionique (régulation)
muscles lisses	P <sub>2X</sub>	ATP	contraction
Foie			
hépatocytes	A <sub>2</sub>	ADO	glycogénolyse ↑
	P <sub>2Y</sub> et/ou P <sub>2U</sub>	UTP et ATP	glycogénolyse ↑
<b>Système respiratoire</b>			
Poumons			
pneumocytes de type II	A <sub>2</sub>	ADO	surfactants ↑
	P <sub>2Y</sub>	ATP	surfactants ↑
Trachée			
cellules épithéliales	P <sub>2U</sub>	UTP et ATP	secrétion Cl <sup>-</sup> (régulation du canal)
cellules caliciformes	P <sub>2</sub>	ATP	mucine ↑

Tableau 1 Distribution et fonctions des récepteurs de nucléotides et de nucléosides (suite)

Tissus/Cellules	Récepteur	Agonistes	Réponses physiologiques
<b>Système excréteur</b>			
Reins			
région préglomérulaire	A <sub>1</sub>	ADO	vasoconstriction
région postglomérulaire	A <sub>2</sub>	ADO	vasodilatation
macula densa	A <sub>1</sub>	ADO	rénine ↓
	A <sub>2</sub>	ADO	rénine ↑
région corticale	A <sub>1</sub>	ADO	érythropoïétine ↓
	A <sub>2</sub>	ADO	érythropoïétine ↑
tube contourné distal	A <sub>1</sub>	ADO	transport du NaCl ↓
tube collecteur	A <sub>2</sub>	ADO	conductivité hydraulique ↑
cellules épithéliales	P <sub>2</sub>	ATP	transport ionique (régulation)
<b>Système endocrinien</b>			
Pancréas			
cellules A	A <sub>2</sub>	ADO	glucagon ↑
cellules B	P <sub>2Y</sub>	ATP	insuline ↑
cellules D	P <sub>2</sub>	ATP	somatostatine ↑
<b>Autres</b>			
adipocytes	A <sub>1</sub>	ADO	lipolyse ↓
glandes lacrymales	P <sub>2</sub>	ATP <sup>4-</sup>	fluide ↑
fibroblastes	P <sub>2Z</sub>	ATP <sup>4-</sup>	perméabilisation ↑
macrophages	P <sub>2Z</sub>	ATP <sup>4-</sup>	perméabilisation ↑; cytotoxicité ↓;
	et P <sub>2U</sub>	et ATP	phagocytose ↓
mastocytes	P <sub>2Z</sub>	ATP <sup>4-</sup>	histamine ↑
			perméabilisation ↑
terminaisons nerveuses (rec. présynaptiques)	A <sub>1</sub>	ADO	neurotransmetteurs ↓

purinorécepteurs P<sub>1</sub> ont été identifiés, A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>, selon l'affinité d'analogues de l'adénosine et le mode de transduction du signal suite à la liaison de l'agoniste (Tableau 2). En agissant sur les récepteurs A<sub>1</sub>, l'adénosine inhibe l'adénylylcyclase, alors qu'elle la stimule via les récepteurs A<sub>2</sub>. Notons cependant que les récepteurs A<sub>1</sub> n'exercent pas tous une action sur l'adénylylcyclase et que certains d'entre eux agissent par l'intermédiaire d'autres effecteurs. La concentration d'adénosine est un paramètre important puisqu'elle a une affinité supérieure pour

les purinorécepteurs  $A_1$  et peut ainsi les activer à des concentrations de cent à mille fois plus faibles que dans le cas des récepteurs  $A_2$ . Par la suite, l'accumulation de données sur les récepteurs  $P_1$  a révélé que plusieurs de ce ceux-ci arboraient des caractéristiques spécifiques. On a alors reclassifié les récepteurs  $P_1$  en  $A_{1A}$ ,  $A_{1B}$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$  et  $A_4$ . Cette pluralité de récepteurs  $P_1$  montre la complexité de l'interprétation des modes d'action de l'adénosine. Les récepteurs  $P_2$  ont également été subdivisés en plusieurs sous-types:  $P_{2X}$ ,  $P_{2Y}$ ,  $P_{2Z}$ ,  $P_{2T}$  auxquels se sont ajoutés les récepteurs  $P_{2D}$  et  $P_{2U}$  (Tableau 3). À l'origine, on ne distinguait que les sous-types  $P_{2X}$  et  $P_{2Y}$  par leurs actions sur le tonus vasculaire. La liaison d'ATP aux récepteurs  $P_{2X}$  causait une vasoconstriction, alors que sur les  $P_{2Y}$  elle induisait une vasodilatation. On les distingue maintenant plus clairement depuis que l'on a comparé le potentiel pharmacologique d'une série d'analogues de l'ATP (Tableau 3). Il faut noter que l'activation des purinorécepteurs  $P_{2Y}$  déclenche une variété d'effets physiologiques qui sont déterminés par la cellule qui l'exprime (Tableau 1). Le troisième sous-type, le purinorécepteur  $P_{2Z}$ , est sensible à la forme tétra-anionique de l'ATP ( $ATP^{4-}$ ) et son activation augmente la perméabilité de cellules tels les mastocytes, les macrophages et les fibroblastes, allant même jusqu'à causer la mort cellulaire. Le quatrième sous-type, le purinorécepteur  $P_{2T}$ , est localisé exclusivement sur les plaquettes sanguines et est activé

Tableau 2 Classification des récepteurs de nucléosides

Récepteur	Agonistes préférentiels	Système effecteur
$A_1$	CCPA > CPA > NECA >> CGS 21680	-adénylylcyclase ↓ (via protéine $G_i$ )
$A_{2A}$	CGS 21680 ≥ NECA > CV 1808 > R-PIA > CPA	-adénylylcyclase ↑ (via protéine $G_s$ )
$A_{2B}$	NECA	-adénylylcyclase ↑ (via protéine $G_s$ )
$A_3$	APNEA > R-PIA = NECA >> CGS 21680	-adénylylcyclase ↓ (via protéine $G$ )

Tableau 3 Classification des récepteurs de nucléotides

Récepteur	Agonistes préférentiels	Systèmes effecteurs
P <sub>2X</sub>	APPCP ≥ APCPP ≥ ATP = ADP ≥ 2-MeSATP > AMP	-Ca <sup>2+</sup> intracellulaire ↑ (via un canal ionique intrinsèque) -dépolarisation de la membrane
P <sub>2Y</sub>	2-MeSATP > ATP <sub>γ</sub> S > ATP = ADP >> APCPP = APPCP = UTP	-PLC ↑ (via protéine G) -Ca <sup>2+</sup> intracellulaire ↑ -autres phospholipases ↑
P <sub>2Z</sub>	ATP <sup>4-</sup> ; BzATP > ATP = ATP <sub>γ</sub> S >>> ADP	-Ca <sup>2+</sup> intracellulaire ↑ -dépolarisation de la membrane -ouverture d'un pore non-sélectif
P <sub>2T</sub>	2-MeSADP > ADP	-PLC ↑ (via protéine G) -Ca <sup>2+</sup> intracellulaire ↑
P <sub>2D</sub>	Ap <sub>4</sub> A > ADPβS > APPNP > Ap <sub>5</sub> A > APCPP >> 2-MeSATP	-PLC ↑ (via protéine G ?) -Ca <sup>2+</sup> intracellulaire ↑
P <sub>2U</sub>	UTP ≥ ATP = ATP <sub>γ</sub> S > ADP > 2-MeSATP > APCPP = APPCP	-PLC ↑ (via protéine G) -Ca <sup>2+</sup> intracellulaire ↑ -autres phospholipases ↑

par l'ADP et non par l'ATP. Il représente ainsi une exception à la règle voulant que les purinorécepteurs P<sub>2</sub> répondent à l'ATP et à l'ADP. Comme nous le verrons par la suite, l'activation de ce récepteur entraîne l'agrégation des plaquettes. Un nouveau sous-type de purinorécepteurs, nommé P<sub>2D</sub>, peut lier le dinucléotide Ap<sub>4</sub>A et serait impliqué dans la libération de neurotransmetteurs (Hilderman *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 1992). Un dernier type de récepteur de nucléotide pose certains problèmes quant à sa classification. Ce récepteur nommé P<sub>2U</sub> lie la pyrimidine UTP, ainsi que l'ATP (Seifert et Schultz, 1989; O'Connor, 1992). Il



peut donc plus difficilement être classé parmi les récepteurs purinergiques. C'est pourquoi certains préfèrent le nommer récepteur de nucléotides. La présence de ce récepteur a été démontré dans l'endothélium vasculaire et dans l'épithélium respiratoire. L'activation du récepteur P<sub>2U</sub> des cellules endothéliales provoque une vasodilatation, causée par la libération de prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et d'oxyde nitrique (NO), alors que l'activation de ce récepteur à la surface des cellules épithéliales cause la sécrétion d'ions chlorures (Communi *et al.*, 1996). On distingue le récepteur P<sub>2U</sub> des purinorécepteurs P<sub>2X</sub> et P<sub>2Y</sub> par sa sensibilité élevée et équivalente à l'ATP et à l'UTP, et par sa faible affinité pour l'APCPP et le 2-MeSATP (Tableau 3).

L'analyse des données de la littérature montre bien que les récepteurs de nucléotides et de nucléosides demeurent encore mal définis. Comme nous avons pu le constater, la classification des purinorécepteurs P<sub>2</sub> précédente est basée exclusivement sur des informations pharmacologiques. Une meilleure classification s'établira à mesure que nous y ajouterons des informations de structure. Ce n'est que depuis le début des années 90 que la biologie moléculaire a fait irruption dans le domaine des purinorécepteurs. Les premiers gènes de récepteurs P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> ont été clonés respectivement en 1990 et 1993. Depuis, on a pu assister à une explosion dans ce champ de recherche. Toute une panoplie de gènes de ces récepteurs ont été clonés (voir pour revue Fredholm *et al.*, 1994; Communi *et al.*, 1996). La nomenclature des récepteurs P<sub>1</sub> est déjà assez bien établie. Par contre, il faudra s'attendre à des changements importants dans la nomenclature, la classification et le dénombrement des purinorécepteurs P<sub>2</sub>. L'analyse des séquences de plusieurs récepteurs P<sub>2U</sub>, P<sub>2X</sub> et P<sub>2Y</sub> a révélé de nombreuses informations et a permis de faire de nouvelles associations entre ces récepteurs. On sait maintenant que les récepteurs P<sub>2U</sub> et P<sub>2Y</sub> appartiennent à la superfamille des récepteurs heptahélicoïdaux couplés aux protéines G, et activent la phospholipase C. Déjà, l'ADNc de trois sous-types de récepteurs P<sub>2X</sub> ont été clonés, et curieusement, ils montrent une architecture très différente de celle d'autres récepteurs possédant une activité intrinsèque de canal ionique. En revanche, ils montrent une analogie de structure avec certains canaux potassium et sodium. Une réorganisation complète de la classification des purinorécepteurs P<sub>2</sub>

propose la dénomination P2X pour désigner les récepteurs possédant une activité intrinsèque de canal cationique, et de nommer P2Y les récepteurs heptahéli-coïdaux couplés aux protéines G; les récepteurs P<sub>2Y</sub> et P<sub>2U</sub> seront alors rebaptisés respectivement P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>2</sub>. Les purinorécepteurs P<sub>2T</sub> et P<sub>2Z</sub> trouveront leur place dans cette nouvelle classification lorsque leur ADNc respectif aura été cloné. On prévoit d'ailleurs beaucoup d'autres informations au fur et à mesure que le clonage de l'ADNc de ces récepteurs progressera. Différentes stratégies de clonage par homologie ont déjà permis d'identifier de nouveaux sous-types de récepteurs P2Y, qui n'ont pas d'équivalent dans la classification pharmacologique. Parmi ces derniers, on en trouve un qui se comporte comme un vrai récepteur pyrimidinergique puisque l'ATP ne le reconnaît pas (Communi *et al.*, 1995; Boehm *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 1996).

L'omniprésence des récepteurs de nucléotides et de nucléosides dans les divers systèmes est donc établie (Tableau 1). On retrouve même plusieurs types de récepteurs à proximité les uns des autres, soit sur une même cellule et/ou sur des cellules voisines, ce qui permet vraisemblablement un contrôle étroit de certaines fonctions cellulaires: (1) selon le type de récepteur, sa densité et la réceptivité de la cellule, et (2) selon le type de nucléotide, sa concentration et son affinité pour les récepteurs. Le système circulatoire peut servir d'exemple (Tableau 1). Évidemment, la diversité de récepteurs rend plus difficile la tâche de définir le rôle spécifique joué par chacun d'eux, d'autant plus que les ligands sont exposés à l'action d'ectonucléotidases, comme nous le verrons par la suite. Il est aussi possible que certains nucléotides puissent exercer leur action directement, sans passer par la liaison à des récepteurs spécifiques. Par exemple, l'ATP extra-cellulaire est utilisé comme substrat par des protéines kinases que l'on retrouve à la surface de plusieurs types cellulaires (Kübler *et al.*, 1982; Kinzel *et al.*, 1986; Myers et Kang, 1990; Piroton *et al.*, 1992).

## Fonctions des nucléotides extracellulaires

On découvre chaque jour de nouvelles fonctions aux nucléotides extracellulaires et il serait présomptueux de prétendre couvrir toute la littérature qui traite de la question. Nous limiterons notre analyse à certains systèmes qui ont fait l'objet d'études plus élaborées tels que le système respiratoire, le système nerveux et le système circulatoire. Nous traiterons également de quelques phénomènes cellulaires influencés par les nucléotides.

Dans le système respiratoire, l'ATP extracellulaire est l'agent le plus puissant pour stimuler la sécrétion du surfactant par les pneumocytes de type II (Rice et Singleton, 1986; Gilfillan et Rooney, 1988; Rooney, 1989; Rice, 1990). Les cellules alvéolaires portent également des récepteurs de type P<sub>1</sub>; via les récepteurs A<sub>1</sub>, l'adénosine inhibe la sécrétion de surfactant alors que via les récepteurs A<sub>2</sub> elle la stimule (Tio *et al.*, 1990; Griese *et al.*, 1991). Au niveau des voies aériennes, l'ATP et l'adénosine stimulent la libération de mucine par les cellules caliciformes et les glandes à mucus (Kim et Lee, 1991; Davis *et al.*, 1992). L'ATP, l'UTP et l'adénosine contrôlent aussi l'évacuation du mucus en maintenant sa fluidité par la sécrétion de chlore et d'eau, et en agissant sur la fréquence des battements ciliaires (Pratt *et al.*, 1986; Mason *et al.*, 1991; Knowles *et al.*, 1991; Stutts *et al.*, 1992; Saavedra et Renaud, 1975; Tamaoki *et al.*, 1989). L'ATP, l'ADP et l'adénosine agissent sur le tonus des muscles lisses de la trachée, et présumément tout le long de l'arbre trachéo-bronchial, causant une relaxation (Bennett et Drury, 1931; Farmer et Farrar, 1976). On soupçonne que c'est l'adénosine qui serait responsable de cette relaxation puisque certains indices suggèrent que l'ATP et l'ADP sont d'abord hydrolysés en adénosine avant d'induire leur action (Farmer et Farrar, 1976; Christie et Satchell, 1980; Holgate *et al.*, 1990). D'autres études montrent d'ailleurs que l'ATP provoque une réponse biphasique caractérisée par une contraction initiale de courte durée, suivie d'une relaxation concentration-dépendante (Jones *et al.*, 1980; Lundblad *et al.*, 1984).

Les actions des nucléotides extracellulaires sur le système nerveux et le système circulatoire ont été beaucoup plus étudiées. Burnstock et collaborateurs furent les premiers à proposer l'existence d'une transmission nerveuse dépendante de l'ATP. Ils l'ont appelée "transmission nerveuse purinergique" (Burnstock *et al.* 1966, 1970; Burnstock 1971, 1972). L'ATP est libéré des fibres nerveuses non-adrénergiques non-cholinergiques, adrénergiques, et cholinergiques (Sneddon et Burnstock, 1984; Burnstock, 1990b; Dubyak et Fedan, 1990). Comme ces fibres nerveuses sont omniprésentes dans l'organisme, on peut difficilement imaginer tout le spectre des actions de ces "neurotransmetteurs". Dans le système nerveux central, l'ATP ferait même partie des transmetteurs rapides de l'influx nerveux entre les neurones, rejoignant ainsi le rang jusqu'alors exclusif du glutamate, de l'acétylcholine et de la sérotonine (Edwards *et al.*, 1992; Evans *et al.*, 1992). Quant à la présence de purinorécepteurs A<sub>1</sub> aux extrémités des axones, elle semble indiquer que le produit d'hydrolyse de l'ATP exerce une rétroaction en inhibant la libération additionnelle de neurotransmetteurs (Scholz et Miller, 1991).

L'intérêt pour les nucléotides extracellulaires dans le système cardiovasculaire prend ses racines dans les travaux de Drury et Szent-Györgyi en 1929. Les effets de l'adénosine qu'ils avaient alors observés sont toujours d'actualité. Les effets électrophysiologiques de l'adénosine et de l'ATP sur le coeur des mammifères ont fait l'objet de revues récentes (Olsson et Pearson, 1990; Vassort *et al.*, 1993; Belardinelli *et al.*, 1995). L'adénosine et les nucléotides adényliques agissent sur les vaisseaux coronaires, le noeud sino-auriculaire ("pace maker") et les cellules conductrices, ainsi que sur les fibres musculaires striées cardiaques. L'adénosine et l'ATP causent le ralentissement des battements cardiaques (effet chronotrope négatif) en agissant sur les noeuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire, entraînant respectivement la bradycardie et le blocage cardiaque. On croit que cet effet chronotrope négatif induit par l'ATP serait dû à son hydrolyse rapide en adénosine par des ectonucléotidases. L'adénosine ainsi que l'ATP à des concentrations plus élevées, peuvent causer un blocage de la conduction auriculo-ventriculaire des impulsions (effet dromotrope négatif) en diminuant sélectivement le potentiel d'action de la région nodale. L'adénosine et les nucléotides adényliques exercent une diminution de la force de contraction musculaire des oreillettes (effet

inotrope négatif) (Belardinelli *et al.*, 1989). Cependant, d'autres études ont rapporté que l'ATP induisait une action inotrope positive sur des préparations de ventricules. Quant aux effets des nucléotides sur les artères coronaires, il s'avère que l'adénosine est un puissant vasodilatateur (Berne, 1963, 1980) alors que l'ATP peut induire soit une vasodilatation ou une vasoconstriction coronarienne, selon son site d'action (voir plus loin). Les actions de l'adénosine, énumérées plus haut, lui permettent de jouer un rôle protecteur sur le coeur, particulièrement dans des conditions ischémiques, c'est-à-dire: en atténuant la force de contraction et le rythme cardiaque, elle diminue la demande en oxygène des cellules; et par la dilatation coronarienne, elle augmente sa disponibilité.

Dans les vaisseaux sanguins, l'ATP et l'ADP peuvent provoquer soit une vasoconstriction, soit une vasodilatation, selon la cellule cible et les récepteurs impliqués. La Figure 2 résume les effets des nucléotides adényliques sur le tonus artériel. L'ATP et/ou l'ADP, en reconnaissant les récepteurs  $P_{2Y}$  à la surface des cellules endothéliales, causent une vasodilatation (Kennedy *et al.*, 1985). Cette vasodilatation est le résultat final d'une cascade de réactions cellulaires initiées par la liaison du nucléotide au récepteur, l'activation de la phospholipase C via une protéine G, l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol diphosphate ( $PIP_2$ ) en inositol 1,4,5 triphosphate ( $IP_3$ ) et la libération du calcium du réticulum endoplasmique. L'augmentation de calcium intracellulaire cause: (1) la production de  $PGI_2$ , suite à l'hydrolyse de l'acide arachidonique des phospholipides par une phospholipase A<sub>2</sub>; (2) l'activation de l'oxyde nitrique synthétase (NOS); (3) la libération de "Endothelium Derived Hyperpolarising Factor" (EDHF). La NOS produit du NO et/ou un radical d'oxyde nitrique (R-NO) à partir d'arginine. Le NO, originalement appelé "Endothelium derived relaxing factor" (EDRF), la  $PGI_2$  ainsi que l'EDHF induisent une relaxation des muscles lisses en activant différentes voies métaboliques de ces cellules: le NO induit une augmentation de GMP cyclique (GMPc), la  $PGI_2$  provoque une augmentation d'AMP cyclique (AMPc) et l'EDHF causerait la libération d'ions potassium. Il est clair que le NO et la  $PGI_2$  sont impliqués *in vivo* dans la vasodilatation alors que cette action induite par l'EDHF n'est pas aussi certaine (DeMey et Vanhoutte, 1981; Needham *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987, 1988; Moncada *et al.*, 1988; Sauvé *et al.*, 1988). Lorsque l'ATP et/ou l'ADP se

fixent aux récepteurs  $P_{2X}$  des cellules musculaires lisses, ils induisent une vasoconstriction précédée d'une accumulation de calcium intracellulaire (Kennedy *et al.*, 1985). Ces mêmes cellules portent aussi des récepteurs de type  $A_2$  qui répondent à l'adénosine par une vasodilatation dépendante de l'AMPc. Pour une revue plus exhaustive sur les purinorécepteurs et leurs effets au niveau des vaisseaux sanguins, nous invitons le lecteur à se référer aux articles de Boeynaems et Pearson (1990), de Harrison (1992), de Sévigny et Beaudoin (1994), ainsi que de Motte *et al.* (1995).

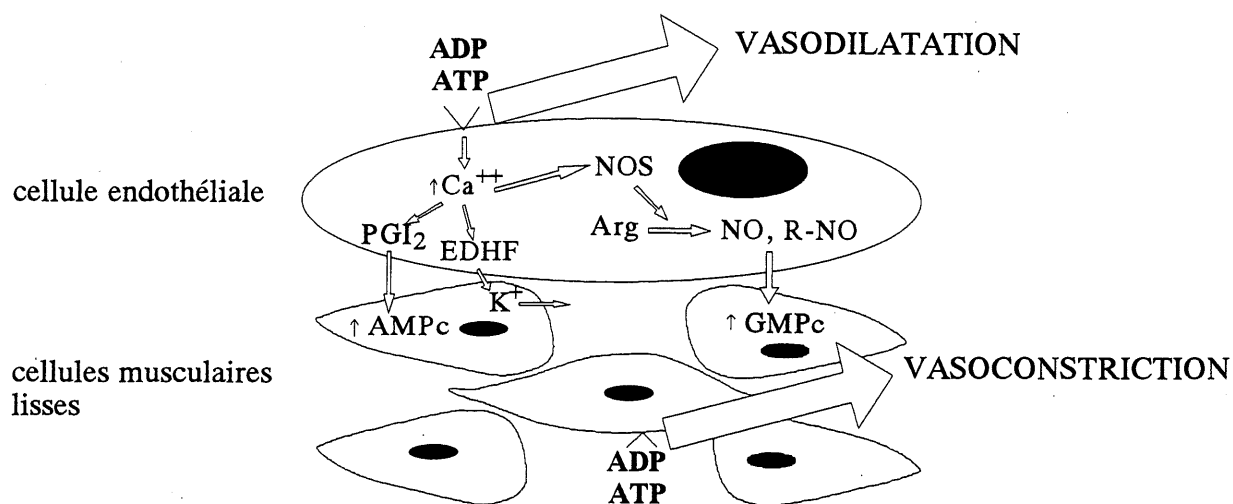


Figure 2. **Le contrôle du tonus vasculaire par les nucléotides.** Lorsque les nucléotides ATP et/ou ADP, circulant dans le sang, se fixent aux purinorécepteurs  $P_{2Y}$ , à la surface des cellules endothéliales, ils produisent une vasodilatation. Cette vasodilatation est essentiellement due à la formation d'oxyde nitrique. Par contre, lorsque l'ATP et/ou l'ADP se fixent aux purinorécepteurs  $P_{2X}$ , présents sur les cellules musculaires lisses, ils induisent une vasoconstriction.

Les effets des nucléotides exercés au niveau de l'agrégation plaquettaire constituent une autre de leurs actions importantes sur le système circulatoire. L'ADP est responsable d'une voie principale d'activation et de la cascade d'événements qui aboutissent à l'agrégation (Born, 1962; Colman, 1990; Gachet et Cazenave, 1991; Marcus, 1996). La liaison de l'ADP à son purinorécepteur  $P_{2T}$ , se traduit,

dans l'ordre, par le changement de forme des plaquettes, l'augmentation du calcium intracellulaire, la libération du contenu des grains  $\alpha$  et des corps denses et, finalement, l'agrégation. L'ADP cause aussi une diminution de l'AMPc intracellulaire. L'exocytose des corps denses, contenant une forte concentration d'ADP, déclenche une réaction autocatalytique qui accélère le processus et conduit à une agrégation massive. Le purinorécepteur  $P_{2T}$  est exclusif aux plaquettes et à la cellule dont elles dérivent, le mégacaryocyte. C'est le seul purinorécepteur connu jusqu'à présent qui réponde de façon différente à l'ADP et à l'ATP, ce dernier étant un inhibiteur compétitif de l'ADP. L'adénosine inhibe aussi l'agrégation plaquettaire mais en se liant à des récepteurs  $A_2$ .

Les effets de l'ADP sur l'agrégation plaquettaire illustrent bien l'un des mécanismes d'action des nucléotides sur un grand nombre de cellules sécrétrices. En effet, comme beaucoup d'hormones et de neurotransmetteurs, les nucléotides peuvent mobiliser le calcium intracellulaire par l'intermédiaire de leurs récepteurs, en activant la phospholipase C qui convertit le  $PIP_2$  en  $IP_3$  et en diacylglycérol (DAG) (Tableau 3). Toute une panoplie de cellules endocrines et exocrines, à travers l'organisme, répondent à l'ATP et à l'UTP selon des mécanismes semblables (El-Moatassim *et al.*, 1992). Mentionnons les pneumocytes, les cellules caliciformes, les cellules chromaffines des médullosurrénales, les cellules A, B, D du pancréas endocrine, les cellules de la thyroïde, de la parotide et les cellules acineuses lacrymales qui répondent soit à l'ATP, à l'UTP ou à l'adénosine (Tableau 1).

Pour une étude plus détaillée du rôle de l'ATP sur une variété de cellules, dont la modification de la perméabilité cellulaire, la prolifération cellulaire et l'inflammation, le lecteur est invité à consulter les revues récentes de El-Moatassim *et al.* (1992), de Dubyak et El-Moatassim (1993), de Burnstock (1993), de Bakker *et al.* (1994), l'ouvrage de G.R. Dubyak et J.S. Fedan (1990) ainsi que l'article de Lemmens *et al.* (1996).

## LES ECTONUCLÉOTIDASES

Comme nous l'avons signalé, la stimulation d'une cellule par les nucléotides dépend, entre autres, de la nature de ce nucléotide, de sa concentration et de son affinité pour son récepteur. L'un des plus importants paramètres à considérer, lors de l'évaluation de l'effet physiologique d'un nucléotide sur les cellules cibles, sera la capacité de ces cellules à les hydrolyser. À l'origine de ce travail, on connaissait la présence d'activités ATPasiques et ADPasiques à la surface des cellules eucaryotes. On savait également que non seulement l'ATP et l'ADP, mais d'autres nucléotides étaient hydrolysés par des enzymes de surface appelées ectonucléotidases. Dans ce groupe d'enzymes, la 5'-nucléotidase qui convertit l'AMP en adénosine est incluse et a très bien été caractérisée (Luzio *et al.*, 1986; Zimmermann, 1992). Les évidences portaient à croire que deux enzymes distinctes étaient responsables de l'hydrolyse successive des groupements  $\gamma$  et  $\beta$  phosphate des triphospho- et diphosphonucléosides pour produire le dérivé monophosphate. Ce concept doit être remis en question puisque des études récentes ont mis en évidence des enzymes capables de produire l'hydrolyse séquentielle de ces deux phosphates. Ces enzymes sont appelées apyrases ou ATP diphosphohydrolases (ATPDases).

### Les ATP diphosphohydrolases

#### *Caractéristiques et sources des ATP diphosphohydrolases*

C'est Kalckar qui, en 1944, fut le premier à démontrer l'existence d'une enzyme, extraite de la pomme de terre, capable d'hydrolyser l'ATP, l'ADP et l'ITP, en libérant comme produit final le monophosphonucléoside respectif, et des molécules de  $P_i$ . Meyerhof, un an plus tard, proposa le nom apyrase ou ATPDase (EC 3.6.1.5). Depuis, ces enzymes ont été démontrées chez d'autres plantes, divers invertébrés et dans de nombreux tissus des mammifères. Les ATPDases catalysent l'hydrolyse séquentielle des liaisons phosphates  $\gamma$  et  $\beta$  des triphospho- (ex. ATP)



et diphosphonucléosides (ex. ADP) mais sont incapables d'hydrolyser les liaisons phosphates  $\alpha$  (ex. AMP). Les ATPDases sont généralement dépendantes, sinon activées, par les ions divalents calcium et/ou magnésium. Elles ne sont pas inhibées par le vanadate (un inhibiteur des ATPases des canaux ioniques), l'oligomycine (un inhibiteur des ATPases de type F1), ou la ouabaïne (un inhibiteur des  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPases), mais sont sensibles à de fortes concentrations de fluorure et d'azidure de sodium (Plesner, 1995; Beaudoin *et al.*, 1996).

Les ATPDases furent initialement caractérisées chez les plantes, sous deux formes: solubles et attachées à la membrane. Le Tableau 4 rassemble quelques propriétés biochimiques des ATPDases de plantes, décrites jusqu'à maintenant dans la littérature. La présence d'ATPDases solubles a aussi été rapportée plus tard chez les bactéries (Curdova *et al.*, 1982; Trilisenko *et al.*, 1987; Bhargava *et al.*, 1995). On retrouve également ces enzymes chez des insectes et autres arthropodes hématophages dont la sangsue médicinale, ainsi que chez le ver *Schistosoma mansoni* (Ribeiro, 1987; Law *et al.*, 1992; Beaudoin *et al.*, 1996) (Tableau 5).

Chez les vertébrés, une ATPDase a d'abord été trouvée dans la membrane des grains de sécrétion des cellules acineuses du pancréas exocrine de porc (LeBel *et al.*, 1980; Laliberté *et al.*, 1982). Bien qu'on ait obtenu un haut degré de purification de cette enzyme et défini ses propriétés cinétiques, on n'a pas réussi à lui assigner une fonction précise (Laliberté *et al.*, 1982; Laliberté et Beaudoin, 1983). On a rapporté par la suite d'autres activités ATPDasiques chez plusieurs espèces et dans une variété d'organes (Tableau 6). Aussi, de nombreuses activités ecto-ATPasiques ont été mises en évidence, sans que l'activité ADPasique n'ait été mesurée (Beaudoin *et al.*, 1996). De même, des activités ADPasiques ont été observées sans que l'activité ATPasique n'ait été vérifiée (Wattiaux-De Coninck et Wattiaux, 1969; Lieberman *et al.*, 1982; Leake *et al.*, 1983; Bakker *et al.*, 1987; O'Brien *et al.*, 1987; Beaudoin *et al.*, 1996). Il est donc souvent difficile de déterminer si les résultats sont attribuables à des ATPases, des ADPases ou à des ATPDases. Cependant, parmi toutes les descriptions d'activités ecto-ADPasiques

Tableau 4. Propriétés biochimiques des ATP diphosphohydrolases de plantes

Source d'ATPDase	pH optimum (substrat)	$K_{m,app}$ ( $\mu$ M)		$M_r$ (kDa)	Ratio ATP/ADP
		ATP	ADP		
<b>Tubercule de pomme de terre</b>					
<i>Solanum tuberosum</i>					
variété Pimpernel [1,2] <sup>†</sup> (ATPDase soluble)	6,0 (ATP) 8,0 (ADP)	60	250	49 <sup>□</sup>	10-12 <sup>‡</sup>
variété Desirée [1] (ATPDase soluble)	6,0 (ATP & ADP)	25	100	48-49 <sup>□</sup>	1,0
variété Desirée [3] (ATPDase particulaire)	6,0 (ATP & ADP)	28	26	52 <sup>□</sup>	0,9
<b>Feuilles de chou</b>					
ATPDase soluble [4]	5,0				~1,4
ATPDase particulaire [4]	8,7				~2,5
<b>Racines de pois chiche</b>					
<i>Cicer arietinum</i> [5]	6,5 (ATP & ADP)	200	500	50 <sup>§</sup> 55 <sup>□</sup>	0,5
<b>Tige de pois</b>					
variété Alaska [6]	6,0 (ATP) 7,0 (ADP)	70-80	21-35	30 & 48 <sup>§</sup> 70-80 <sup>□</sup>	0,7
<b>Pulvinius</b>					
<i>Mimosa pudica</i> [7]					0,1-0,2
<b>Cotylédons de Lupin jaune</b>					
<i>Lupinus luteus</i> [8] variété Topaz	6-8	~20	~20	51 <sup>§</sup> ~51 <sup>□</sup>	~1,3

† 1: Kettlun *et al.*, 1982; 2: Del Campo *et al.*, 1977; 3: Valenzuela *et al.*, 1989; 4: Mazelis, 1959; 5: Vara et Serrano, 1981; 6: Tognoli et Marrè, 1981; 7: Ishikawa *et al.*, 1984; 8: Guranowski *et al.*, 1991.

‡ Le ratio de l'hydrolyse de l'ATP/ADP peut être influencé par le tampon d'incubation.

□ Masse moléculaire estimée par filtration.

§ Masse moléculaire estimée par SDS-PAGE.

Tableau 5. Propriétés biochimiques des ATP diphosphohydrolases d'invertébrés

Source d'ATPDase	pH optimum (substrat)	$K_{m,app}$ ( $\mu$ M)		$M_r$ (kDa)	Ratio ATP/ADP
		ATP	ADP		
<b>Punaise</b>					
<i>Rhodnius prolixus</i> [1,2,3] <sup>†</sup> (salive & glande salivaire)	7,5-8,5 (ATP & ADP)	- 229	500 291	83 <sup>□</sup>	1,7-1,8 <sup>‡</sup>
<b>Punaise de lit</b>					
<i>Cimex lectularius</i> [4] (glande salivaire)	8,5 (ATP & ADP)			80 & 21 <sup>#</sup>	
<b>Puces</b>					
<i>Orchopea howardii</i> [11] (glande salivaire)	7,0-8,5 (ATP & ADP)				1,1
<i>Oropsylla bacchi</i> [11] (glande salivaire)	7,0-8,5 (ATP & ADP)				1,2
<i>Xenopsylla cheopis</i> [11] (glande salivaire)	7,0-8,0 (ATP & ADP)				1,8
<b>Tiques</b>					
<i>Ixodes dammini</i> [12] (salive)	8,5-9,0 (ATP & ADP)				1,1
<i>Ornithodoros Moubata</i> [13] (salive)	7,0 (ADP) 8,0 (ATP)				1,3
<b>Mouches des sables</b>					
<i>Lutzomyia longipalpis</i> [7] (glande salivaire)	8,0 (ATP & ADP)				0,6
<i>Phlebotomus papatasi</i> [8] (glande salivaire)	7,0-8,5 (ATP & ADP)				0,8
<i>Phlebotomus argentipes</i> [8] (glande salivaire)	8,5 (ADP) 7,5-9,0 (ATP)				1,0
<i>Phlebotomus perniciosus</i> [8] (glande salivaire)	8,0-8,5 (ATP) 7,0-8,0 (ADP)				0,8-1,3
<b>Mouche noire</b>					
<i>Simulium vittatum</i> [9,10] (glande salivaire)	8,0 (ATP & ADP)				0,6

Tableau 5. Propriétés biochimiques des ATP diphosphohydrolases d'invertébrés (suite)

Source d'ATPDase	pH optimum (substrat)	$K_{m,app}$ ( $\mu$ M)		$M_r$ (kDa)	Ratio ATP/ADP
		ATP	ADP		
<b>Moustiques</b>					
<i>Aedes aegypti</i> [5] (glande salivaire)	9,0 (ATP & ADP)			65 <sup>‡</sup>	1,4
<i>Anopheles freeborni</i> [6] (glande salivaire)	9,0				1,3
<i>Anopheles stephensi</i> [6] (glande salivaire)	9,0				1,8
<i>A. sp. nr. salbati</i> [6] (glande salivaire)	9,0				1,4
<b>Sangsue</b>					
<i>Hirudo medicinalis</i> [14] (salive)	7,5 (ATP & ADP)			forme I: >400 forme II: 45 <sup>‡</sup>	~1,3
<b>Ver</b>					
<i>Schistosoma mansoni</i> [15,16] (tegument)		~450	~250	49-58 <sup>§</sup> 63 <sup>¶</sup>	1,1
<b>Autre</b>					
<i>Culicoides variipennis</i> [17] (glande salivaire)	8,5 (ATP & ADP)			35 <sup>#</sup>	1,3 (avec Mg <sup>++</sup> ) 1,6 (avec Ca <sup>++</sup> )

† 1: Ribeiro et Garcia, 1980; 2: Smith *et al.*, 1980; 3: Sarkis *et al.*, 1986; 4: Valenzuela *et al.*, 1996a; 5: Ribeiro *et al.*, 1984a; 6: Ribeiro *et al.*, 1985a; 7: Ribeiro *et al.*, 1986; 8: Ribeiro *et al.*, 1989; 9,10: Cupp *et al.*, 1993, 1995; 11: Ribeiro *et al.*, 1990; 12: Ribeiro *et al.*, 1985b; 13: Ribeiro *et al.*, 1991; 14: Rigbi *et al.*, 1987; 15,16: Vasconcelos *et al.*, 1993, 1996; 17: Pérez de León et Tabachnick, 1996.

‡ Le ratio de l'hydrolyse de l'ATP/ADP peut être influencé par le tampon d'incubation.

‡ Masse moléculaire estimée par filtration.

§ Masse moléculaire estimée par SDS-PAGE.

¶ Masse moléculaire estimée par SDS-PAGE et immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre l'ATPDase de la pomme de terre et contre la nucléoside triphosphate hydrolase de *Toxoplasma gondii*.

# Masse moléculaire estimée par tamissage moléculaire en HPLC.

Tableau 6. Propriétés biochimiques des ATP diphosphohydrolases de vertébrés

Source d'ATPDase	pH optimum (substrat)	$K_{m,app}$ ( $\mu$ M)		$M_r$ (kDa)	Ratio ATP/ADP
		ATP	ADP		
<b>Porc</b>					
pancréas [1-4] <sup>†</sup>	8,0 (ATP)	7,3 [1]	7,4 [1]	132 ± 19*	1,1 <sup>‡</sup>
	9,0 (ADP)	3,1 [3]	5,6 [3]		
<b>Boeuf</b>					
aorte [4-9]	7,5	23 ± 3 [6]	-	110 <sup>§</sup>	1,1
	(ATP & ADP)	14 ± 1 [9]	12 ± 2 [9]	189 ± 30*	
rate [10]	7,5-8,0 (ATP)		9	100 <sup>§</sup>	1,0
	8,0-8,5 (ADP)				
poumon [11]	7,5	7 ± 2		70 ± 3*	1,4
	(ATP & ADP)				
muscles lisses de la trachée [12]	7,3	15 ± 2		71 ± 5*	1,5
	(ATP & ADP)				
<b>Homme</b>					
vaisseaux ombilicaux [13]				75 <sup>§</sup>	1,1
placenta [14,15]	7,0-7,5 (ATP)	10	20	62*	1,1
	7,5-8,0 (ADP)			82 <sup>§</sup>	
<b>Rat</b>					
placenta [16]	8,0	50	33	67 <sup>‡</sup>	1,1
	(ATP & ADP)				
glandes salivaires [17]	8,0 (ATP)	13	15		1,0
	9,0 (ADP)				
glandes mammaires [17-19]	8,0 (ATP)	12	16		0,9 [17]
	9,0 (ADP)				1,3 [18]
utérus [17,18]	8,0 (ATP)	12	27	67 <sup>‡</sup>	1,4
	9,0 (ADP)				1,5
reins [20,21]	8,0	15	21	66*	0,6 [20]
	(ATP & ADP)				0,9 [21]

Tableau 6. Propriétés biochimiques des ATP diphosphohydrolases de vertébrés (suite)

Source d'ATPDase	pH optimum (substrat)	$K_{m,app}$ ( $\mu$ M)		$M_r$ (kDa)	Ratio ATP/ADP
		ATP	ADP		
<b>Rat (suite)</b>					
synaptosome de l'hypo- thalamus [22]	8,0 (ATP & ADP)				3,7-5,6
synaptosome du cortex cérébrale 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
<b>Raie <i>Torpedo marmorata</i></b>					
synaptosome de l'organe électrique [25]	7,5-8,0 (ATP & ADP)	117 $\pm$ 11	123 $\pm$ 14		1,4
<b>Poulet</b>					
foie [26,27]				85 <sup>§</sup>	~4
oviducte [26-28]	8,0 (ATP) 6,0 (ADP)	480	2020	80 <sup>§</sup>	3,3
<b>Cellules</b>					
Sarcoma Li-7(m) [29]	>8,0 (ATP) 8,0 (ADP)	km1: 87 km2: 1610	km1: 44 km2: 1100		1,7

† 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.*, 1992a,b; 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.*, 1996b; 22: Schadeck *et al.*, 1989; 23: Battastini *et al.*, 1991; 24: Frassetto *et al.*, 1993; 25: Sarkis et Salto, 1991; 26: Strobel et Rosenberg, 1992; 27: Strobel, 1992; 28: Strobel *et al.*, 1996; 29: Knowles *et al.*, 1983.

‡ Le ratio de l'hydrolyse de l'ATP/ADP peut être influencé par le tampon d'incubation.

\* Masse moléculaire estimée par la technique d'inactivation par irradiation au <sup>60</sup>Co.

§ Masse moléculaire estimée par SDS-PAGE.

□ Masse moléculaire estimée par filtration.

obtenues jusqu'à présent, aucune n'a pu clairement dissocier cette activité d'une activité ATPasique. Cette observation nous porte à croire que les activités ecto-ATPasiques et ecto-ADPasiques décrites dans la littérature seraient attribuables, dans bien des cas, à des ATPDases. Ainsi, on trouve des ATPDases tant dans le règne végétal qu'animal. On croit cependant que leur fonction serait différente.

### *Rôle des ATP diphosphohydrolases*

La fonction des ATPDases n'est pas encore bien définie. Il est fort probable que cette enzyme joue des rôles différents selon son origine. Afin de définir le rôle physiologique de l'ATPDase des mammifères, et plus particulièrement de celle que l'on retrouve au niveau du système vasculaire, nous allons d'abord étudier les fonctions proposées pour l'enzyme des plantes, des procaryotes, et des insectes piqueurs et autres invertébrés puisqu'elles contribueront à mieux cerner son rôle chez les mammifères.

Chez les plantes, même s'il y a eu un travail considérable sur les ATPDases, il reste toutefois à en démontrer le rôle. On a cependant proposé que l'ATPDase permettrait d'accumuler de l'amidon en hydrolysant l'ADP et l'UDP (Sarkis *et al.*, 1986; Fanta *et al.*, 1988 ;Anich *et al.*, 1990). En effet, l'ADP et l'UDP sont des produits secondaires de la synthèse de l'amidon (et du glycogène chez les mammifères) qui inhibe la glycosyltransférase (Yung et Preiss, 1982; Sadler *et al.*, 1982). L'ATPDase pourrait ainsi hausser le rendement de cette réaction de synthèse en éliminant les produits indésirables. Cet argument est appuyé par le fait que l'ATPDase est abondante chez les plantes qui accumulent de l'amidon, comme dans le tubercule de la pomme de terre et différentes plantes à pois (Traverso-Cori *et al.*, 1970; Tognoli et Marrè, 1981; Vara et Serrano, 1981).

Parmi les rares ATPDases décrites chez les procaryotes, on en trouve une qui attire particulièrement l'attention. Une ATPDase soluble a été localisée dans l'espace périplasmique de la forme virulente de *Shigella* (Bhargava *et al.*, 1995).

Cette bactérie cause la dysenterie bacillaire. Cet intrus est d'abord phagocyté par les cellules épithéliales du côlon, il se multiplie et finalement tue la cellule hôte. L'activité catalytique de l'ATPDase pourrait expliquer certains événements métaboliques qui surviennent rapidement après l'infection tels: la baisse du niveau d'ATP et la perturbation du métabolisme énergétique, et le dommage causé aux mitochondries. C'est pour ces raisons que Bhargava *et al.* (1995) ont suggéré que l'ATPDase jouerait le rôle d'une cytotoxine générale, impliquée directement ou non dans la mort de la cellule hôte.

Le rôle décrit pour l'ATPDase sécrétée dans la salive des invertébrés hématophages, nous éveille à l'un de ces rôles possibles dans le système circulatoire des mammifères. Lorsque ces invertébrés piquent et injectent leur salive, ils brisent de nombreuses cellules, libérant une quantité importante de nucléotides qui, additionnés à la relâche par les plaquettes activées, favorise une agrégation rapide et massive de ces dernières. Ceci aurait évidemment pour effet de diminuer la fluidité du sang et d'en réduire l'absorption par le proboscis. L'évolution a permis à ces insectes de développer plusieurs mécanismes antihémostatiques, dont l'ATPDase. Ribeiro et collaborateurs ont proposé que par la transformation de l'ADP et de l'ATP en AMP, l'ATPDase faciliterait l'ingestion de nourriture de trois façons: en empêchant d'abord la formation d'agrégats plaquettaires (Ribeiro et Garcia, 1980, 1981; Ribeiro *et al.*, 1984b), en augmentant localement le débit sanguin par la vasodilatation, et possiblement par une action anti-inflammatoire (Ribeiro, 1987). En effet, nous avons vu les effets de l'ATP, de l'ADP et de l'adénosine sur le contrôle du tonus vasculaire et de l'agrégation plaquettaire (Tableau 1). L'ATP est également reconnu de plus en plus comme un agent pro-inflammatoire, alors que son dérivé déphosphorylé, l'adénosine, est un agent anti-inflammatoire (Bakker *et al.*, 1994).

Chez un autre invertébré, le ver *Schistosoma mansoni*, une ATPDase a été localisée à la surface du tégument (Vasconcelos *et al.*, 1993). Ils ont montré de façon ingénieuse que cette enzyme hydrolysait les nucléotides à la surface du parasite. L'enzyme pourrait ainsi empêcher la formation d'agrégats plaquettaires



autour de l'animal. On a proposé que l'ATPDase serait un des mécanismes développés par le parasite pour assurer sa survie dans la circulation sanguine de l'hôte (Ferreira *et al.*, 1995).

Chez les mammifères, on croit que l'ATPDase hydrolyse les nucléotides extracellulaires. Il sera d'ailleurs clairement démontré dans un chapitre ultérieur que l'ATPDase est bel et bien une ectonucléotidase. Par la localisation de son site actif et par ses propriétés cinétiques ( $K_m$  de l'ordre du micromolaire, pH optimum près de la neutralité, activation par les ions  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ ), l'ATPDase serait en mesure d'intervenir efficacement *in vivo* en altérant les concentrations de nucléotides extracellulaires. Le fait que l'enzyme ait une haute affinité pour ses substrats, lui permet d'intervenir à des concentrations de nucléotides de l'ordre de celles qui affectent les purinorécepteurs, c'est-à-dire de 0,1 à 100 micromolaires. C'est par l'action des substrats que l'on découvre les fonctions potentielles des ATPDases de mammifères. En examinant quelques-unes des fonctions des nucléotides extracellulaires, nous avons pu constater leur importance manifeste au niveau physiologique (Tableau 1). Il est ainsi difficile au moment présent de concevoir tous les rôles possibles des ATPDases. Ceux-ci se percevront beaucoup mieux à mesure que se compléteront les localisations cellulaires de l'enzyme et des divers purinorécepteurs. Le système vasculaire a été l'objet d'études plus détaillées (Tableau 1 et 6). On sait, entre autres, qu'une ATPDase est présente sur les cellules endothéliales et musculaires lisses de l'aorte de boeuf (Tableau 6). C'est dans ce système que certains des rôles de l'enzyme peuvent mieux se percevoir.

C'est en comparant les actions souvent antagonistes des substrats et des produits de la réaction que l'on peut proposer des fonctions à l'ATPDase. Cela est bien illustré par l'action de l'ADP et de l'AMP sur les plaquettes sanguines; l'ADP (substrat) cause l'agrégation alors que l'AMP (produit) l'inhibe (Figure 3). Quelques études ont mis en évidence ce rôle potentiel de l'ATPDase dans la thromborégulation (Miura *et al.*, 1987; Côté *et al.*, 1992a; Marcus et Safier, 1993). De façon plus générale, cette enzyme limiterait l'action des purinorécepteurs  $P_2$ ,

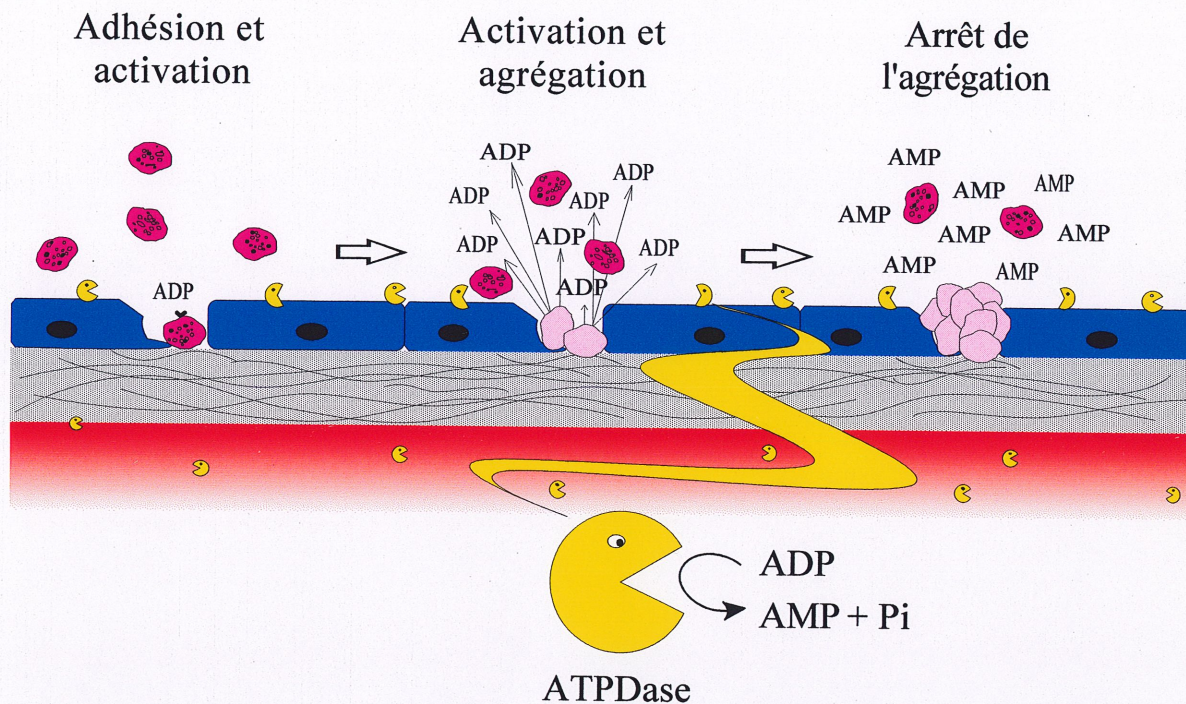


Figure 3. **ATP diphosphohydrolase et agrégation plaquettaire.** Lors d'un bris cellulaire, des nucléotides sont libérés. L'ADP et le collagène de la membrane basale activent les plaquettes. L'exocytose d'une forte concentration d'ADP des plaquettes activées entraîne une agrégation massive. L'ATPDase (PacMan jaune) en hydrolysant l'ADP en AMP arrêterait la progression du processus d'agrégation. Cellules endothéliales (bleu); cellules musculaires lisses (rouge); plaquettes (magenta); plaquettes agrégées (magenta pâle); membrane basale (gris); ATPDase (jaune).

et/ou convertirait une action de type  $P_2$  en  $P_1$ . Par exemple, l'ATPDase pourrait, par ce moyen, convertir une vasoconstriction en vasodilatation (Figure 4). Elle pourrait également influencer les actions du système nerveux (Zimmermann, 1996) et moduler les réponses de tous les systèmes qui subissent les assauts des nucléotides extracellulaires, quelle qu'en soit la source. Finalement, l'action combinée de l'ATPDase et de la 5'-nucléotidase produit l'adénosine, qui peut être récupérée pour les besoins du métabolisme cellulaire, grâce à un transporteur spécifique.

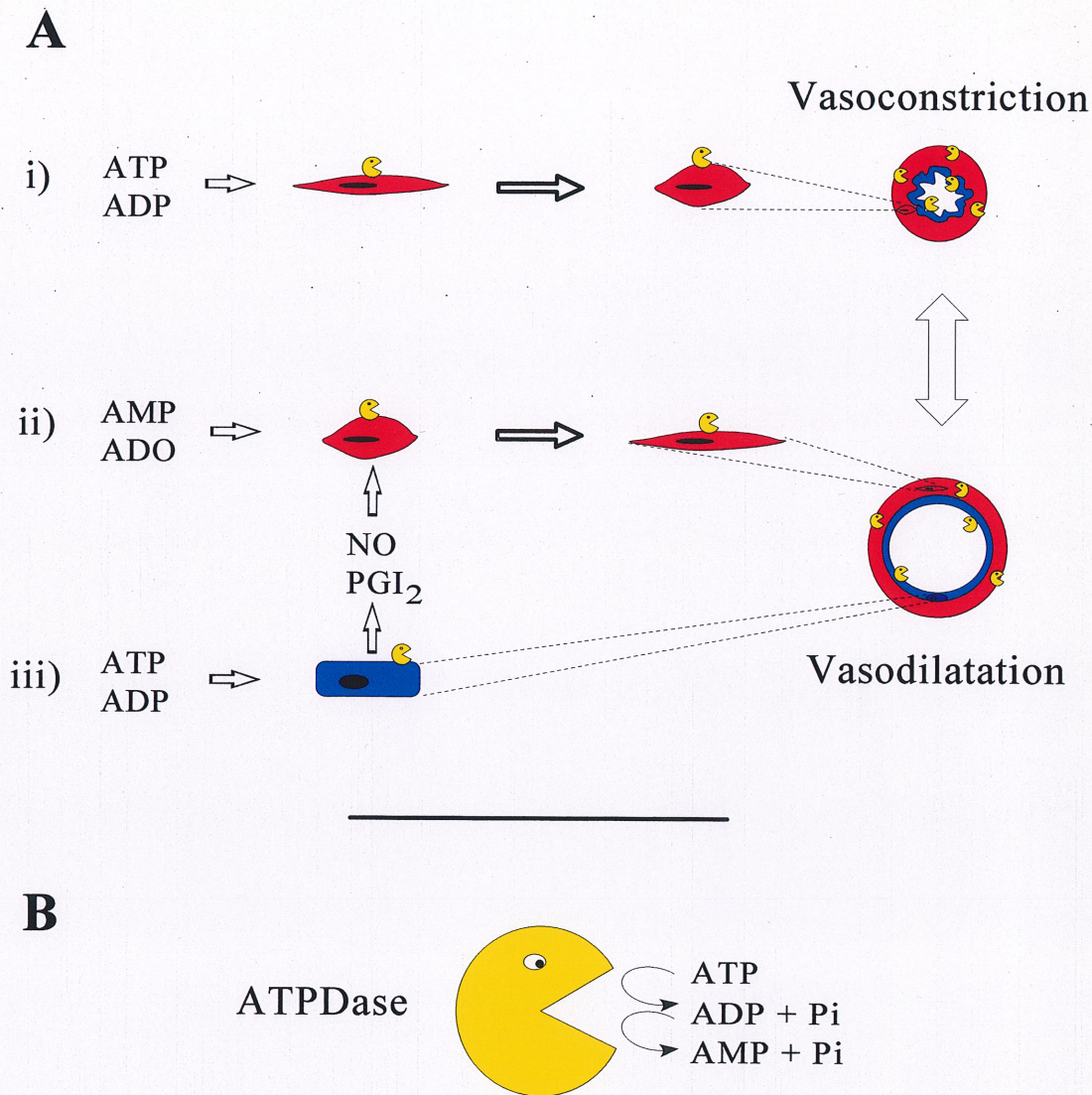


Figure 4. **ATP diphosphohydrolase et tonus vasculaire.** (A) i) L'ATP et l'ADP agissent sur les purinorécepteurs  $P_{2X}$  des cellules musculaires lisses et causent une vasoconstriction. ii) L'AMP et l'adénosine (ADO) se lient aux purinorécepteurs  $A_2$  des cellules musculaires lisses et causent une vasodilatation. iii) L'ATP et l'ADP agissent sur les récepteurs  $P_{2Y}$  des cellules endothéliales et libèrent l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline (PGI<sub>2</sub>). Ces composés agissent à leur tour sur les cellules musculaires et causent une vasodilatation. (B) L'ATPDase convertit les triphospho- et diphosphonucléosides en nucléosides monophosphates et peut ainsi modifier l'effet physiologique (vasoconstriction contre vasodilatation). Cellules des muscles lisses (rouge); cellules endothéliales (bleu); ATP diphosphohydrolase (jaune).

### *Purification des ATP diphosphohydrolases*

Plusieurs groupes ont déjà purifié bon nombre d'ATPDases à différents degrés. Deux isoformes d'apyrase de la pomme de terre, soluble et non-soluble, sont même disponibles commercialement sous forme partiellement purifiées. La première purification à homogénéité d'une ATPDase associée à une membrane de cellules végétales a été effectuée à partir de racines de *Cicer arietinum* selon le protocole suivant: solubilisation différentielle des protéines de la fraction micro-somale suivie d'une chromatographie sur Affi-Gel Bleu puis sur Carboxyméthyl-cellulose (Vara et Serrano, 1981). Ils ont ainsi obtenu un monomère de 50 kDa avec une activité spécifique de 1800 unités/mg de protéines.

Ribeiro et collaborateurs ont accompli un travail considérable sur l'ATPDase de la salive des insectes piqueurs. En 1986, Sarkis *et al.* ont purifié partiellement l'apyrase de la glande salivaire de *Rhodnius prolixus* par filtration sur colonne Bio-Gel P-300, suivi d'une colonne échangeuse d'ions, DEAE-séphadex. Ils ont obtenu une activité spécifique de 580 unités/mg de protéines en utilisant l'ATP comme substrat.

Chez les mammifères, le premier rapport sur la description et la purification d'une ATPDase est venu de LeBel *et al.* (1980). Ils ont préparé une fraction particulière du pancréas de porc par centrifugations différentielles. Ils ont ensuite solubilisé les protéines avec le Triton X-100 et purifié l'enzyme par chromatographie sur colonne sépharose 4B, suivie de la colonne d'affinité Affi-Gel Bleu. Ils ont ainsi obtenu une activité spécifique de 13 unités/mg de protéines, avec l'ADP comme substrat. Ils ont proposé que l'ATPDase correspondait à la bande majeure de 65 kDa, observée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Deux ans plus tard, à partir du même tissu, Laliberté *et al.* (1982) ont utilisé une nouvelle procédure de purification: isolement de la membrane de grains de zymogènes, solubilisation des protéines avec le Triton X-100 puis chromatographie d'affinité sur 5'AMP-sépharose. Par cette procédure, ils ont obtenu une fraction avec une activité spécifique de 69 unités/mg de protéines et qui après

SDS-PAGE et coloration à l'argent du gel a révélé trois polypeptides de masses moléculaires de 58, 46 et 28 kDa. Plus tard, par marquage à l'azido-ATP de fractions partiellement purifiées, LeBel et Beattie (1986) ont proposé qu'une bande de 53 kDa constituait l'unité catalytique de l'enzyme. Malgré tous ces travaux, on constate que le polypeptide responsable de l'activité ATPDasique n'a pu être identifié avec certitude.

L'ATPDase de l'aorte bovine fut purifiée par Yagi *et al.* (1989). Leur procédure de purification incluait la préparation d'une fraction particulière, la solubilisation des protéines avec le Triton X-100, suivie d'une colonne échangeuse d'ions (DEAE), puis d'une colonne 5'AMP-sépharose. Ils ont obtenu une activité spécifique de 58 unités/mg de protéines avec l'ADP comme substrat, et ils affirment que l'ATPDase correspond à une bande unique de 110 kDa. Cependant, la photographie qu'ils ont soumise ne présente qu'une portion du gel, et aucun autre argument assurant la validité de ce résultat n'a été présenté. L'activité spécifique présentée semble relativement faible pour une ATPDase purifiée à homogénéité. De ces quelques points, il ressort que le polypeptide présenté pourrait être en fait un contaminant majeur et que le (ou les) polypeptide(s) représentant l'ATPDase soit(ent) encore en quantité insuffisante pour être détectable par leur méthode de coloration. Trois ans plus tard, le même groupe a purifié l'ATPDase des vaisseaux du cordon ombilical humain (Yagi *et al.*, 1992). Ils ont utilisé la même méthode de purification à laquelle ils ont ajouté une colonne de Con A-sépharose. Ils ont évalué la masse moléculaire de cette ATPDase à 75 kDa. Encore une fois, ils présentent une photographie incomplète de leur gel SDS-PAGE, dont la qualité ne permet pas de conclure objectivement. Ils ont évalué l'activité spécifique de leur préparation, pure à homogénéité, à 37 unités/mg de protéines, avec l'ADP comme substrat.

En 1991, Moodie *et al.* ont caractérisé et purifié une ATPDase de la rate de boeuf. Cette enzyme a été purifiée en grande partie selon la procédure employée par Yagi *et al.* (1989) à laquelle ils ont ajouté une étape de purification supplémentaire, soit une colonne de chromatographie Con A-sépharose. Ils ont obtenu une activité

spécifique de 115 unités/mg de protéines avec l'ADP comme substrat. Ils proposent que l'enzyme est constituée d'une seule sous-unité de 100 kDa. Pourtant, leur figure montre clairement d'autres contaminants, dont une bande dans la région de 80 kDa. Aucun résultat n'est présenté, permettant d'identifier la bande majeure de leur gel comme étant l'ATPDase. Leur seul argument vient de la purification antérieure de Yagi *et al.* (1989) qui avaient trouvé, rappelons-le, une protéine de 110 kDa. On pourrait donc argumenter que l'ATPDase, correspondrait en fait à la protéine d'environ 80 kDa, qui est également présente sur leur gel.

Une deuxième ATPDase humaine a été récemment purifiée par Christoforidis *et al.* (1995). La procédure de purification était similaire à celle décrite par Yagi *et al.* (1989). Malgré qu'ils n'aient utilisé que deux colonnes de chromatographies (DEAE- et 5'AMP-sépharose), leur gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent montre une bande unique et large d'environ 82 kDa. La fraction purifiée montre une activité spécifique de 21 unités/mg de protéines, l'ADP pris comme substrat, pour un enrichissement total de 260 fois par rapport à l'homogénat. Ils ont probablement purifié l'ATPDase par un facteur de cinq fois supplémentaire puisque l'enzyme perd 80% de son activité lors de l'addition du détergent, Triton X-100. Ils ont obtenu six séquences partielles de 3 à 14 acides aminés qui ne présentaient aucune similarité significative avec les protéines connues.

Un résultat intéressant a été publié dans le domaine par Strobel *et al.* (1996). Ils ont purifié l'ATPDase de l'oviducte et du foie de poulet. Ils ont tout d'abord préparé une fraction particulière de l'oviducte par filtration sur Biogel A, solubilisé les protéines membranaires avec le détergent Nonidet P-40 qu'ils ont fractionnées sur une colonne DEAE, puis sur une colonne de lentille. Ils ont répété sensiblement la même procédure afin de purifier l'ATPDase du foie de poulet, mais en remplaçant la dernière étape par une autre colonne de lectine, une Con A-sépharose. Avec MgATP comme substrat, ils ont obtenu une activité spécifique de 42 unités/mg de protéines pour l'ATPDase de l'oviducte, et de 755 unités/mg de protéines pour celle du foie. La migration en gel SDS-PAGE a montré que plusieurs protéines étaient encore présentes dans chacune de ces deux fractions

purifiées (Strobel, 1992). Ils ont ensuite fractionné chacune de celles-ci par gel d'électrophorèse dans des conditions non-dénaturantes, détecté l'enzyme par son activité, puis découpé les bandes obtenues. Chacune des deux bandes de gel a été fragmentée, puis injectée directement à des souris, afin de produire des anticorps monoclonaux. Plusieurs de ces derniers ont été caractérisés, et certains de ceux-ci ont été couplés à des billes d'Affi-Gel, et ont permis de purifier les deux ATPDases à homogénéité. Ils ont obtenu une activité spécifique de 800 et de 1200 unités/mg de protéines respectivement pour l'enzyme de l'oviducte et du foie. La migration en gel SDS-PAGE de la fraction purifiée avec les anticorps monoclonaux a révélé une bande unique de 80 kDa pour l'oviducte et de 90 kDa pour le foie. Des faits intéressants ressortent de ces résultats. Premièrement, ils ont obtenu une activité spécifique de loin supérieure à ce qui a été obtenu jusqu'à présent chez les mammifères. Deuxièmement, chacune des deux protéines obtenues après purification à homogénéité ne représentait qu'une faible proportion des protéines des échantillons purifiés avec les colonnes, tel que visualisé sur électrophorégramme. Ainsi, il y avait des contaminants majeurs dans chacune de ces préparations hautement purifiées. Ces résultats sèment le doute sur toutes les autres purifications d'ATPDases des mammifères rapportées à ce jour.

Le cas de l'ecto-ATPase du foie de rat, qui a été purifié et son gène cloné, a une certaine importance du point de vue historique; nous verrons pourquoi. En fait, il s'agit plutôt d'une ATPDase puisque cette enzyme est activé par les ions calcium et/ou magnésium et qu'elle hydrolyse l'ATP et l'ADP (Lin et Russell, 1988). Déjà en 1984, Lin et Fain avaient purifié cette ecto-ATPase selon la procédure suivante: solubilisation des protéines d'une fraction particulière enrichie en membranes plasmiques avec le détergent Lubrol PX, puis fractionnement des protéines solubilisées par trois chromatographies successives: "polybuffer exchanger 94", Con A-sépharose 4B, puis filtration sur séphadex G-200. La fraction purifiée montrait une activité spécifique de 20 unités/mg de protéines, avec l'ATP comme substrat. Malheureusement aucun gel SDS-PAGE n'est montré. Des fragments tryptiques de la protéine majeure de leur préparation ont été produits, fractionnés par HPLC en phase inverse, puis séquencés. Ils ont par la suite cloné l'ADNc de l'ecto-ATPase en criblant une banque d'ADNc de foie de rat avec une sonde oligo-

nucléotidique dégénérée, correspondant à l'un des fragments tryptiques (Lin et Guidotti, 1989). Ces résultats soulèvent certains points problématiques. Premièrement, aucune preuve n'est donnée pour justifier que la protéine majeure de leur fraction purifiée correspond à l'ATPase. Il serait donc possible que les séquences partielles obtenues n'appartiennent pas à l'ATPase. Deuxièmement, l'expression du gène cloné, dans des cellules qui possèdent un taux basal d'activité ATPasique très faible (cellules L), n'a permis d'augmenter l'activité ATPasique que de deux fois seulement par rapport au contrôle. Troisièmement, les auteurs rapportent que la comparaison de la structure primaire de leur ecto-ATPase avec celle de la glycoprotéine biliaire 1 humaine montre une très forte similarité, 65% des acides aminés étant identiques. Quelques articles publiés récemment montraient que le gène cloné par Lin et Guidotti codait pour une protéine d'adhésion cellulaire, C-Cam 105, et non pour une ecto-ATPase (Knowles, 1995; Sabolic *et al.*, 1996). Pendant longtemps on a crû que le gène de l'ecto-ATPase/ATPDase était cloné, et en feuilletant la littérature on s'aperçoit que de nombreux chercheurs furent induits en erreur.

Depuis, l'ADNc de l'ATPDase d'un insecte et celui de l'enzyme d'une plante ont été clonées. Champagne *et al.* (1995) viennent à peine de cloner l'ADNc de l'ATPDase des glandes salivaires du moustique *Aedes aegypti* et leurs résultats sont déjà controversés. Premièrement, dans un travail antécédent, ils avaient cloné plusieurs gènes transcrits exclusivement dans les glandes salivaires de cet insecte. Ils ont identifié l'ADNc, correspondant au gène de l'ATPDase, selon l'homologie avec deux séquences de 24 acides aminés provenant d'une protéine tirée d'une fraction enrichie en activité ADPasique de seulement 20 fois par rapport à l'homogénat des glandes salivaires. Deuxièmement, ils ont produit des anticorps spécifiques mais ne montrent pas si ceux-ci peuvent immunoprécipiter l'activité ATPDasique. Troisièmement, ils ont réussi à exprimer la protéine dans des bactéries, tel que montré par immunobuvardage et détection avec leur anticorps, mais ne montrent pas si la protéine produite possède une activité quelconque. Encore plus récemment, l'équipe du docteur Guidotti a purifié l'ATPDase du tubercule de la pomme de terre, *Solanum tuberosum*, puis cloné son gène (Handa et Guidotti, 1996). Malgré qu'ils n'aient pas réussi à purifier l'enzyme à



homogénéité, ils ont tout de même obtenu un enrichissement fort appréciable d'environ 10,000 fois par rapport à l'homogénat. La protéine majeure a été séquencée. Des oligonucléotides dégénérés, synthétisés selon les séquences en acides aminés obtenues, ont permis de cloner l'ADNc. Ils n'ont malheureusement pas tenté de produire la protéine par transfection de l'ADNc.

## **HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL**

Nous venons de constater qu'au niveau du système vasculaire, les nucléotides extracellulaires exercent, via des récepteurs spécifiques, des fonctions importantes notamment dans les phénomènes d'agrégation plaquettaire et du tonus vasculaire. L'hydrolyse de ces nucléotides peut ainsi moduler leurs actions. Des études *in vitro* et *ex vivo* montrent que les niveaux de nucléotides sanguins sont rigoureusement contrôlés par des activités ATPasique, ADPasique et AMPasique fermement attachées à la surface des cellules (Binet et Burstein, 1950; Williamson et DiPietro, 1965; Baer et Drummond, 1968; Paddle et Burnstock, 1974; Crutchley *et al.*, 1978; Pearson, 1985; Slakey *et al.*, 1986; Gordon, 1986). Il y aurait possiblement deux catégories de cellules responsables de ce contrôle: les cellules sanguines d'une part (les globules blancs, les érythrocytes et autres éléments sanguins), et les cellules vasculaires d'autre part (les cellules endothéliales et musculaires lisses). Ce sont les cellules vasculaires qui contribuent le plus au métabolisme de ces nucléotides (Jorgensen, 1956; Brashear et Ross, 1968; Ryan et Smith, 1971; Crutchley *et al.*, 1978; Carleton *et al.*, 1979; Trams *et al.*, 1980; Emms et Lewis, 1982; Gordon, 1986; Lüthje et Ogilvie, 1988; Coade et Pearson, 1989). En effet, la demi-vie de l'ATP dans la microcirculation, donc en présence de cellules endothéliales, est de l'ordre de quelques secondes, dans le sang complet elle est augmentée considérablement à environ 5 minutes, alors que dans le plasma exempt de cellules elle est de l'ordre de 30 minutes (Pearson et Gordon, 1985). Il est connu depuis une quinzaine d'années que les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses possèdent des ectonucléotidases (Crutchley *et al.*, 1978, 1980; Dosne *et al.*, 1978; Glasgow *et al.*, 1978; Hayes *et al.*, 1979; Pearson *et al.*, 1980, 1985; Lieberman *et al.*, 1982; Wilson *et al.*, 1982; Cusack *et al.*,

1983; Bakker *et al.*, 1987). Les activités ecto-ATPasique et ecto-ADPasique ont longtemps été attribuées à deux enzymes distinctes. Cependant, des études récentes ont démontré qu'une ATPDase pouvait exercer à elle seule ces deux activités, dans l'aorte bovine (Yagi *et al.*, 1989, 1991; Côté *et al.*, 1991, 1992a). Yagi *et al.* (1991) ont montré de fortes évidences que l'ATPDase des cellules endothéliales et musculaires lisses de ce tissu était une ectoenzyme, ce qui était aussi corroboré par Picher *et al.* (1994) pour l'enzyme du muscle lisse de la trachée. Du point de vue physiologique, Côté *et al.* (1992a) ont montré qu'une fraction particulière de l'aorte bovine pouvait contrôler *in vitro* l'agrégation plaquettaire, par l'hydrolyse de l'ADP et de l'ATP. La première hypothèse, dans le cadre des présentes études doctorales, se formule de la façon suivante: une ATPDase est impliquée dans la déphosphorylation de l'ATP et de l'ADP à la surface des cellules des vaisseaux sanguins et exerce ainsi un contrôle de l'agrégation plaquettaire.

Afin de définir le ou les rôle(s) physiologique(s) des ATPDases, il faut d'abord connaître leurs propriétés biochimiques. Déjà, quelques ATPDases de différents tissus ont été caractérisées, le plus souvent à partir d'une fraction particulière grossière. Parmi celles-ci, on en trouve trois qui montrent des propriétés physico-chimiques distinctes. Côté *et al.* (1991) ont montré que les ATPDases du pancréas de porc et de l'aorte de boeuf diffèrent de la façon suivante: (1) par leur pH optimum qui est respectivement de 8,0 et de 7,5; (2) par l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$  sur leur activité enzymatique; par leur courbe d'inactivation par irradiation au  $^{60}\text{Co}$ ; et par leur profil de migration en gel d'électrophorèse dans des conditions non-dénaturantes. Par la suite, Picher *et al.* (1993) ont démontré l'existence d'une ATPDase dans le poumon de boeuf. Bien que les propriétés biochimiques de cette enzyme ressemblaient beaucoup à l'ATPDase de l'aorte, elle s'en distinguait cependant par sa courbe d'inactivation par irradiation au  $^{60}\text{Co}$  et par son profil de migration en gel d'électrophorèse dans des conditions non-dénaturantes. Ces prémisses mènent à la deuxième hypothèse de ce travail qui s'énonce comme suit: des protéines distinctes sont responsables de l'activité ATPDasique dans le pancréas, l'aorte et le poumon.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons défini les trois objectifs spécifiques suivants: (1) purifier les ATPDases du pancréas de porc, de l'aorte et du poumon de boeuf; (2) produire des anticorps dirigés contre ces protéines; (3) cloner et réexprimer l'ADNc de leur gène. Il est actuellement difficile de définir les rôles physiologiques des ATPDases par manque d'informations sur ces enzymes. Par exemple, la localisation cellulaire des ATPDases est très peu connue et on ne sait pas si l'expression du gène est contrôlé. L'atteinte des objectifs spécifiques mentionnés, permettra de nous doter de nouveaux outils qui nous aideront à mieux définir les fonctions des ATPDases chez les mammifères, qui est l'objectif à long terme de notre laboratoire.

## CHAPITRE 1

### PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE L'ATP DIPHOSPHOHYDROLASE TYPE I

L'ATPDase des mammifères a été mise en évidence dans le pancréas de porc par LeBel *et al.* (1980) qui l'avaient partiellement purifiée. Plus tard, Laliberté *et al.* ont purifié l'enzyme davantage et ont décrit ses propriétés cinétiques (Laliberté *et al.*, 1982; Laliberté et Beaudoin, 1983). Selon ces études, quatre polypeptides, de masses moléculaires de 65, 58, 46 et 28 kDa, pouvaient être identifiés comme candidats de l'enzyme. Un peu plus tard, par marquage à l'azido-ATP de fractions partiellement purifiées, LeBel et Beattie (1986) ont proposé qu'une protéine de 53 kDa constituait l'unité catalytique de cette ATPDase. Dans la présente étude, nous avons purifié l'enzyme du pancréas et nous avons estimé sa masse moléculaire à 54 kDa par électrophorèse en gel d'acrylamide. Le marquage de cette protéine avec un analogue de l'ATP a confirmé qu'elle possédait au moins un site de liaison aux nucléotides. Il s'agit d'une protéine hautement glycosylée qui correspond vraisemblablement au polypeptide de 58 kDa purifié par Laliberté *et al.* (1982) et à celui de 53 kDa identifié par LeBel et Beattie (1986). La comparaison des propriétés biochimiques et des masses moléculaires montre que l'ATPDase du pancréas de porc est différente des autres ATPDases identifiées antérieurement dans la littérature.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication parue en 1995 dans *Biochemical Journal*, volume 312, pages 351-356. La production et la caractérisation de l'anticorps dirigé contre le FSBA ont été réalisées par le docteur Y.P. Côté.

**Purification of Pancreas Type-I ATP Diphosphohydrolase  
and Identification by Affinity Labelling with the  
5'-*p*-Fluorosulfonylbenzoyladenine ATP Analogue**

Jean Sévigny, Yvan P. Côté\* and Adrien R. Beaudoin

Département de biologie, Faculté des sciences,  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Québec, CANADA, J1K 2R1

\* Present address: department of Pharmacology, University of Connecticut Health  
Center, Farmington, CT 06030

## SYNOPSIS

The enzyme, recently identified as type-I ATP diphosphohydrolases (ATPDase: EC 3.6.1.5), has been purified from the zymogen granule membrane of pig pancreas. After solubilization with Triton X-100 and chromatographies on ion-exchange and Affi-Gel Blue columns an approximate 3500-fold purification was obtained. The enzyme preparation with a specific activity of 45 U/mg of protein was much further purified by PAGE under non-denaturing conditions. The active band localized on the gel contained two proteins after SDS-PAGE and silver staining, corresponding to apparent molecular masses of 56 and 54 kDa respectively. The identity of the ATPDase was confirmed by an affinity labelling technique with 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyladenosine (FSBA) as an ATP analogue. The latter was detected by a Western blot technique. A strong reaction was observed with the band corresponding to 54 kDa. N-terminal sequence analysis revealed that the 56 kDa has significant similarities (50-72%) with lipases whereas the 54 kDa has no significant similarity with any known proteins. N-glycosidase F treatment confirmed the glycoprotein nature of the enzyme and suggested that the enzyme bears several N-glycosylation sites. Comparisons of molecular masses and biochemical properties show that this ATPDase is different from other reported mammalian ATPDases.

## INTRODUCTION

ATP diphosphohydrolases, or apyrases (ATPDase: EC 3.6.1.5), constitute a family of enzymes that catalyse the hydrolysis of the  $\gamma$ - and  $\beta$ -phosphate residues from triphospho- and diphosphonucleosides. The first ATPDase was reported by Kalckar (1944) in potato tubers [1] and since then, ATPDases have been found in other plants, blood-feeding insects, ticks, bugs, mosquitoes as well as leeches and other invertebrates. For a review see Ribeiro [2], and Beaudoin *et al.* [3]. In 1980, LeBel *et al.* reported an ATPDase in the pig pancreas [4]. A couple of years later, Laliberté *et al.* further purified the enzyme and described some of its

kinetic properties [5,6]. Since then, the catalytic unit of the enzyme could not be established with certitude. Other ATPDases have been found in vertebrate cells, including those of blood vessels [7-16]. Some evidences concord with the view that the catalytic site of the ATPDase on endothelial and smooth muscle cells of blood vessels and trachea is a component of plasma membranes and would be responsible for the major part of the ecto-ADPase and ecto-ATPase activities at the cell surface [8,17]. Because of their low apparent  $K_m$  ( $\sim 10 \mu M$ ), one is led to believe that ATPDases exert a control on ATP and ADP concentrations in blood and within the blood vessel wall [3,18,19]. Côté *et al.* have demonstrated that addition of a semi-purified ATPDase preparation to a platelet rich concentrate could prevent or even reverse an ADP-induced platelet aggregation [12].

Analysis of the biochemical properties of vertebrate ATPDases from different sources: pig pancreas [4-6], bovine aorta [11-13], lung [20] and trachea [17] led us to propose the existence of at least three distinct types of ATPDases. The enzymes from these sources exhibit clear biochemical differences, but up until recently, little was known about their identification and their structure. In this work, type-I ATPDase has been purified and the identity of the catalytic unit has been confirmed by affinity labelling with 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl adenosine (FSBA), detected by an immunoblot technique.

## **EXPERIMENTAL**

### **Materials**

ATP, ATP-agarose, EDTA, glycerin (1,2,3-Propanetriol), glycine, L-histidine, Nitro Blue Tetrazolium (NBT), Ponceau S, sodium deoxycholate, Tris, 1,4-dithiothreitol (DTT), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), FSBA, mouse monoclonal antibodies to rabbit IgG, conjugated to alkaline phosphatase, glutamate dehydrogenase (GDH), were all obtained from Sigma Chemical Co., St-

Louis, MO, USA; ADP, AMP, Triton X-100 and N-glycosidase F were purchased from Boehringer-Mannheim, Laval, Québec, Canada; Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) and Tween 20 from Fisher Scientific Co., Montréal, Québec, Canada; Microdialysis membranes (12,000-14,000 Da) were purchased from Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, USA; Dialysis membrane Spectra/Por (6,000-8,000 Da) from Spectrum Medical Industries, Inc., Los Angeles, CA, USA; Transfer membrane Immobilon-P was obtained from Millipore Corp., Bedford, MA, USA; Bradford reagent, BSA fraction V, Affi-Gel Blue, DEAE Bio-Gel A agarose, SDS, molecular-mass standards and polyacrylamide from Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada. All other reagents were of analytical grade.

### **ATPDase purification**

Pig pancreases, obtained from the "Abattoir Bienvenue", St-Valérien, Québec, Canada, were removed within 2 min after death and kept on ice, in a Krebs-Ringer phosphate medium (pH 7.4) supplemented with 0.2% glucose. Purification of the zymogen granule membrane (ZGM) was carried out according to Pâquet *et al.* [21]. Membrane proteins were solubilized, at a concentration of protein of 1 mg per ml, with 0.3% (v/v) Triton X-100, 30 mM Tris, pH 8.0, and centrifuged for 1 h at 100,000 g in a Beckman rotor SW 41. Approximately 10 to 30 mg of proteins from the supernatant, containing most of the enzyme activity, were loaded on a 8 ml DEAE-agarose column, preequilibrated with 7.5% (v/v) glycerin, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 20 mM Tris pH 8.0. Proteins were eluted by a 0-0.13 M linear NaCl gradient in the same buffer, followed by a 2 M NaCl wash. Active fractions were pooled in 0.1X buffer E (buffer E: 192 mM glycine, 0.1% (v/v) Triton X-100, 25 mM Tris, pH 7.5) and electro-dialysed in an ISCO electro-eluter according to the following technique: buffer E was put in the apparatus and a 15 mA current was applied per cuvette. The buffer E was changed 4 times, at each 50 min interval. The dialysate was adjusted to pH 5.9 with a 200 mM L-histidine pH 4.0 solution, and loaded on an Affi-Gel Blue column (6 ml of beads) preequilibrated with 7.5% (v/v) glycerin, 0.07% (v/v) Triton X-100 and 25 mM Tris/L-histidine



pH 5.9. Proteins were eluted by a linear gradient of buffer A and B: buffer A (60 ml): 7.5% (v/v) glycerin, 0.07% (v/v) Triton X-100 in 10 mM Tris, pH 6.8; buffer B (60 ml): 7.5% (v/v) glycerin, 0.07% (v/v) Triton X-100, 1 M NaCl and 10 mM Tris, pH 7.5. This was followed by a wash with 1 M NaCl, 0.07% Triton X-100 and 100 mM Tris, pH 8.5. The ATPDase fractions were pooled and dialysed overnight against 0.05% Triton X-100 in 1 mM Tris, pH 8.0, concentrated on a mini DEAE-agarose column of 1 ml as described above, eluted with 0.4 M NaCl and dialysed against distilled water. This purified fraction was used for FSBA labelling, digestion with N-glycosidase F and electrophoresis. All the purification steps were carried out at 4°C and the column flow rate was 10 ml/h in all cases. Conditions of PAGE under non-denaturing conditions have been previously described [12].

### **ATPDase assays**

Enzyme assays were routinely carried out at 37°C in 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 200 μM substrate (ATP or ADP) and 50 mM Tris, pH 8.0, in a final volume of 1 ml. This concentration of substrate corresponds to about 25 times the apparent  $K_m$  of the enzyme and allowed low background readings for P<sub>i</sub> determinations. Incubation was stopped with 0.25 ml of malachite green reagent, and P<sub>i</sub> was estimated according to Baykov *et al.* [22]. One unit of ATPDase activity corresponds to the release of 1 μmol P<sub>i</sub>/min at 37°C. Proteins were estimated by the technique of Bradford using BSA as the standard of reference [23].

### **N-glycosidase F treatment**

Deglycosylation was carried out according to the manufacturer's recommendations (Boehringer-Mannheim, Laval, Québec, Canada). Six μg of protein from the Affi-Gel Blue fraction were boiled for 10 min in 0.2% SDS and 0.2% (v/v) 2-mercaptoethanol (25 μl total), the volume was then adjusted to 0.2 ml with a final con-

centration of 0.4% (v/v) Triton X-100, 10 mM EDTA, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, and 1 unit of N-glycosidase F. After a 12 h incubation at 37°C the medium was dialysed, lyophilized, and fractionated by SDS-PAGE. A positive control was run with 15 µg of protein from the ZGM incubated in identical conditions (not shown).

### **Polyclonal antibodies to FSBA**

Polyclonal antibodies to FSBA conjugated to GDH were raised according to Anostario *et al.* [24]. Twenty mg of GDH were incubated in a potassium phosphate buffer, pH 7.1 with 10% (v/v) dimethylformamide and 2.6 mM FSBA, in a final volume of 10 ml, for 2 h at 37°C. The FSBA-GDH conjugate was dialysed against a 10 mM phosphate buffer pH 7.4 and kept at -20°C. Five albino rabbits of approximately 2 kg each were injected in the leg muscle with a mixture of 0.5 ml (1 mg) of the GDH-FSBA conjugate and 0.5 ml of Freund's complete adjuvant. Two boosters were given at four week intervals with 0.75 mg of GDH-FSBA in PBS. Blood samples were taken daily, starting at day four after the second booster, and titered by dot blot assays with the GDH-FSBA conjugate (30 µg/dot). When titer reached 1:25,000, rabbits were anaesthetised with Somnotol (0.5-1 ml/5 pounds), bled by canulation of the femoral artery, and their serum kept at -70°C.

### **FSBA labelling and SDS-PAGE**

A sample (6 µg) of the purified enzyme from the Affi-Gel Blue column fraction were mixed with 150 mM KCl, 5% (v/v) dimethylsulfoxide, 0.2 mM FSBA as estimated by extinction coefficient ( $1.35 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  in ethanol) and 36 mM Tris-acetate, pH 7.5, in a final volume of 1 ml. The labelling reaction was carried out at 37°C, starting with the addition of FSBA and stopped 35 min later with 100 mM 1,4-dithiothreitol in 0.1% SDS. Control experiments were run with 10 mM

ADP or ATP (substrate) added 5 min before FSBA. After incubation, the medium was dialysed for 8 h against water in a microdialysis apparatus (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) at room temperature. The dialysate was lyophilized, resuspended in 150  $\mu$ l of 1X sample buffer (2% (w/v) SDS, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerin, 0.001% Bromophenol Blue in 65 mM Tris, pH 6.8) and incubated for 20 min at 37°C. FSBA labelled proteins were separated by SDS-PAGE on a 7-12% polyacrylamide gradient according to Laemmli [25] and detected by a Western blot technique with FSBA antibodies (see below). Proteins fractionated on SDS-PAGE were detected by Coomassie Blue and/or silver nitrate diamine staining method [26].

### **Immunoblotting procedure**

Proteins were transferred to Immobilon-P sheets as described by Towbin *et al.* [27]. Blots were stained with either Ponceau S (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) or 0.1% Amido Black according to Schaffner and Weissman [28]. Blots were incubated in 0.9% NaCl, 0.5% skim milk powder, 10 mM sodium phosphate, pH 7.4, for 1 h, washed (3 X 5 min) with solution B (0.1% BSA, 0.9% NaCl and 20 mM Tris, pH 7.4) and incubated for 2 h with the primary antibody diluted 1:10,000 with solution C (1% BSA, 0.9% NaCl, 0.03% (v/v) Tween 20 and 20 mM Tris pH 7.4). Excess antibody was removed by repeated washings (10 X 3 min) in solution B. Blots were then incubated for 1.5 h with a mouse anti-rabbit antibody conjugated to alkaline phosphatase at a dilution of 1:6,000 in solution C. After washings (10 X 3 min) in 0.9% NaCl, 0.03% (v/v) Tween 20 and 20 mM Tris, pH 7.4, antibodies were detected with NBT/BCIP according to Harlow and Lane [29].

## RESULTS

### ATPDase Purification

Isolation of the ZGM was the first step of the purification procedure of pancreas type-I ATPDase. A relatively high specific activity was found in this membrane preparation as compared to the homogenate, approximately 160-fold purification as previously reported [5]. The membrane was solubilized in Triton X-100, which caused a loss of about one third of the enzyme activity with a recovery of about 85% of the protein in the soluble fraction. A further 4-fold purification was obtained by DEAE-agarose column chromatography, with a 75% recovery of the enzyme activity (Figure 1, Table 1). The active fraction was fractionated on an Affi-Gel Blue column, which further purified the ATPDase by a factor of six with a 50% recovery of activity (Figure 2, Table 1). Throughout these purification steps the relative hydrolysis rates of ATP to ADP remained constant, indicating that no other nucleotidase was eliminated during purification (Table 1).

The final step of our analytical purification procedure was PAGE under non-denaturing conditions. Analysis of the enzyme activity in the gel confirmed the presence of the ATPDase which specifically catalysed the hydrolysis of ATP and ADP but not AMP (Figure 3). The activity band was excised from the gel and fractionated by SDS-PAGE. This activity band contained two polypeptides as shown after SDS-PAGE and silver nitrate overstaining: a sharp 56 kDa band and a diffuse band of about 54 kDa slightly below and overlapping with the 56 kDa band (Figure 4, lane H). We also analysed an additional band excised just above the active band on the non-denaturing gel and only the 56 kDa band could be seen (Figure 4, lane I). This observation indicated that the 56 kDa band was not the ATPDase, leaving the 54 kDa diffuse band as the only presumptive candidate for the enzyme.

**Table 1. ATPDase purification**

Steps	Total protein mg	Total activity units	Specific activity (ATP) units/mg	Yield %	Purification factor fold	Hydrolysis rates ATP/ADP
ZGM	20.0	60.8	3.0	-	(160)†	1.3
ZGM + Triton X-100	20.0	40.6	2.0	100	1	1.3
100,000 g supernatant of solubilized ZGM	17.6	37.0	2.1	91	1.1	1.3
DEAE column	3.5	28.8	8.3	71	4.2	1.3
Affi-Gel Blue column	0.31	13.8	45	34	23	1.3

The data shown are representative of three independent experiments.

† Laliberté *et al.* showed a 160-fold purification for the ZGM as compared to the homogenate using ADP as the substrate [5].

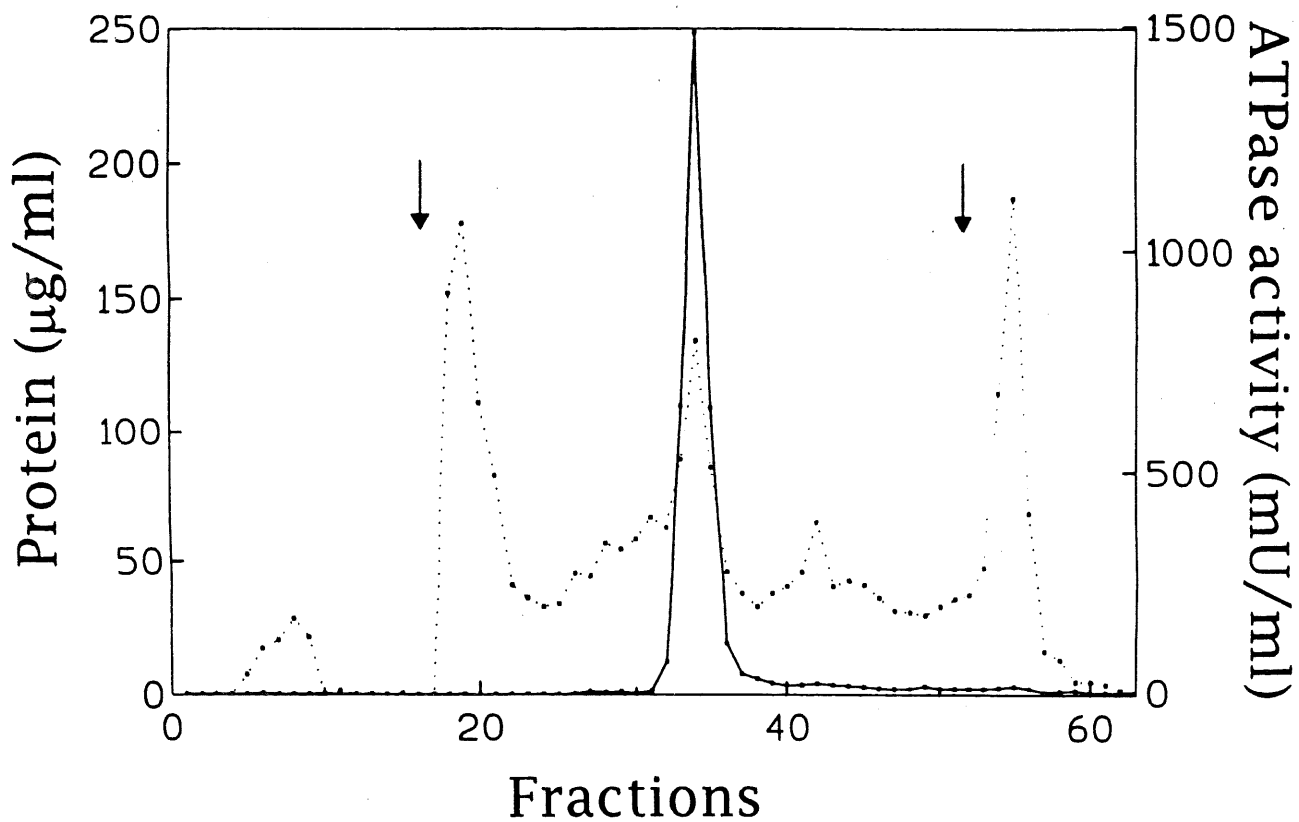


Figure 1. **DEAE-agarose chromatography of the particulate fraction solubilized with Triton X-100.** The left arrow indicates the initiation of the linear NaCl gradient (0-0.13 M), right arrow, the 2 M NaCl wash. Conditions of chromatography are described in the Experimental section. Fractions of 3 ml were collected. (····) Protein concentration; (—) ATPase activity.

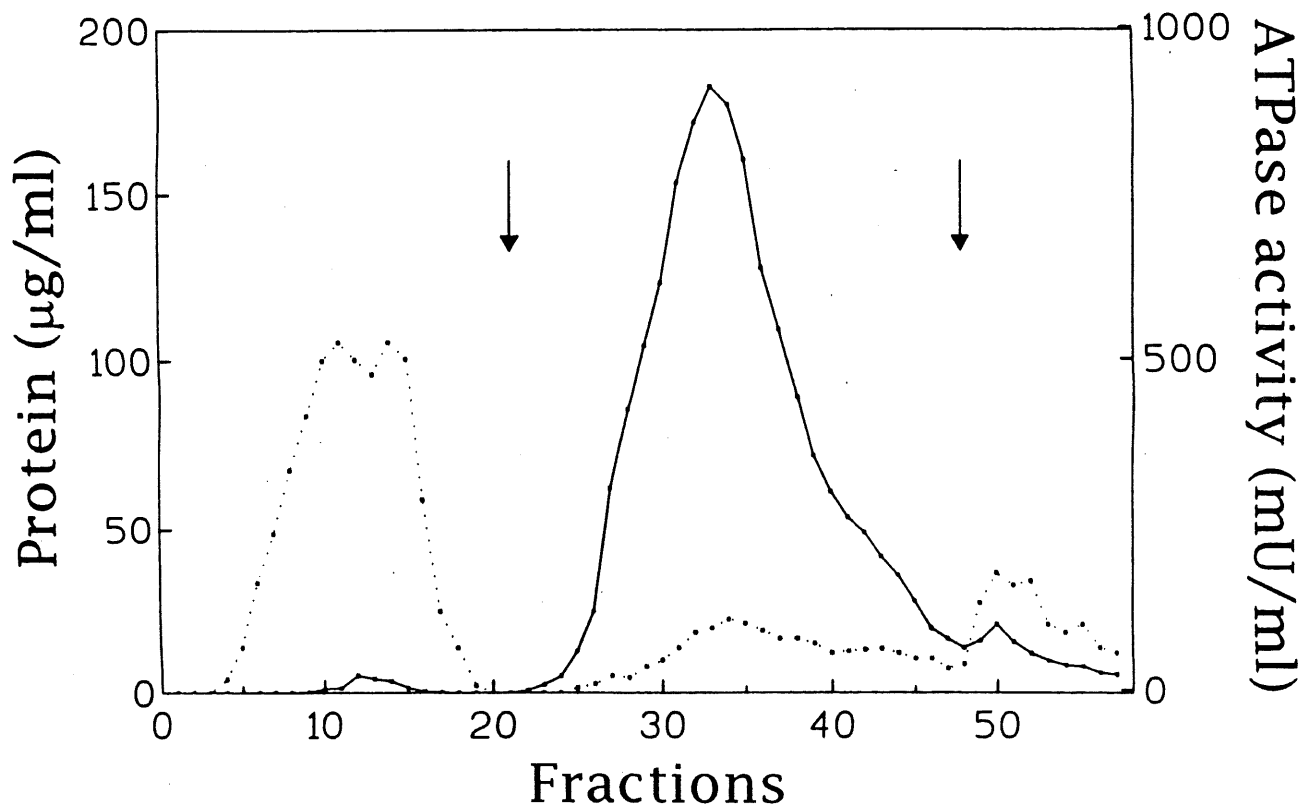
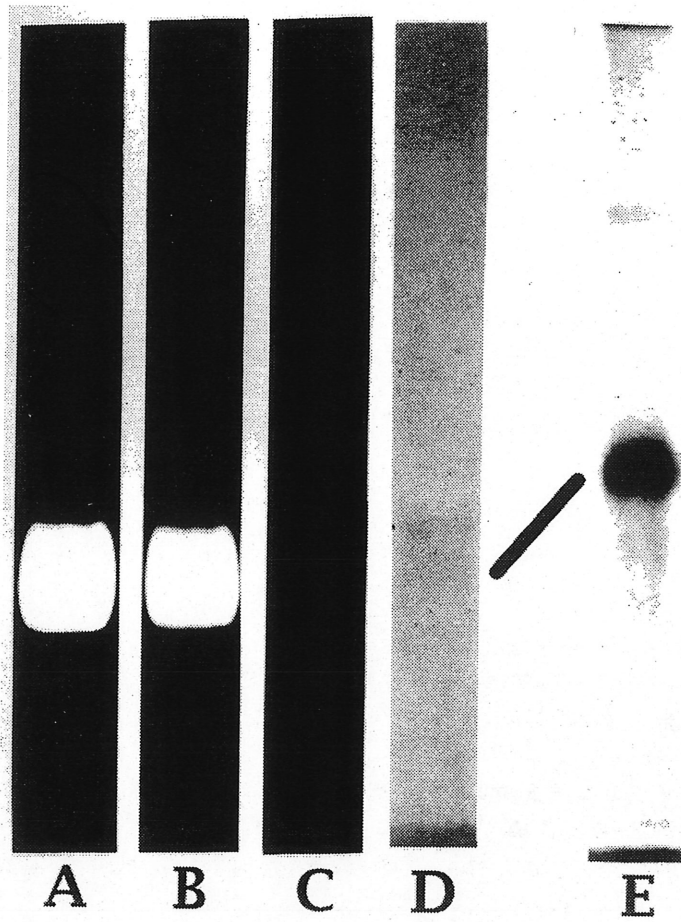


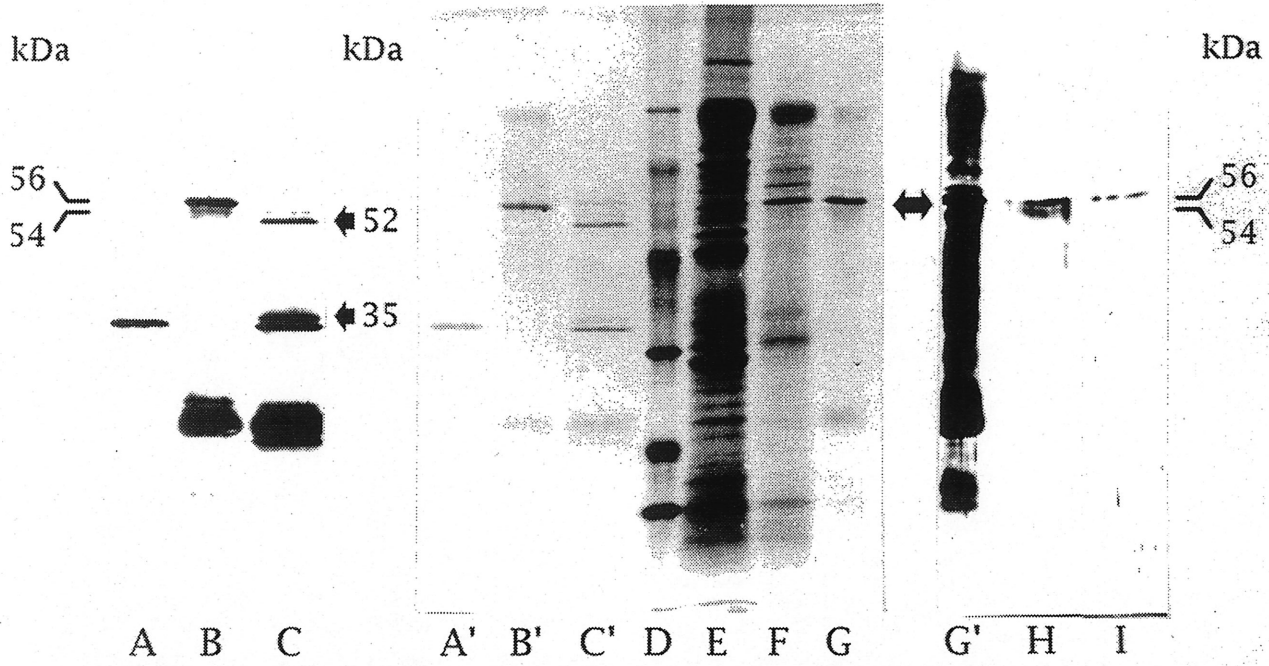
Figure 2. **Affi-Gel Blue chromatography of the active fraction from DEAE-agarose column.** The left arrow indicates the initiation of a linear gradient of NaCl and change of pH. The right arrow indicates the beginning of the wash. Conditions of chromatography are described in the Experimental section. Fractions of 3 ml were collected. (···) Protein concentration; (—) ATPase activity.

**Figure 3. Localization of the ATPDase by PAGE under non-denaturing conditions of the Affi-Gel Blue fraction.** Electrophoresis was carried out on the active fraction from the Affi-Gel Blue column as described in the Experimental section. A sample (6  $\mu\text{g}$ ) of protein were loaded in each well of lanes A-D and separated on a 4-7% polyacrylamide gel gradient. ATPDase was localized by incubating the gel for 10 min at 37°C in: 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM Tris/imidazole, pH 7.5, and 4 mM of the nucleotide ATP, ADP or AMP. Released  $\text{P}_i$  forms a white  $\text{Ca}^{2+}$  precipitate. Lane A, ATP; lane B, ADP; lane C, AMP; lane D, Coomassie Blue staining; lane E, Coomassie Blue staining, 80  $\mu\text{g}$  (new gel).





**Figure 4. SDS-PAGE protein patterns at the different steps of the purification procedure and after N-glycosidase F digestion of the Affi-Gel Blue fraction.** Protein samples were fractionated on a 8-13,5% polyacrylamide gradient and deglycosylation was carried out as described in the Experimental section. Lanes A, B and C show the results of N-glycosidase F treatment of the Affi-Gel Blue fraction (silver nitrate staining). Lane A, N-glycosidase F alone; lane B, control without N-glycosidase F; lane C, with N-glycosidase F. Lanes A', B' and C' were as above but stained with Coomassie Blue. Lanes D, E, F and G show the results of the purification procedure (Coomassie Blue staining). Lane D, molecular-mass standards: 97.4, 66.2, 45.0, 31.0, 21.5, 14.4 kDa; lane E, ZGM (100 µg); lane F, DEAE-agarose column (25 µg); lane G, Affi-Gel Blue column (6 µg). Lanes G', H and I show the last steps of the purification procedure (silver nitrate overstaining). Lane G', same as lane G; lane H, activity band from the non-denaturing gel (refers to Figure 3); lane I, control band of gel taken just above the activity band of the non-denaturing gel. The excised bands from the non-denaturing gel were incubated for 1 min in 0.4% SDS, 0.5 M Tris, pH 6.8, boiled for 5 min with 50 µl of 3X sample buffer and the mixture was loaded in the well for SDS-PAGE.



## N-glycosidase F treatment

We then investigated the possibility that the enzyme was a glycoprotein since previous reports had shown that the enzyme was bound by Concanavalin A agarose column [4]. When the Affi-Gel Blue preparation was submitted to digestion by N-glycosidase F, both bands (56 and 54 kDa) were displaced. One showed only a small shift in its molecular mass of about 4 kDa, which would correspond to one or two N-linked oligosaccharide chains (assuming a molecular mass contribution of 2-4 kDa per oligosaccharide [30]), whereas a very pronounced decrease to about 35 kDa was observed for the other band (Figure 4, lanes C and C'). Controls run in absence of N-glycosidase F failed to show any shift in those bands ruling out the possibility of a potential proteolytic cleavage (Figure 4, lanes B and B').

## FSBA Labelling

The identity of the 54 kDa protein as the ATPDase was confirmed by affinity labelling with FSBA, an ATP analogue. We recently reported that FSBA was a strong and irreversible inhibitor of ATPDase type-II from the bovine aorta [13] which forms a covalent bond with ATP-binding sites of proteins [31-33]. To label the ATP-binding protein we used the conditions described by Côté *et al.* for the bovine aorta ATPDase [34]. Labelled proteins were localized by a Western blot technique with FSBA specific rabbit polyclonal antibodies. Figure 5 B shows a specific reaction with GDH-FSBA at a dilution of 1:10,000. Polyclonal antibodies specific to the FSBA residue of the GDH-FSBA complex were purified on ATP-agarose column and as shown in Figure 5 C, no detectable reaction was found with GDH. Preimmune serum was unreactive under the same conditions (Figure 5 A). These antibodies could efficiently recognise the 54 kDa-FSBA complex diffuse band (Figure 6, lane B). Controls, where labelling was carried out in the presence of ATP (not shown) or ADP showed no signal, confirming the specificity of FSBA for the active site of the enzyme (Figure 6, lane C). Specificity of the

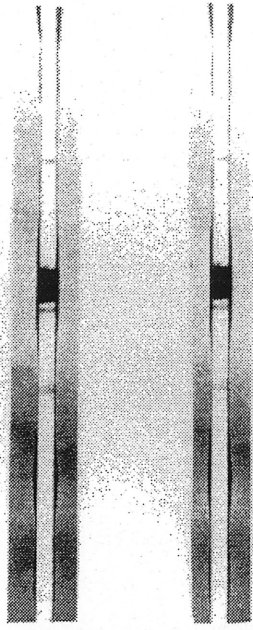
Figure 5. **Characterisation of rabbit anti-FSBA antibodies.** FSBA-labelling, blot and immunodetection were carried out as described in the Experimental section. Aliquots (50  $\mu$ g) of unlabelled GDH or GDH-FSBA labelled were loaded in each well as indicated. The anti-FSBA was purified on ATP-agarose column as described by Anostario *et al.* (24). **(A)** Preimmune serum 1:10,000; **(B)** immune serum 1:10,000; **(C)** purified anti-FSBA 1:250.

GDH GDH-FSBA



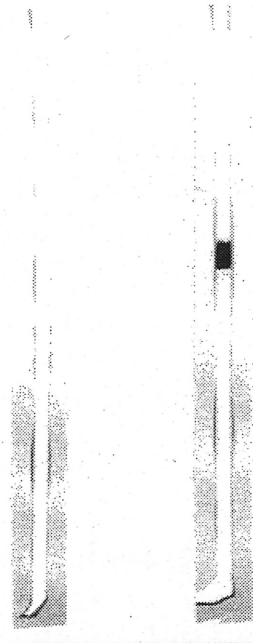
A

GDH GDH-FSBA



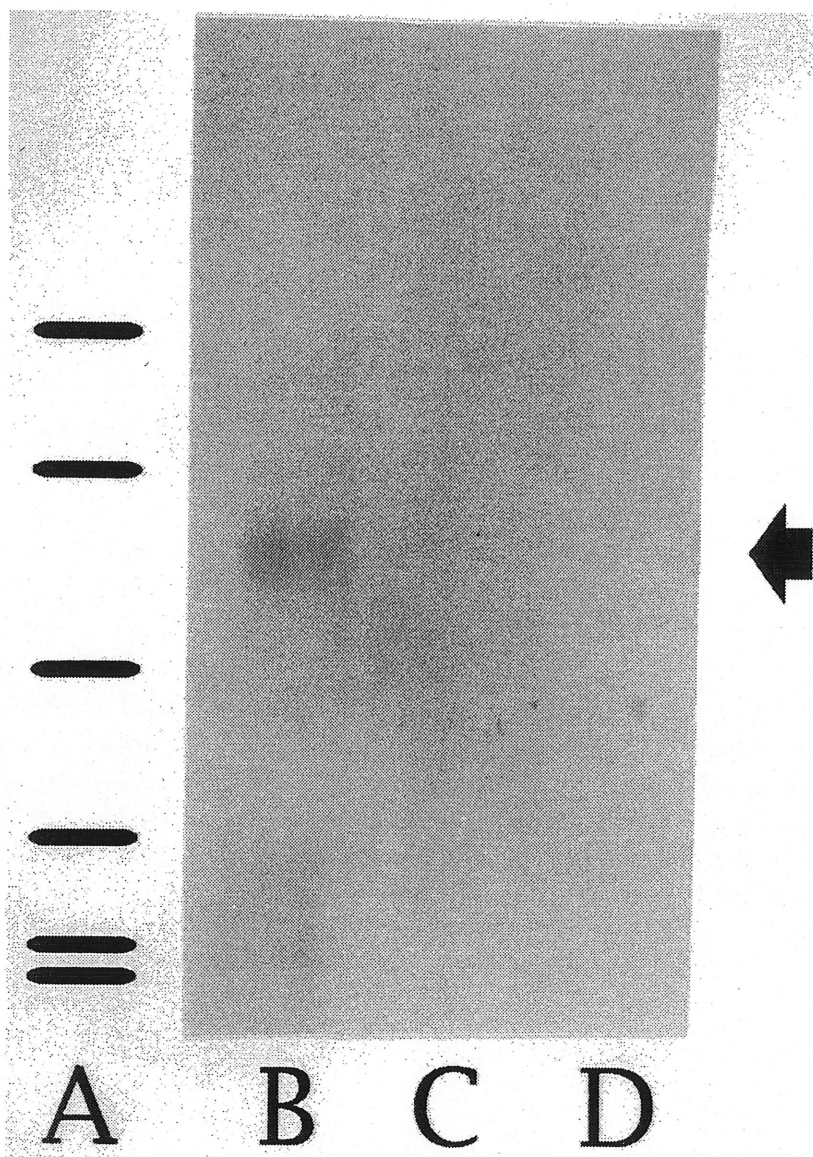
B

GDH GDH-FSBA



C

**Figure 6. Western blot of FSBA labelled samples from the Affi-Gel Blue column fraction.** Labelled sample were loaded on a SDS/7-12% polyacrylamide gel, transferred to Immobilon-P membrane, incubated with the rabbit antibody anti-FSBA and detected by a secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase as described in the Experimental section. Aliquots (6  $\mu$ g) of the Affi-Gel Blue-purified fraction were used in lanes B, C and D. Lane A, molecular-mass standards: 97.4, 66.2, 45.0, 31.0, 21.5 and 14.4 kDa; lane B, FSBA; lane C, FSBA + ADP; lane D, no labelling.





antibody was also demonstrated by the absence of reactivity with the control where the Affi-Gel Blue purified ATPDase was unlabelled (Figure 6, lane D).

## DISCUSSION

In 1980, LeBel *et al.* demonstrated the existence of a mammalian ATPDase in pig pancreas [4]. Subsequent cytochemical observations suggested that the enzyme was localized in both ZGM and plasma membranes of the pancreas exocrine cell [35,36]. Laliberté *et al.* further purified the enzyme by 5'AMP-Sepharose chromatography [5]. This procedure yielded a highly purified fraction consisting of three bands after SDS-PAGE and detection by silver staining or radioiodination techniques. Detailed kinetic studies were carried out on this purified preparation [5,6]. Vachereau (1986) later attempted to identify the polypeptide carrying the catalytic activity of the enzyme by a different procedure on the same ZGM preparation. After dialysis in the presence of ADP and mercaptoethanol, saponin treatment, and electrophoresis under non-denaturing conditions, the enzyme was localized on the acrylamide gel. Elution of the active band from the non-denaturing gel, revealed the same bands obtained by Laliberté *et al.* after SDS-PAGE and silver staining: 58, 46 and 28 kDa [37]. These proteins were poorly antigenic in rabbits and mice as indicated by the weak affinities and low titers of the antibodies obtained [37,38]. Anterior studies of Pâquet *et al.* described the ZGM-protein composition from the rat pancreas by combined isoelectric focusing and SDS-PAGE [21]. Their pattern was very similar to the one reported by Ronzio *et al.* several years before [39]. Among these proteins, four glycoproteins were found corresponding to 130 (GP1), 80 (GP2), 54 and 52 kDa (GP3 and GP4?) respectively. The two latter bands could not be clearly dissociated from each other by unidimensional electrophoresis.

The present purification procedure led to a fraction containing a doublet of proteins as assessed by SDS-PAGE and silver staining. One was a sharp band with a molecular mass evaluated at 56 kDa whereas the other (54 kDa) was a more

diffuse band overlapping and slightly below the 56 kDa band. Assuming that one of the two bands was the ATPDase type-I, we proceeded to an analysis of the amino acid sequence. An N-terminal sequence of 20 amino acids were obtained from both proteins, 56 and 54 kDa. Screening of the 56 kDa protein sequence with EMBL and GenBank revealed more than 50% identity with human lipases and the ZGM "lipase like" protein from rat pancreas identified as GP3 [40]. There was no significant similarities of the N-terminal sequence of the 54 kDa protein with any known protein. This observation ruled out the 56 kDa band, leaving the 54 kDa as the only presumptive candidate for ATPDase type-I. N-glycosidase F digestion of the Affi-Gel Blue purified fraction (54-56 kDa) resulted in a marked shift in the molecular mass down to 35 kDa for one band, and a smaller shift to about 52 kDa for the other. The observations on the previously described rat GP3 "lipase" showing only one site of N-glycosylation, lead us to believe that the 35 kDa band corresponds to the deglycosylated form of ATPDase I. This marked shift would indicate 4 to 10 N-glycosylation sites. The identity of the ATPDase catalytic unit was corroborated by affinity labelling with the ATP analogue FSBA. Indeed, the signal corresponded to the diffuse 54 kDa instead of the sharp well defined band of 56 kDa. FSBA is recognised as an efficient reagent for the affinity labelling of ATP-binding sites of protein [31-33]. Labelling could be specifically prevented by competing with an excess ATP or ADP. The immunochemical approach provides an easy and inexpensive alternative to the use of radiolabelled ligand, [ $^3\text{H}$ ] or [ $^{14}\text{C}$ ]FSBA [24]. It is noteworthy that our results on labelling with FSBA are in agreement with labelling experiments made with 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP on the ZGM proteins of pig pancreas [37,41]. The biochemical properties and the molecular mass of the ATPDase type-I differ from those reported for other mammalian ATPDases described in the literature [7,9,42].

The purification of ATPDase I brings about the questions of localization and functions of this protein. This ATPDase is associated with the ZGM in the pancreas but this localization may be transitory, since during the exocytotic process, the ZGM becomes an integral part of the plasma membrane. The enzyme is most probably inactive in the mature zymogen granules, because of the acidic conditions and the small amount of free water within these organelles. In contrast, the

biochemical conditions are much more favourable for the enzyme after exocytosis, when the catalytic site is exposed to the alkaline extracellular lumen which matches the optimum pH for catalysis of the ATPDase. Hence, it is logical that the function of the enzyme would be exerted on the external face of the luminal plasma membrane. Cytochemical studies have confirmed that an ATPDase activity is localized on both, luminal and basolateral portions of the plasma membrane of the acinar cell of rat pancreas [35,36]. In a more general way, the function of ATPDases is to dephosphorylate extracellular ATP and ADP which interact with P<sub>2</sub> purinoceptors at the cell surface [3,19]. The reaction product AMP may be converted by the ecto-5'-nucleotidase to adenosine which is responsible for the so-called P<sub>1</sub> effect. The understanding of the function of the enzyme is closely linked to its localization which can only be carried out with specific, high affinity antibodies, and so far this has not been possible. The sequencing of the protein will provide valuable information for this purpose. Knowledge of the distribution and the characterisation of both nucleotide receptors and ATPDases will facilitate the elucidation of their functional relationships and will clarify the role of the ATPDases.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We express our thanks to Johanne Proulx for her technical assistance. This work was supported by Quebec Heart and Stroke Foundation and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). J. Sévigny and Y.P. Côté are recipients of scholarships from "Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec" (FCAR) and from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

## REFERENCES

1. Kalckar, H. M. (1944) *J. Biol. Chem.* **153**, 355-367
2. Ribeiro, J. M. C. (1987) *Ann. Rev. Entomol.* **32**, 463-478
3. Beaudoin, A. R., Sévigny, J. and Picher, M. in *Biomembranes*, Vol. 5. (Lee A. G., ed.), JAI Press inc. Greenwich, CT, in the press
4. LeBel, D., Poirier, G. G., Phaneuf, S., St-Jean, P., Laliberté, J.-F. and Beaudoin, A.R. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1227-1233
5. Laliberté, J.-F., St-Jean, P. and Beaudoin, A. R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3869-3874
6. Laliberté, J.-F. and Beaudoin, A. R. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **742**, 9-15
7. Yagi, K., Arai, Y., Kato, N., Hirota, K. and Miura, Y. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 509-513
8. Yagi, K., Shinbo, M., Hashizume, M., Shimba, L. S., Kurimura, S. and Miura, Y. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 1200-1206
9. Yagi, K., Kato, N., Shinbo, M., Shimba, L. S. and Miura, Y. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2143-2146
10. Papamarcaki, T. and Tsolas, O. (1990) *Molecular and Cell. Biochem.* **97**, 1-8
11. Côté, Y. P., Picher, M., St-Jean, P., Béliveau, R., Potier, M. and Beaudoin, A. R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1078**, 187-191
12. Côté, Y. P., Filep, J. G., Battistini, B., Gauvreau, J., Sirois, P. and Beaudoin, A. R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1139**, 133-142
13. Côté, Y. P., Ouellet, S. and Beaudoin, A. R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1160**, 246-250

14. Pieber, M., Valenzuela, M. A., Kettlun, A. M., Mancilla, M., Aranda, E., Collados, L. and Traverso-Cori, A. (1991) *Comp. Biochem. Biophys.* **100B**, 281-285
15. Frassetto, S. S., Dias, R. D. and Sarkis, J. J. F. (1993) *Mol. Cell. Biochem.* **129**, 47-55
16. Kettlun, A. M., Alvarez, A., Quintar, R., Valenzuela, M. A., Collados, L., Aranda, E., Banda, A., Chayet, L., Chiong, M., Mancilla, M. and Traverso-Cori, A. (1994) *Int. J. Biochem* **26**, 437-448
17. Picher, M., Béliveau, R., Potier, M., Savaria, D., Rousseau, É. and Beaudoin, A. R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1200**, 167-174
18. Côté, Y. P., Pavate, C. T. and Beaudoin, A. R. (1993) *Current Topics Pharmacol.* **1**, 83-93
19. Sévigny, J. and Beaudoin, A. R. (1994) *médecine/sciences* **10**, 836-844
20. Picher, M., Côté, Y. P., Béliveau, R., Potier, M. and Beaudoin, A. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4699-4703
21. Pâquet, M. R., St-Jean, P., Roberge, M. and Beaudoin, A. R. (1982) *Eur. J. Cell. Biol.* **28**, 20-26
22. Baykov, A. A., Evtushenko, O. A. and Avaeva, S. M. (1988) *Anal. Biochem.* **171**, 266-270
23. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
24. Anostario, M. Jr., Harrison, M. L. and Geahlen, R. L. (1990) *Anal. Biochem.* **190**, 60-65
25. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
26. Merril, C. R. (1990) *Methods Enzymol.* **182**, 477-488

27. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350-4354
28. Schaffner, W. and Weissman, C. (1973) Anal. Biochem. **56**, 502-514
29. Harlow, E. and Lane, D. (1988) in Antibodies: A laboratory manual. (Harlow, E., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
30. Bartles, J. R., Braiterman, L. T. and Hubbard, A. L. (1985) J. Biol. Chem. **260**, 12792-12802
31. Colman, R. F. (1983) Annu. Rev. Biochem. **52**, 67-91
32. Buhrow, S. A. and Staros, J. V. (1985) Methods Enzymol. **109**, 816-827
33. Allison, W. S., Bullough, D. A. and Andrews, W. W. (1986) Methods Enzymol. **126**, 741-761
34. Côté, Y. P. (1993) Caractérisation de l'ATP diphosphohydrolase de l'aorte de boeuf. Ph.D. thesis. Sherbrooke University, Sherbrooke, Québec, Canada
35. Beaudoin, A. R., Laliberté, J.-F., LeBel, D., Lord, A., Grondin, G., Phaneuf S. and St-Jean, P. (1980) in Biology of Normal and Cancerous Exocrine Pancreatic Cells (Ribet, A., Pradayrol, L. and Susini, C., eds.) INSERM Symposium No. 15 pp. 273-280, Biomedical Press, Elsevier, North Holland
36. Beaudoin, A. R., Grondin, G., Lord, A., Roberge, M. and St-Jean, P. (1983) Eur. J. Cell Biol. **29**, 218-225
37. Vachereau, A. (1986) Immunodétection de l'ATP diphosphohydrolase dans les cellules eucaryotiques. Ph.D. thesis. Sherbrooke University, Sherbrooke, Québec, Canada
38. Gauthier, B. (1987) Phosphohydrolases du pancréas, production d'anticorps monoclonaux de l'ATP diphosphohydrolase. M.Sc. thesis. Sherbrooke University, Sherbrooke, Québec, Canada

39. Ronzio, R. A., Kronquist, K. E., Lewis, D. S., MacDonald, R. J., Mohrlök, S. H. and O'Donnell, J. J. Jr. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **508**, 65-84
40. Wishart, M. J., Andrews, P. C., Nichols, R., Blevins G. T. Jr., Logsdon, C. D. and Williams, J. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10303-10311
41. LeBel, D. and Beattie, M. (1986) *Biochem. Cell Biol.* **64**, 13-20
42. Moodie, F. D. L., Baum, H., Butterworth, P. J. and Peters, T. J. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 1209-1215

## CHAPITRE 2

### PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE L'ATP DIPHOSPHOHYDROLASE TYPE II, ET IMMUNOLOCA- LISATION DE L'ENZYME DANS L'AORTE DE BOEUF

Côté *et al.* (1991) ont montré que l'ATPDase de l'aorte de boeuf possède des propriétés biochimiques différentes de celles du pancréas de porc. Bien qu'ils n'aient pas purifié ces enzymes, ils avaient proposé de nommer ces deux formes d'ATPDase: type I pour l'enzyme du pancréas de porc, et type II pour celle de l'aorte de boeuf. Dans le premier chapitre, nous avons identifié l'ATPDase type I; dans ce deuxième chapitre, nous décrivons la purification et la caractérisation de l'ATPDase type II. Cette dernière possède une masse moléculaire apparente de 78 kDa et contient l'équivalent d'une masse de 24 kDa de chaînes de sucres liées par l'asparagine, tel qu'estimé par électrophorèse en gel d'acrylamide. À l'extrémité des chaînes de sucres on a détecté des groupements mannosés et/ou glucoses, et l'absence de *N*-acétylgalactosamine et de  $\alpha$ -L-fucose. La liaison du FSBA à cette protéine a confirmé la présence d'un site de liaison à l'ATP. Un anticorps dirigé contre les 16 premiers acides aminés de la séquence N-terminale de l'ATPDase type I de porc a été produit, et a réagi avec les ATPDases types I et II, du porc et du boeuf. Cet anticorps a permis de confirmer la présence de l'ATPDase dans les cellules endothéliales et musculaires lisses de l'aorte bovine.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication parue en 1997 dans le journal *Biochimica et Biophysica Acta*, volume 1334, pages 73-88. Nous remercions monsieur G. Grondin pour l'étude de la localisation immunocytochimique de l'enzyme et monsieur F.P. Levesque qui a fourni une aide technique appréciée dans les premières étapes de la purification de grandes quantités d'enzymes.



**Purification of the Blood Vessel ATP  
Diphosphohydrolase, Identification and Localization by  
Immunological Techniques**

Jean Sévigny, Francis P. Levesque, Gilles Grondin and Adrien R. Beaudoin

Département de biologie, Faculté des sciences,  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Québec, CANADA, J1K 2R1

## ABSTRACT

ATP diphosphohydrolase (ATPDase) or apyrase (EC 3.6.1.5), an enzyme that hydrolyses the  $\gamma$  and  $\beta$  phosphate residues of triphospho- and diphosphonucleosides, has been purified from the bovine aorta media. A particulate fraction was isolated by differential, and sucrose cushion centrifugations, producing a 33-fold enrichment in ADPase activity. Solubilization of the enzyme from the particulate fraction with Triton X-100 caused a partial loss of activity. The solubilized enzyme was purified by DEAE-agarose, Affi-Gel Blue and Concanavalin A column chromatographies yielding an additional 138-fold enrichment of the enzyme. The enzyme preparation was further purified by PAGE under non-denaturing conditions, followed by its detection on the gel. The active band was cut out and separated by SDS-PAGE. Overstaining with silver nitrate revealed a single band corresponding to a molecular mass of 78 kDa. Presence of an ATP binding site on the latter protein was demonstrated by labelling with 5'-*p*-fluoro-sulfonylbenzoyl adenosine (FSBA), an analogue of ATP, followed by its detection by a Western blot technique. Labelling specificity was demonstrated by competition experiments with Ca-ATP and Ca-ADP. An antiserum directed against the N-terminal sequence of the pig pancreas ATPDase (54 kDa) cross-reacted with the bovine aorta ATPDase at 78 kDa. Digestion of the ATPDase with N-glycosidase F caused a marked shift of the molecular mass, thereby showing multiple *N*-oligosaccharide chains. Immunohistochemical localization confirmed the presence of ATPDase on both endothelial and smooth muscle cells.

## INTRODUCTION

Extracellular nucleotides interact with specific receptors and elicit a variety of actions on the different physiological systems of the vertebrates. In the cardiovascular system, purinoceptors which respond to ATP, ADP and adenosine have been found on blood cells, blood vessel cells and heart cells [1-3]. Pharmacological effects of these nucleotides and their derivative have been recently

reviewed [2-9]. In the cardiovascular system, major processes such as platelet aggregation and inflammation, control of vascular tone, and heart function [2,3,10-14] are influenced by extracellular nucleotides. Blood nucleotides originate from a variety of sources [3,10,15] including blood cells, platelets and endothelial cells. Those found within the vessel wall are in part derived from nerve terminals and smooth muscle cells. Cardiomyocytes and skeletal muscle cells represent other sources of nucleotides which vary according to physiological states (hypoxia, exercise). Broken cells resulting from wounds or pathologies can be added to these various sources.

The physiological response of a given cell to extracellular nucleotides depends on four main parameters: first, the affinity of the nucleotide or nucleoside for its receptor; second, receptor density; third, receptivity defined by the sequence of intracellular events induced by the plasma membrane signal. Finally, the fourth important parameter is concentration of the ligand in the immediate environment of the cell. In the latter respect, ectonucleotidases which carry out the hydrolysis of the  $\gamma$ ,  $\beta$  and  $\alpha$  phosphate residues of phosphonucleosides play a determinant role since different purinoceptors interact with ATP or ADP or adenosine respectively.

ATPase, ADPase and AMPase activities have been reported on blood cells, blood vessel cells and cardiomyocytes [16-24]. A sequential conversion of extracellular ATP to AMP has been recently attributed to a single enzyme, an ATP diphosphohydrolase (ATPDase: EC 3.6.1.5), which was originally found in the pancreas [25], and later in other mammalian tissues including bovine aorta [26,27] and other tissues and cells from the vascular system [28-32]. By definition ATPDase has a wide substrate specificity since it catalyses the hydrolysis of  $\gamma$  and  $\beta$  phosphate residues from triphospho- and diphosphonucleosides, converting them to their nucleoside monophosphate derivative (for ex.  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP}$ ). The release of  $\alpha$  phosphate from AMP is catalysed by the ecto-5'-nucleotidase, a well characterised enzyme [33]. We previously reported ATPDases from different sources which showed distinct biochemical properties: pig pancreas ATPDase

[25,34,35], bovine aorta ATPDase [27,36,37], and bovine lung ATPDase [38]. We recently reported the purification of pig pancreas ATPDase, which is a protein of 54 kDa that bears multiple glycosylation sites [39]. In this work, we describe the purification and identification of the bovine aorta ATPDase. We also show the cellular localization with an antiserum specific to ATPDase.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials**

5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyladenine (FSBA) and mouse monoclonal antibodies to rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase were obtained from Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA; agarose-bound lectins: Concanavalin A (Con A), Wheat germ agglutinin (WGA), Soybean agglutinin and *Ulex europaeus* I agglutinin (UEA) were bought from Vector Laboratories, inc., Burlingame, CA, USA; N-glycosidase F (PNGase F) was purchased from Boehringer-Mannheim, Laval, Québec, Canada; Affi-Gel Blue and DEAE Bio-Gel A agarose were obtained from Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada.

### **ATPDase purification**

#### *Isolation of the particulate fraction*

Bovine aortas, obtained from the Abattoir Giroux in Bromptonville (Qué.), were kept on ice and processed within one hour after death. All the purification steps were carried out at 4°C. First, the inner layer of the aorta was stripped out manually, passed through a meat grinder, and homogenised (10%) with a Polytron in the following solution: 95 mM NaCl, Soybean Trypsin Inhibitor (20 µg/ml), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 45 mM Tris-HCl, pH 7.6.

Soybean Trypsin Inhibitor and PMSF are protease inhibitors used as a precautionary measure [40]. After filtering with cheesecloth, the homogenate was centrifuged at 600 g for 15 min. The supernatant was centrifuged at 22,000 g for 90 min with a Beckman JA-14. The resulting pellet was suspended in 0.1 mM PMSF and 1 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 10.0 with a Potter at a dilution of 5 mg protein per ml. The suspension was loaded on a 40% (w/v) sucrose cushion and centrifuged at 100,000 g for 2h30 with a SW 28 Beckman rotor. The enzyme was recovered on the cushion and kept at 4°C overnight. This membrane preparation was then suspended in 10 volumes of 0.1 mM PMSF, 1 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 10.0 and centrifuged at 240,000 g for 45 min in a SW 50.2 Beckman rotor. The pellet was rinsed twice: once with 0.1 mM PMSF, 10 mM Tris pH 8.0 and once with 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8.0. The final pellet was suspended in 7.5% (v/v) glycerin and 5 mM Tris, pH 8.0, at a concentration > 1 mg protein per ml and either frozen at -20°C, or directly solubilized. At this stage the specific activity of the ATPDase was enriched by about 33 fold as previously reported [27].

#### *Solubilization and column chromatographies*

Before we describe *in extenso* the purification procedure we will summarise the main steps. After enrichment of a particulate fraction in plasma membrane by centrifugation on sucrose cushion, membrane proteins were solubilized with Triton X-100. ATPDase, in a solubilized protein fraction, was purified by column chromatographies: ion exchanger (DEAE-agarose) followed by an Affi-Gel Blue column known to have an affinity for nucleotide binding proteins. The next purification step was either an electrophoresis under non-denaturing condition which permit to recover the enzyme activity in the gel, or a Con A column chromatography which bind mannose and/or glucose rich glycoproteins. In detail, the particulate fraction was solubilized with 0.3% (v/v) Triton X-100 in 30 mM Tris pH 8.0 at a concentration of 1 mg protein per ml and centrifuged at 100,000 g for 1 h. The supernatant fraction was loaded on a DEAE Bio Gel A agarose (20 ml beads) preequilibrated with 0.1% (v/v) Triton X-100, 7.5% (v/v) glycerin and 10 mM Tris, pH 8.0. Protein was eluted by a NaCl gradient (0.03-0.12 M) in the same buffer, followed by a 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 M NaCl wash. Active

fractions were pooled in 0.1X buffer E (5X buffer E: 0.5% (v/v) Triton X-100, 960 mM glycine, 125 mM Tris, pH 7.0) and electro dialysed in 15 ml cuvettes by an ISCO electro-eluter according to the following technique: 1X buffer E was loaded in the apparatus and 15 mA was applied per cuvette. The 1X buffer E was changed 4 times, at every 50 min. The dialysate was equilibrated at pH 5.9 with 200 mM histidine adjusted to pH 4.0 with HCl (about 20 mM histidine final) and loaded on an Affi-Gel Blue column (10 ml beads) preequilibrated with 0.07% (v/v) Triton X-100, 7.5% (v/v) glycerin, 20 mM histidine and 30 mM Tris, pH 5.9. Proteins were eluted by a linear gradient made of buffer A and B; buffer A (80 ml): 0.07% (v/v) Triton X-100, 7.5% (v/v) glycerin and 10 mM Tris pH 6.5; buffer B (80 ml): 1 M NaCl, 0.07% (v/v) Triton X-100, 7.5% (v/v) glycerin and 10 mM Tris-HCl pH 7.5; followed by a 1 M NaCl, 0.07% (v/v) Triton X-100, 100 mM Tris pH 8.5 wash. The active fraction was then dialysed against 0.05% (v/v) Triton X-100, 1 mM Tris pH 8.0, concentrated on a 1 ml DEAE-agarose column as described above, eluted in 0.4 M NaCl, 0.07% (v/v) Triton X-100, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 and dialysed against water. We then proceeded to a separation by PAGE under non-denaturing conditions as described by Côté *et al.* [36]. PAGE bands, revealed by incubation with the substrate ADP, were excised, incubated for 1 min in 0.4% SDS, 0.5 M Tris, pH 6.8, the buffer was discarded and the gel boiled for 8 min in 50  $\mu$ l of 3X sample buffer (see below). The boiled mixture was loaded in a well and fractionated by SDS-PAGE. Further purification of the Affi-Gel Blue fraction was also obtained by Con A agarose column chromatography. Briefly, Con A (4 ml beads) and the protein sample from the Affi-Gel Blue column were preequilibrated with 0.05 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> and 20 mM 1,4-piperazinediethane-sulfonic acid (PIPES), pH 6.8. The protein sample was loaded on the column, the unbound protein were washed with 40 ml of the preequilibration buffer. Bound protein was eluted with 20 ml of 0.5 M Me- $\alpha$ -D-mannopyranoside diluted in the preequilibration buffer. The purified sample was dialysed and concentrated on a mini-DEAE column as described above. Column were used at a flow rate of 5-15 ml/h in all cases.

### **ATPDase assays**

Enzyme activity was determined at 37°C in 1 ml of: 8 mM CaCl<sub>2</sub>, 200 μM substrate (ATP or ADP), 50 mM imidazole, 50 mM Tris, pH 7.5 [41]. This substrate concentration corresponds to about 15 times the apparent  $K_m$  (Michaelis constant) of the enzyme [41]. Reaction was stopped with 0.25 ml of malachite green reagent, and P<sub>i</sub> was estimated according to Baykov *et al.* [42]. One unit of ATPDase activity corresponds to the release of 1 μmol P<sub>i</sub>/min at 37°C. Protein was estimated by the technique of Bradford [43] using bovine serum albumin as the standard of reference.

### **PNGase F treatment**

PNGase F treatment was carried out according to the manufacturer's recommendations (Boehringer-Mannheim, Laval, Québec, Canada). Six μg or less of purified protein from the Con A agarose column were boiled for 5 min in 0.2% SDS and 0.2% (v/v) 2-mercaptoethanol in a final volume of 40 μl. The solution was then added to an incubation medium containing 0.4% (v/v) Triton X-100, 10 mM EDTA, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, and 0.5 units of PNGase F in a final volume of 200 μl. After a 12 h incubation at 37°C, the incubation medium was dialysed, lyophilized and fractionated by SDS-PAGE.

### **Sedimentation of ATPDase activity with lectin-agarose**

Four different lectin-agarose conjugates were used: Con A, WGA, Soybean agglutinin and UEA-agarose. Binding and elution of proteins were carried out according to the manufacturer's recommendations (Vector Laboratories, inc., Burlingame, CA, USA). Experiments were carried out at 4°C. Briefly, 100 μl of 50% slurry of each lectin-agarose conjugate were put in a microcentrifuge tube

and washed 4 times with 1 ml buffer A (0.05% (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl and 20 mM PIPES, pH 6.8). In the case of Con A, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MnCl<sub>2</sub> were added to the buffer. Twenty µg of purified ATPDase from the Affi-Gel Blue column, equilibrated in buffer A, were added to each of the lectin-agarose beads and rocked for 45 min, then centrifuged for 1 min. The supernatant was kept and the beads washed 3 times with 1 ml buffer A. Protein bound to the lectins was eluted with 150 µl of 500 mM of the appropriate sugar in buffer A, rocked for 30 min and centrifuged. The elution step was repeated once and the 2 eluates were combined. The sugars used to eluate protein from Con A, WGA, Soybean and UEA were Me- $\alpha$ -D-mannopyranoside, *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) and fucose respectively.

### **FSBA labelling and SDS-PAGE**

Labelling procedure was carried out essentially as previously described with minor modifications [39]. Twenty µg of the purified enzyme from the Affi-Gel Blue column was mixed with 150 mM KCl, 5% (v/v) dimethylsulfoxide, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.125 mM FSBA as estimated by extinction coefficient ( $1.35 \times 10^4$ /cm/M in ethanol) and 36 mM Tris-acetate, pH 7.5, in a final volume of 1 ml. The labelling reaction carried out at 37°C, was started by adding FSBA, and stopped after 5 min with 100 mM 1,4-dithiothreitol and 0.1% SDS. For the competition experiments, 10 mM ADP or ATP (substrate) was added 5 min before FSBA. After incubation, the medium was dialysed for 8 h against water, at room temperature. The dialysate was lyophilized and resuspended in 150 µl of 1X sample buffer: 2% (w/v) SDS, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerin, 0.001% Bromophenol Blue in 65 mM Tris, pH 6.8 and incubated for 20 min at 37°C. Proteins were separated by SDS-PAGE on a 8-13.5% polyacrylamide gradient according to Laemmli [44]. Labelled proteins were detected by a Western blot technique using rabbit antibodies to FSBA. Proteins of other SDS-PAGE were detected with Coomassie Blue or by silver nitrate diamine staining [45].



## **ATPDase antibodies**

A high density multigenic peptide system (MAPS) was synthesized with peptides corresponding to the N-terminal sixteen amino acid of pancreas ATPDase (KSDTQETYGALDLGGA) according to the procedure of Tam [46] by the "Service de Séquence de Peptides de l'Est du Québec", CHUL research center, Québec. This approach used a small peptidyl core matrix of four lysine residues bearing four branching peptides. Rabbits were immunized with 300 µg of the peptide complex dissolved in 0.5 ml of phosphate buffered saline and 0.5 ml of Freund's complete adjuvant: 400 µl were injected intra-muscularly and the rest at three sites subcutaneously. After six weeks, the animal received a boost of 150 µg of the antigen in 1 ml of phosphate buffered saline comprising one intramuscular (200 µl) and four subcutaneous injections. The second boost was given six weeks later with 75 µg of the antigen. Between day four and nine after the second boost, blood was collected daily and the antibody titer was measured by a Western-blot technique using pancreas ATPDase from zymogen granule membrane [39]. When the antibody titer reached a level of detection at a dilution of 1:50,000, rabbits were anaesthetized with Somnotol (0.5-1 ml/5 pounds), bled by canulation of the femoral artery, and their serum kept at -70°C.

## **Immunoblotting procedure**

FSBA-labelled fractions were separated by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P sheets as described by Towbin *et al.* [47]. Blots were stained with either Ponceau S (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) or 0.1% Amido Black according to Schaffner & Weissman [48]. Immunodetection was carried out as previously described [39]. The primary antibody was either a rabbit polyclonal anti-FSBA (1:10,000) or a rabbit polyclonal anti-ATPDase (1:10,000). The secondary antibody was a mouse monoclonal anti-rabbit IgG (1:6,000) conjugated to alkaline phosphatase. Antibodies were detected with NBT/BCIP according to Harlow & Lane [49]. FSBA polyclonal antibodies has been previously described

[39]. Briefly, these antibodies react specifically against the FSBA conjugated to glutamate dehydrogenase as shown by Western immunoblot [39].

### **Immunohistochemistry**

Freshly dissected aorta was fixed overnight in 2% paraformaldehyde, 0.17% glutaraldehyde in 0.1 M Na cacodylate buffer, pH 7.4, with 4% sucrose. Tissue was dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in paraffin. Paraffin sections were cut at 4  $\mu\text{m}$  thickness and mounted on polyionic slides (Superfrost Plus Fisher, Montreal, Québec, Canada). Paraffin was removed with xylene and tissues rehydrated through graded ethanol to water, after a rinse in 150 mM NaCl, 0.1 M Tris, pH 7.5 (TBS). Sections were treated in 0.1 M glycine in TBS for 10 min. The slides were subjected to pressure cooker heat induced epitope retrieval procedure [50] in 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.0 for 9 min. After a wash in TBS at room temperature for 10 min, non-specific binding sites were blocked for 30 min at room temperature with 1% bovine serum albumin and 1% fat free skim milk in TBS. Sections were incubated overnight at 4°C with the ATPDase anti-serum, or preimmune serum (1:100), washed in TBS several times, and incubated with mouse monoclonal anti-rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase at a dilution of 1:100 for 2 h at room temperature. After several washings, visualisation was carried out by the alkaline phosphatase reaction with NBT/BCIP. Sections were mounted in 5% gelatin, 27% glycerol, and 0.1% sodium azide, preheated at 45°C. Photographs were taken under bright field illumination using a Zeiss photomicroscope on Kodak T Max 100 film.

## RESULTS

### ATPDase purification

The different steps of the purification procedure are summarised in Table 1. The particulate fraction isolated according to Côté *et al.* [27] displayed an ADPase specific activity of 0.9 unit/mg of protein which represents a 33-fold enrichment as compared to the activity in the homogenate [27]. The solubilization step, with Triton X-100, caused a substantial loss of activity (56%) with a corresponding recovery of about 70% of protein. The enzyme was quite stable throughout the subsequent steps of the purification procedure. DEAE and Affi-Gel Blue chromatographies were efficient steps of purification showing successive 10- and 5-fold enrichments in enzyme activity respectively (Figure 1 and 2). With the Con A-agarose column, the specific activity increased to 55 units/mg of protein, with ADP as the substrate. PAGE of the active fraction from the Affi-Gel Blue column, under non-denaturing conditions, allowed further purification while confirming the capacity to hydrolyse specifically ATP and ADP but not AMP (Figure 3). Two major bands of activity can be seen on this electrophoregram with either ATP or ADP as the substrate and these are identified by I and II on Figure 3. The most intense band of activity, (I) as shown by the intensity of  $P_i$ -Ca precipitate, was cut out from the gel where indicated by the black rectangle on Figure 3, and separated by SDS-PAGE. As shown in Figure 4 (N-D. gel) it contains a single polypeptide with a  $M_r$  estimated at 78,000. The second band of activity (II) contains the same protein at 78 kDa as observed by SDS-PAGE. However, in the latter case some additional proteins were associated indicating that on its native state the enzyme may form complexes with other proteins (data not shown). Figure 4 also illustrates the SDS-PAGE patterns of protein composition corresponding to the successive steps of the purification procedure. As expected, one notices a progressive increase in the relative proportions of the 78 kDa band up until it reached homogeneity at the last step of purification corresponding to electrophoresis under non-denaturing conditions. Overstaining the electrophoregrams with silver nitrate revealed some contaminant bands which are

**Table 1. ATPDase purification, from the particulate fraction**

Step	Total protein mg	Total activity units	Specific activity units/mg	Yield %	Purification factor fold	Hydrolysis rate ATP/ADP
Particulate fraction (pf)	293	263	0.9	-	(33) <sup>†</sup>	1.5
pf + Triton X-100	293	117	0.4	100	1	1.4
100,000 g supernatant of solubilized pf	186	91.2	0.5	78	1.2	1.3
DEAE column	15.1	72.2	4.8	62	11.9	1.1
Affi-Gel Blue column	2.76	57.8	21	49	53	1.1
Con A column	0.61	33.5	55	29	138	1.1

A representative out of five complete procedures is shown, ADP as substrate. Determinations were routinely carried out in triplicate.

<sup>†</sup> The particulate fraction (pf) showed a 33-fold enrichment of ADPase activity as compared to the homogenate [27].

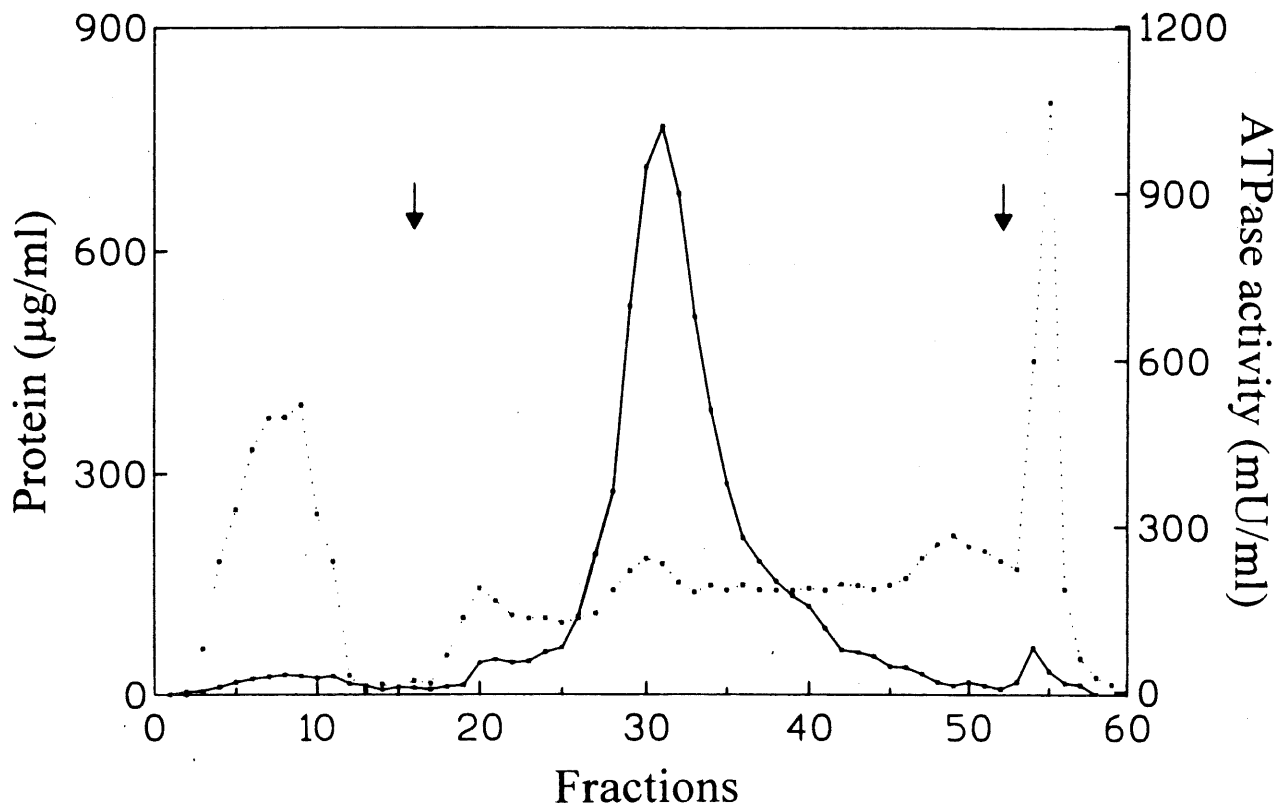


Figure 1. **DEAE-agarose chromatography of the particulate fraction protein solubilized with Triton X-100.** Arrow on the left indicates the start of the NaCl gradient and the arrow on the right the wash with 2M NaCl. Fractions 28-35 were pooled and used for the next step of purification. (···) Protein concentration; (—) ATPase activity.

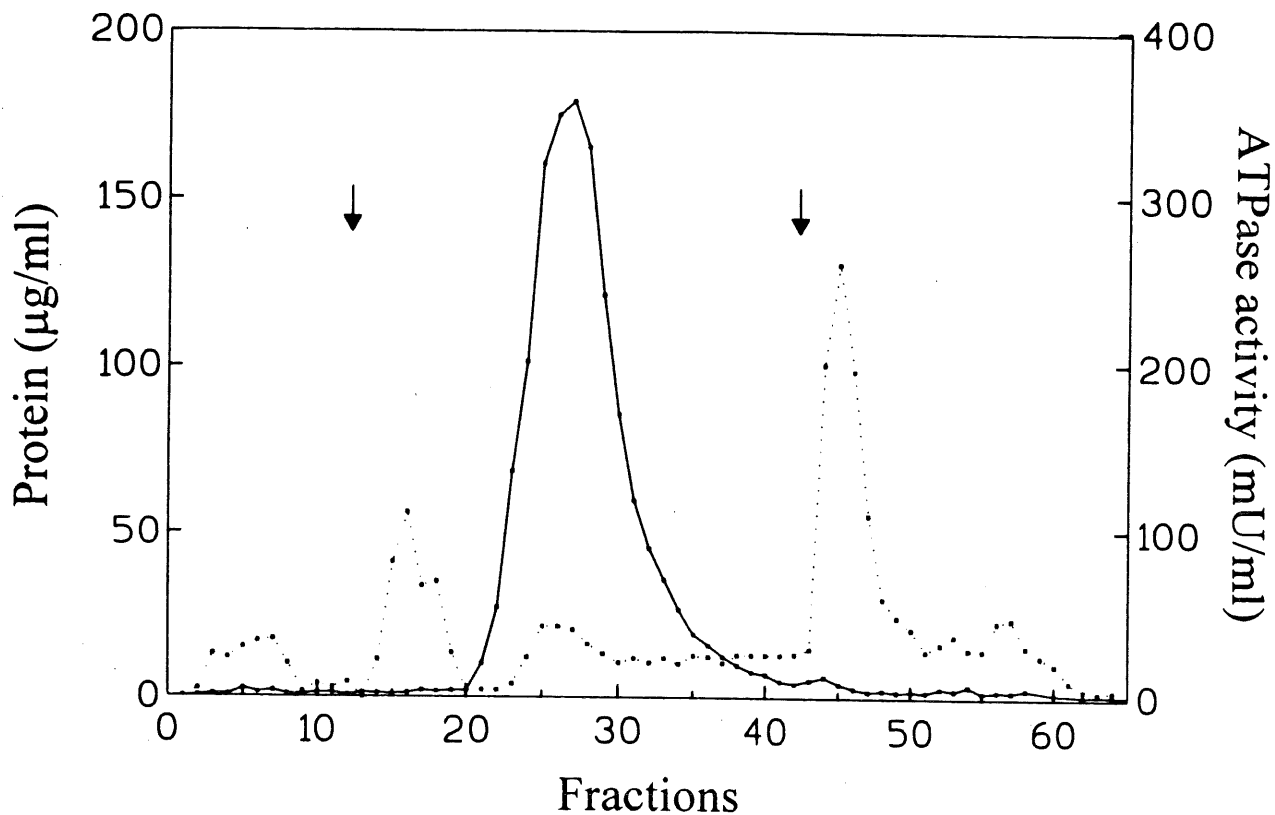


Figure 2. **Affi-Gel Blue chromatography of the active fraction eluted from the DEAE-agarose column.** Arrow on the left indicates the start of NaCl and pH gradients. Arrow on the right indicates a wash with: 1M NaCl, 0.07% (v/v) Triton X-100 and 100 mM Tris, pH 8.5. Fractions 23-30 were pooled and used for the next step of purification or FSBA labelling. (....) Protein concentration; (—) ATPase activity.

**Figure 3. Localization of ATPDase after PAGE under non-denaturing conditions of the Affi-Gel Blue fraction.** Thirty  $\mu\text{g}$  were loaded in each lane on a 4-7.5% polyacrylamide gradient. ATPDase was localized by incubating the gel for 10 min, at 37°C in: 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM Tris-imidazole, pH 7.5, and 4 mM of the nucleotide: ATP or ADP or AMP. Liberated  $\text{P}_i$  forms a white precipitate with  $\text{Ca}^{2+}$  at reaction sites. Protein was stained with Coomassie Blue. Notice similar migration patterns of ATPase and ADPase activities (bands I and II) and the absence of reaction with AMP.

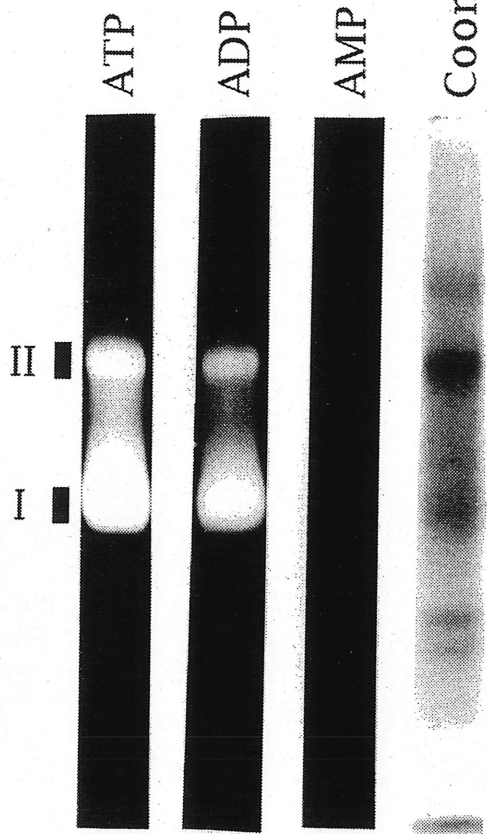
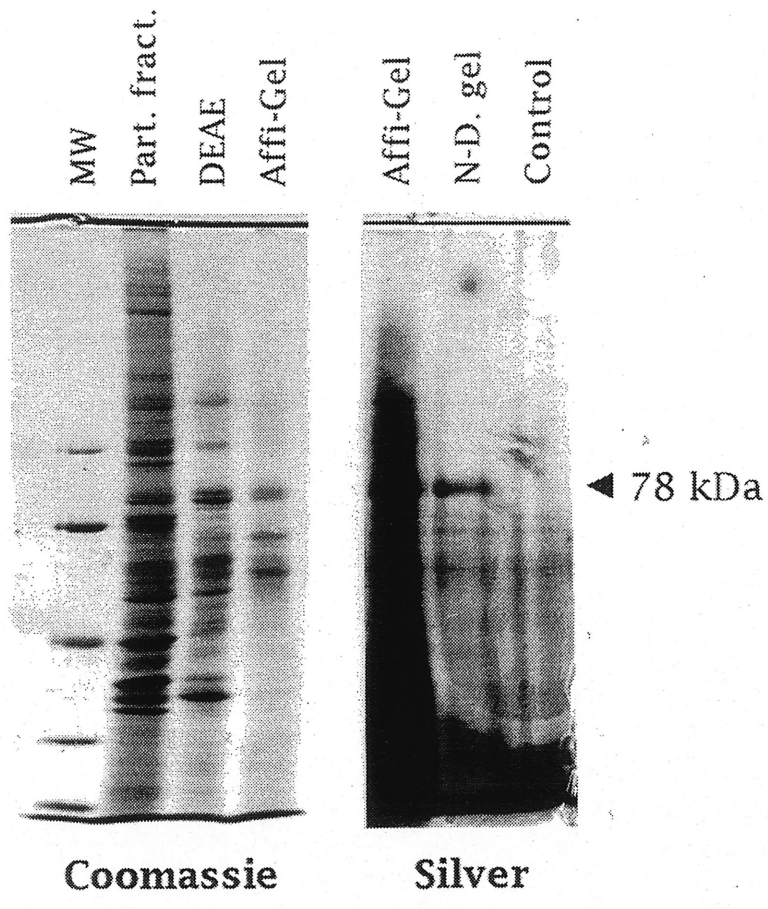




Figure 4. **Protein composition at the different steps of the purification procedure as determined by SDS-PAGE.** Electrophoresis was run in a 7-12,5% polyacrylamide gel. Protein was stained with Coomassie Blue or silver nitrate. Molecular-mass standards (MW): 97.4, 66.2, 45.0, 31.0, 21.5, 14.4 kDa; particulate fraction (Part. fract.), 100  $\mu$ g; DEAE-agarose fraction, 35  $\mu$ g; Affi-Gel Blue fraction, 20  $\mu$ g; band I of activity from Figure 3, which corresponds to the band with the most intense Ca-P<sub>i</sub> precipitate, cut out from the non-denaturing gel (N-D. gel); sample buffer alone (Control).



also present in control lanes at the same intensity, and therefore can not be attributed to the purified enzyme fraction (Figure 4, Control).

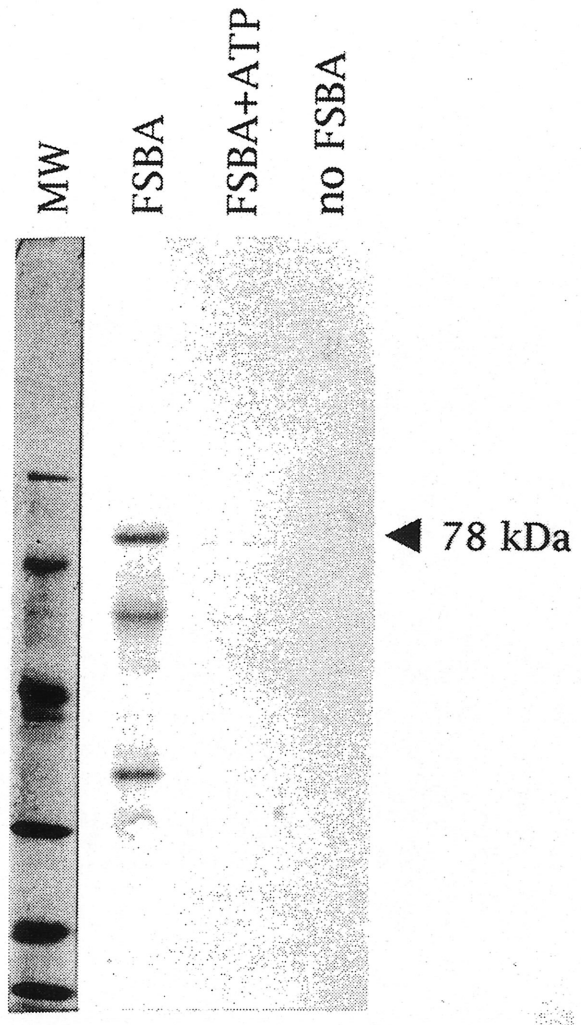
### **FSBA labelling of the ATPDase**

Affinity labelling with the ATP analogue FSBA confirmed that the 78 kDa ATPDase bears an ATP binding site and is illustrated in Figure 5. Côté *et al.* have recently shown that this ATP analogue, which forms a covalent bond with the ATP-binding sites of proteins [51-53], is a strong and irreversible inhibitor of the enzyme [37]. Enzyme-labelling was carried out with the fraction isolated from the Affi-Gel Blue column. After 5 and 35 min incubations of this fraction with FSBA, ADPase activity was reduced by 20% and 60% respectively. Similar results were obtained with ATP as the substrate. After dialysis of the labelling medium and fractionation of proteins by SDS-PAGE, FSBA-labelled proteins were localized with specific antibodies by a Western blot technique (Figure 5). As expected, the 78 kDa band was labelled by FSBA. Interestingly, two other polypeptides were reactive to FSBA antibodies with  $M_r$  of about 56,000 and 40,000 respectively. However it is important to notice that these bands were absent after SDS-PAGE of the activity band I (Figure 4, N-D. gel). Specificity of the antibodies to FSBA is shown in Figure 5. Labelling specificity was demonstrated by adding millimolar concentrations of Ca-ATP to compete with FSBA during labelling (Figure 5). Similar results were obtained with Ca-ADP (data not shown).

### **The 78 kDa ATPDase a glycoprotein**

The glycoprotein nature of the ATPDase was determined by two different approaches. First, binding to lectins, and second, changes of  $M_r$  following PNGase F treatment. Results of lectin-agarose sedimentation are summarised in Table 2. Con A and WGA bound very efficiently the ATPDase activity whereas Soybean

Figure 5. **Western blot of FSBA labelled protein isolated from Affi-Gel Blue column.** Labeled proteins were separated on a 8-13,5% gradient gel by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P membrane, incubated with the rabbit antibody anti-FSBA and detected by a secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase. Twenty  $\mu\text{g}$  of protein from the Affi-Gel Blue column fraction was used for the assays: incubation with FSBA (FSBA), incubation with FSBA with competing Ca-ATP (FSBA+ATP), incubation without FSBA (no FSBA). Molecular-mass standards (MW): 97.4, 66.2, 45.0, 31.0, 21.5, 14.4 kDa.



and UEA did not. Among the protein bound by Con A and WGA, one finds the 78 kDa which can be eluted by Me- $\alpha$ -D-mannopyranoside and D-GlcNAc respectively as seen after separation by SDS-PAGE and silver staining. Treatment of the Con A eluted fraction with PNGase F (Figure 6) resulted in a shift of the 78 kDa band to a  $M_r$  of 60,000 or lower (see below).

### **Immunoreactivity with pig pancreas ATPDase antibodies**

As illustrated in Figure 7 A and B, the antiserum raised against the N-terminal sequence of pig pancreas ATPDase specifically recognised the 54 kDa ATPDase of the pancreas zymogen granule membrane [39]. After digestion with PNGase F, the purified ATPDase from pancreas shifted down to 35 kDa (Figure 7 B). The same antibody recognised the 78 kDa band of the ATPDase from a particulate fraction from the bovine aorta media, consisting mainly of smooth muscle cells (Figure 7 A and C). The antiserum recognised also a band of the same  $M_r$  in a particulate fraction from smooth muscle cells of the trachea and endothelial cells from the bovine aorta (Figure 7 C). The antiserum reacted with a second minor band at about 56 kDa indicating that two different ATPDases would be present in bovine tissues (Figure 7 A and C). Treatment of the Con A purified fraction from bovine aorta with PNGase F caused a shift of the 78 and 56 kDa bands down to 54 and 36 kDa (Figure 7 D). Since the pancreas ATPDase shifted from 54 to 35 kDa after deglycosylation (Figure 7 B), it most probably corresponds to the lower band seen in the bovine aorta, meaning that the 56 kDa band is the one that shift to 36 kDa. Assuming a  $M_r$  contribution of 2,000-4,000/oligosaccharide it indicates that the 54/56 kDa ATPDase bears between 4 to 10 N-linked oligosaccharide chains and the 78 kDa ATPDase would have between 6 and 12. No reaction could be seen with preimmune serum in all cases as shown in Figure 7 A.

With pancreas ATPDase antibodies an immunological localization on the bovine aorta was carried out (Figure 8 and 9). In Figure 8 A an hematoxylin-eosin staining of the tunica media and intima is illustrated. With the ATPDase antibody

**Table 2. ATPDase binding to lectin-agarose beads**

Lectin-agarose	Fractions	Relative % ADPDase activity	Detection of the 78 kDa band by SDS-PAGE	Sugar specificity
Con A	Free	5%	traces	mannose, glucose
	Bound	95%		
	Eluted	62%	+	
WGA	Free	5%	traces	GlcNAc, NeuNAc, mannose structure‡ sialic acid‡
	Bound	95%		
	Eluted	69%	+	
Soybean	Free	100%	+	GalNAc
	Bound	0%		
	Eluted	0%	-	
UEA	Free	100%	+	fucose
	Bound	0%		
	Eluted	0%	-	

Twenty  $\mu$ g of the ATPDase fraction purified by Affi-Gel Blue column chromatography were incubated with the different lectin-agarose conjugates, centrifuged, and supernatants were analysed. Lectin-agarose beads were washed and bound proteins eluted with the appropriate sugar, as described under Materials and methods. % is expressed on the basis of what has been originally added to the beads. Enzyme determinations were repeated twice in triplicate. Supernatants (free) and eluted fractions were separated by SDS-PAGE and stained with silver nitrate.

‡ Weak affinities.

**Figure 6. PNGase F treatment of Con A-agarose column purified fraction.** Six  $\mu\text{g}$  of purified ATPDase from Con A agarose column were used in each assay: no incubation (Con A); incubation with PNGase F, dialysis and lyophilization (PNGase F); incubation without PNGase F, dialysis and lyophilization (Control). PNGase F appeared as a 34 kDa band as indicated. The gel was stained with silver nitrate. Molecular-mass standards (MW): 97.4, 66.2, 45.0, 31.0, 21.5, 14.4 kDa.



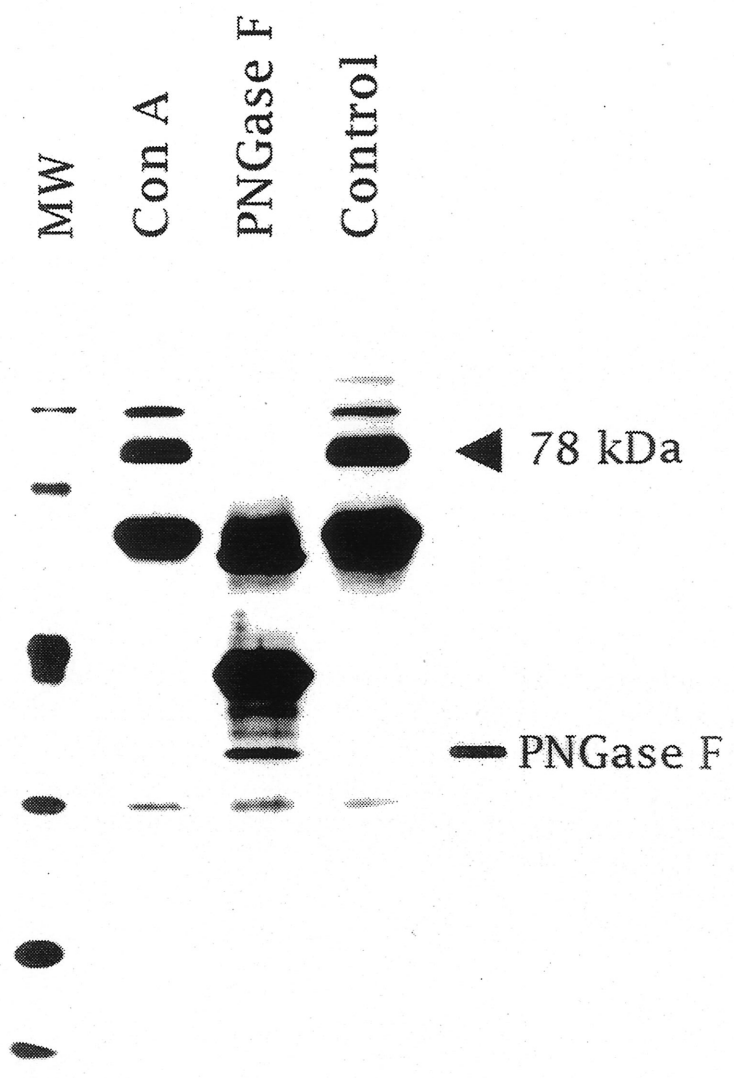
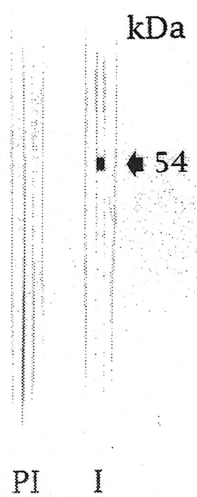
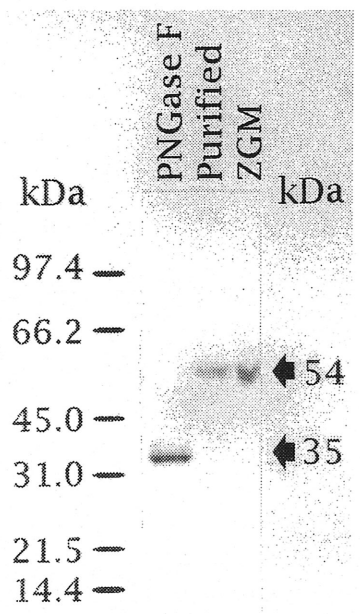
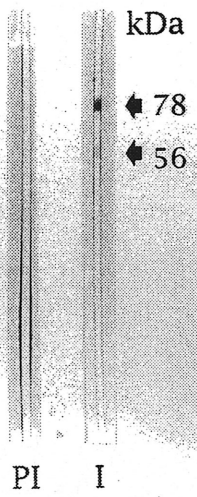


Figure 7. **Western Blot of bovine and porcine tissues showing immunoreactivity with a rabbit antiserum against pig pancreas ATPDase.** Sample were separated on a 8-13,5% gradient gel by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P membrane, and incubated with ATPDase antibodies as described in Materials and methods. **(A)** Specificity of the antiserum. Preimmune (PI: 1:10,000) and immune serum (I: 1:10,000) were tested against zymogen granule membrane protein of pig pancreas (10  $\mu$ g of protein per lane) and a particulate fraction from aorta smooth muscle cells (40  $\mu$ g of protein per lane). **(B)** Reactivity against pig pancreas ATPDase: from the zymogen granule membrane (ZGM), 10  $\mu$ g; purified pancreas ATPDase, 0.2  $\mu$ g; purified pancreas ATPDase treated with PNGase F, 0.2  $\mu$ g.

Pancreas



Aorta



**Figure 7. Western Blot of bovine and porcine tissues showing immunoreactivity with a rabbit antiserum against pig pancreas ATPDase (suite).** Sample were separated on a 8-13,5% gradient gel by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P membrane, and incubated with ATPDase antibodies as described in Materials and methods. **(C)** Reactivity against bovine particulate fractions: trachea smooth muscle cells, 100  $\mu$ g; aorta smooth muscle cells, 100  $\mu$ g; aorta endothelial cells, 30  $\mu$ g. **(D)** Reactivity against purified bovine aorta ATPDase: 1  $\mu$ g of protein from the Con A purified fraction, with or without PNGase F treatment.

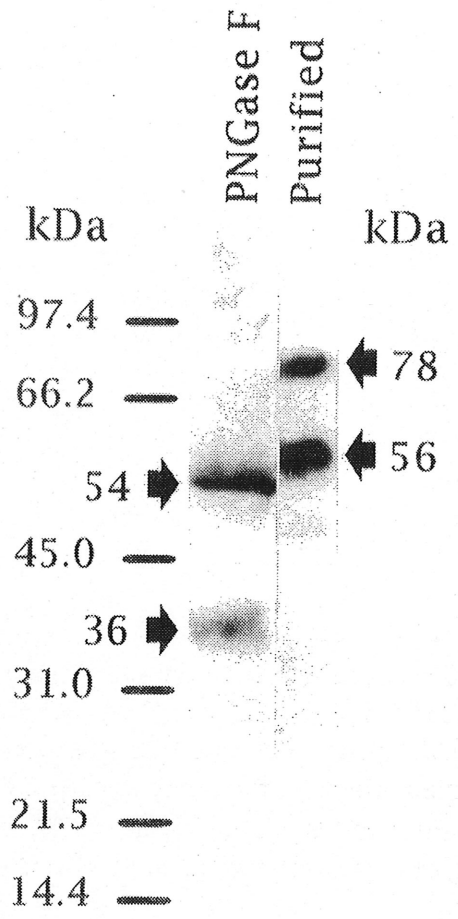
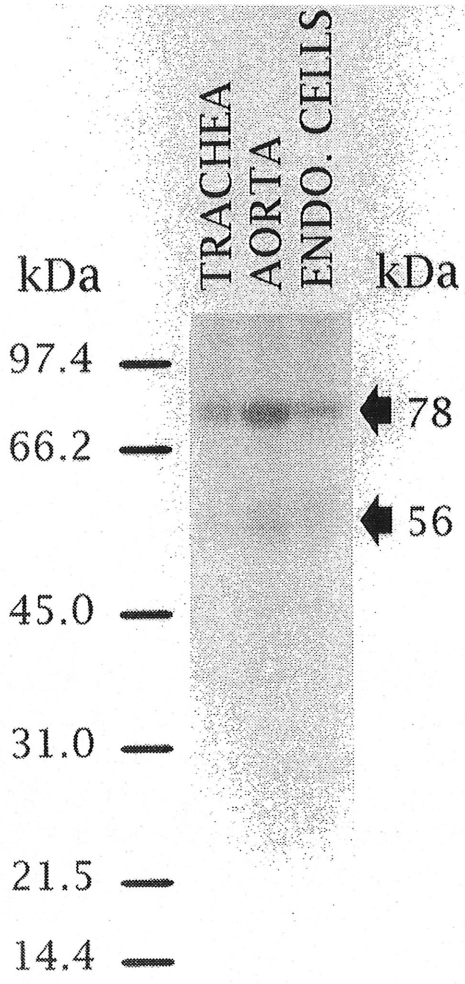


Figure 8. **Immunohistological localization of ATPDase in the bovine aorta.** (A) Hematoxylin-eosin staining (X 50). Tunica intima (arrowheads), tunica media (\*). (B) ATPDase antibody (X 50). A good signal is obtained on endothelial cells (arrowheads) and smooth muscle cells (arrows). Notice that elastic fibers are refractive with our mounting media (snake arrow). (C) Higher magnification (X 200) of the tunica media showing the antibody reaction with smooth muscle cells (arrowheads). (D) Control of the media with preimmune serum (X 200). Notice again the refractive elastic fibers (snake arrow).

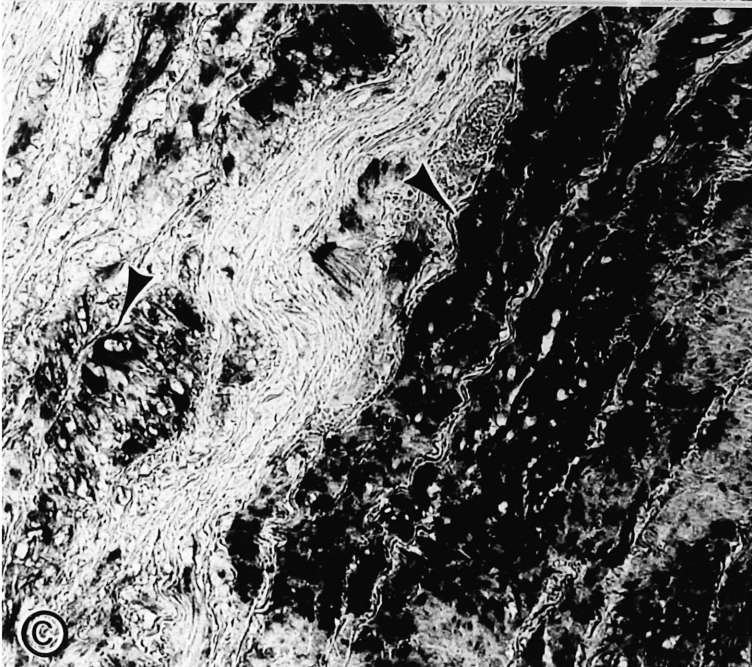
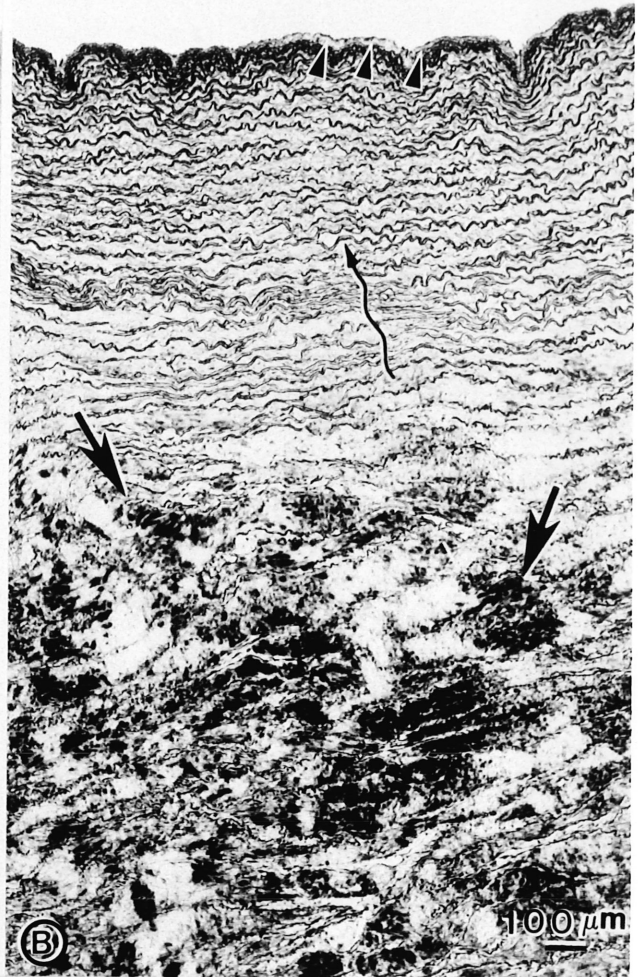
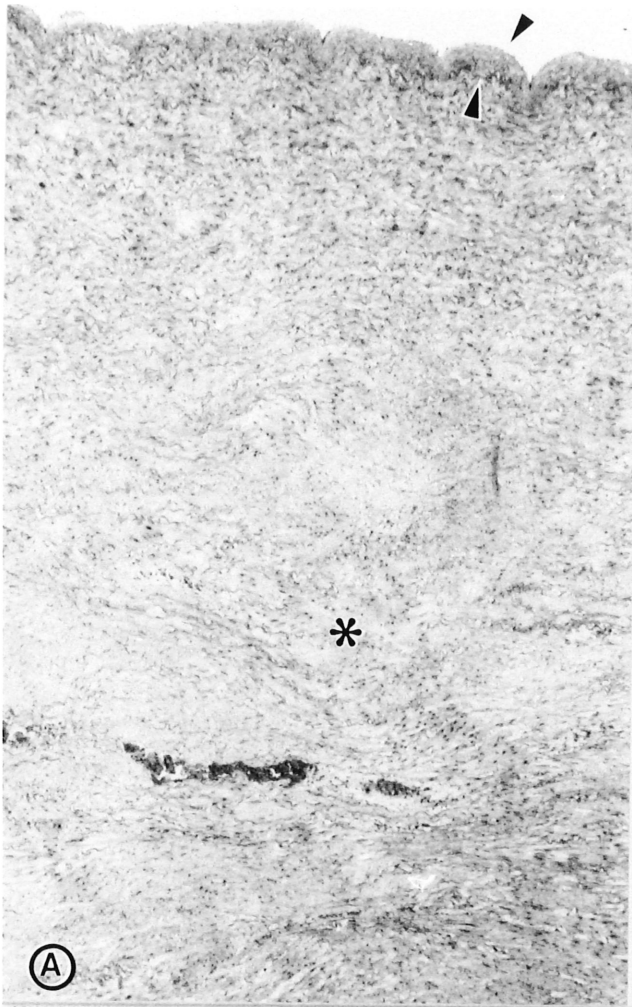
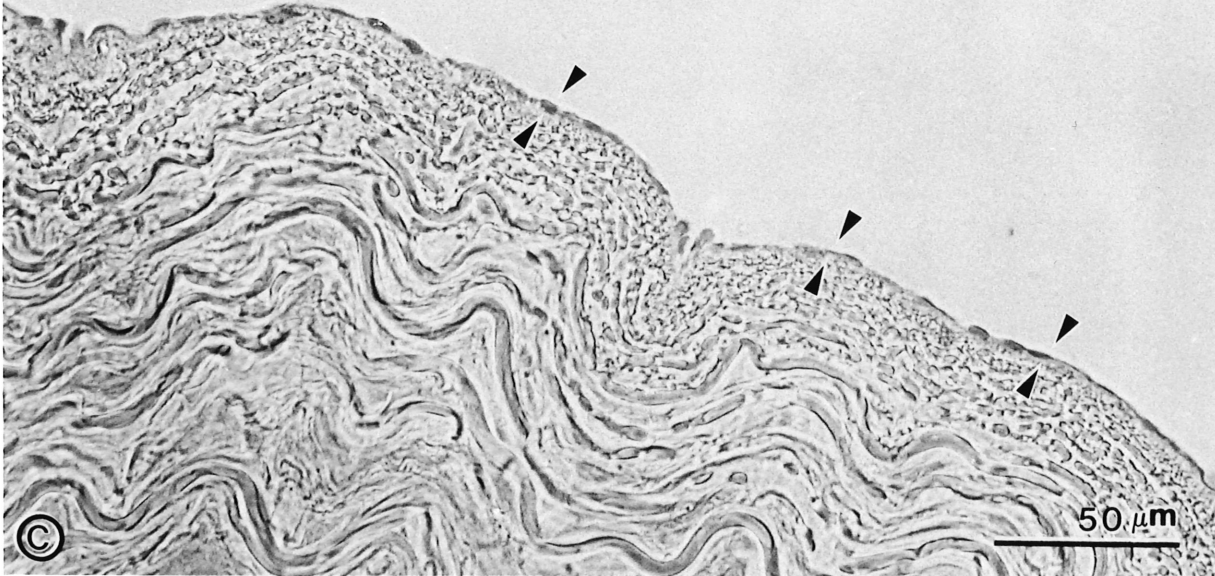
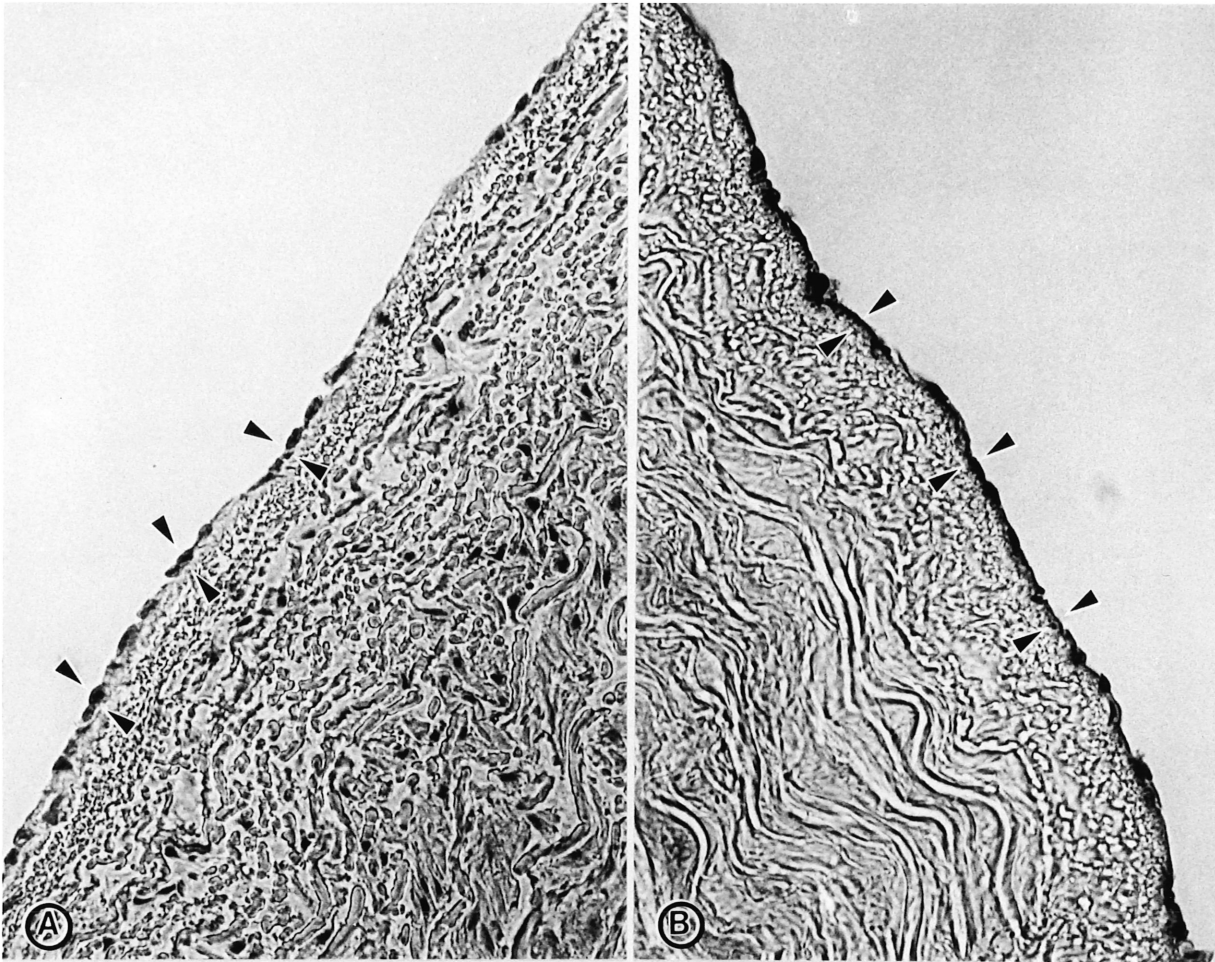


Figure 9. **Immunohistological localization of ATPDase in the tunica intima (X 500).** (A) Hematoxylin-eosin staining. Endothelial cells (arrowheads). (B) Specific signal with ATPDase antiserum on endothelial cells (arrowheads). (C) Control with preimmune serum. Notice unreactive endothelial cells (arrowheads).





a good signal is obtained with endothelial cells and smooth muscle cells (Figure 8 B and C). At higher magnification reactivity of endothelial cells is more clearly seen (Figure 9 B).

## DISCUSSION

In the past few years, a growing interest for the ectonucleotidases involved in the hydrolysis of extracellular ATP and ADP has been noticed. The ATPDase is now been associated with a variety of mammalian cells [54]. In previous work we reported some important differences in kinetic and physicochemical properties of ATPDases from different sources. The ATPDase found in the pig pancreas is a glycoprotein with an estimated  $M_r$  of 54,000 [39]. We have shown here that after PNGase F treatment the  $M_r$  drops down to 35,000 (Figure 7 B). The major ATPDase polypeptide found in bovine aorta has an estimated  $M_r$  of 78,000 and also bears multiple *N*-oligosaccharide chains (Figure 7 D). These two ATPDases also differ by their optimum pH of catalysis, their relative migration after PAGE under non-denaturing conditions (indicating different properties or complexes), and by their irradiation-inactivation curves with  $^{60}\text{Co}$  [25,27,36,37]. Nevertheless, these enzymes share many common properties: they have comparable substrate specificities, they are glycoproteins tightly associated with a membrane fraction, and they are inhibited by sodium azide [54].

Several attempts have been made to identify the protein responsible for the ATPDase activity in blood vessels. So far, the main evidence comes from purification to apparent homogeneity as showed by SDS-PAGE and silver staining. Detection of contaminants by the latter technique may be subjective, and accordingly, an overstaining should be carried out to make sure that no other polypeptide is present. It is well illustrated in Figure 4, where staining was pushed until some parasite bands from the buffer appeared on the gel. Artefactual bands with molecular masses ranging from 50 kDa to 68 kDa have been commonly observed in silver stained gels [45,55,56], and background staining has been

demonstrated to be due in part to the chemistry of the polyacrylamide gels [45,57]. These stainings indicated that only one protein was remaining in our preparation. We then verified if there was an ATP-binding site on that protein. When an ATP analogue, FSBA, was tested on the Affi-Gel Blue purified fraction, a strong signal was obtained with the 78 kDa band. Labelling was eliminated by competition with Ca-ATP or Ca-ADP (Figure 5). Identification of the enzyme was finally confirmed by a Western blot, with an antiserum directed against the sixteen N-terminal amino acid sequence of the ATPDase from pig pancreas (54 kDa). Cross-reactivity clearly showed that the 78 kDa protein share some common sequences with the pancreas ATPDase. Moreover these Western blots indicated that a polypeptide of the same  $M_r$  and the same level of glycosylation as pancreas ATPDase is present in smooth muscle cells of the bovine aorta. It is noteworthy that in this work a 56 kDa band was also labelled by FSBA in the Affi-Gel Blue purified fraction (Figure 5).

Our results on the identification of the polypeptide responsible for ATPDase activity are in apparent disagreement with those of Yagi *et al.*, who found that a purified ATPDase from bovine aorta had a  $M_r$  of 110,000 [26]. Since no 110 kDa band could be seen in the purified preparation reported here, either by silver over-staining, FSBA labelling, or Western blot, we believe that these authors may have purified another form of the same enzyme or a different nucleotidase from the same organ. Moodie *et al.* have purified the ATPDase from the bovine spleen and their SDS-PAGE gel shows a major band at 100 kDa, and another band close to 78 kDa [58]. More recently, Yagi *et al.* reported the purification of an ATPDase of about 75 kDa from human umbilical vessels [30], and Christoforidis *et al.* an ATPDase of 82 kDa from human placenta [59]. Those  $M_r$  are very close to what we obtained for the bovine smooth muscle and endothelial cells, and most probably correspond to the same ATPDase. The purified aorta ATPDase displays a high specific activity. Indeed, if one takes into consideration the inactivation at the Triton solubilization step, the Con A column fraction was enriched by approximately 4,500 fold. At this stage, the enzyme is not yet pure as seen in Figure 6. Indeed, further purification was obtained by PAGE under non-denaturing conditions.

The ATPDase from the smooth muscle cells of the bovine aorta shows biochemical similarities with the ATPDase from the non vascular smooth muscle cells of the bovine trachea [60]. Indeed, in addition to the same migration patterns as demonstrated by immunoblot (Figure 7 C) heat inactivation curves and kinetic properties of the ATPDase from these two sources are almost identical [27,60]. Therefore, since Picher *et al.* (1994) have shown that this ATPDase was an ectonucleotidase in the smooth muscle cells of the trachea [60], the ATPDase from the bovine aorta is also presumably an ectoenzyme. In this respect, the cDNA of the human ATPDase has recently been cloned and reexpression in COS cells confirmed that it is an ectoenzyme [61]. Demonstration that aorta ATPDase is a glycoprotein is also in agreement with the view that it is an ectoenzyme. Our lectin binding assays indicate the presence of mannose and/or glucose, and the absence of D-GalNAc and  $\alpha$ -L-fucose as terminal sugars on the oligosaccharide chains. The major shift in  $M_r$  after PNGase F digestion shows that this protein bears several N-linked oligosaccharide chains. So far, binding to Con A column has been demonstrated for several ATPDases [54], meaning that the presence of mannose and/or glucose is a common feature of vertebrate ATPDases. Kettlun *et al.* (1994) have shown mannose and/or glucose terminal sugars on the human placental ATPDase and they ruled out the presence of galactose, fucose and GlcNAc [32].

Of great physiological significance is the fact that ATPDase is associated with both endothelial and smooth muscle cells (see Figure 7-9). We believe that the enzyme localized at the surface of these cells plays a crucial role in haemostatic processes. Indeed, this ectonucleotidase can convert the platelet activating ADP to AMP and therefore contributes to prevent or reverse the platelet aggregation process. As suggested by several authors it would contribute to limit the growth of the thrombus at the site of an injury [3,36,62-65]. The antithrombotic potential of a glomerular ADPase activity described in *ex vivo* perfusion studies of intact rat kidneys [66,67] could well be attributable to an ATPDase. We do not exclude the possibility that an ecto-ADPase (without ATPase activity) exists at the surface of blood vessel cells but, to our knowledge, there is no purification of such an enzyme in the literature. Also, throughout our purification procedure we could

never dissociate an ADPase activity from an ATPase activity. On the other hand, presence of ecto-ATPases is indicated by the changes in the relative rates of ATP and ADP hydrolysis in the early steps of the purification procedure. The demonstration of the ATPDase on smooth muscle cells raises the question of other potential physiological roles of this enzyme, more specifically the control of vascular tone. Nerve endings can release ATP. The latter would be rapidly converted to AMP by ATPDase and to adenosine by the ecto-5'-nucleotidase. Hence, an ATP contractile effect mediated by P<sub>2X</sub> purinoceptors on the smooth muscle cells would be converted to a P<sub>1</sub> relaxing effect [2]. Moreover, adenosine would exert an inhibitory effect on a further release of neurotransmitters [68]. An anti-inflammatory potential is another interesting possible relevance of vascular nucleotidases [13,69-72]. ATP and ADP (released from platelets and other blood cells) exert proinflammatory effect whereas adenosine has potent anti-inflammatory activities [13,71-73]. Globally from the current literature we can draw a more general scheme of the functions of vascular ATPDase: working in tandem with 5'-nucleotidase, the ATPDase would convert a P<sub>2</sub> into a P<sub>1</sub> effect [3,24,54].

## ACKNOWLEDGEMENTS

We express our thanks to Johanne Proulx for her technical assistance. This work was supported by grants from Quebec Heart and Stroke Foundation, and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). J.S. is a recipient of studentships from "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ), "Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec" (FCAR) and from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

## REFERENCES

1. Gordon, J.L. (1990) Ann. NY Acad. Sci. **603**, 46-51.

2. Olsson, R. A. and Pearson, J. D. (1990) *Physiol. Reviews* **70**, 761-845.
3. Sévigny, J. and Beaudoin, A. R. (1994) *Med. Sci.* **10**, 836-844.
4. El-Moatassim, C., Dornand, J. and Mani, J.-C. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1134**, 31-45.
5. Dubyak, G. R. and El-Moatassim, C. (1993) *Am. J. Physiol.* **265**, C577-C606.
6. Burnstock, G. (1993) *Drug Dev. Res.* **28**, 195-206.
7. Kennedy, C. and IJzerman, A. (1994) *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 311-312.
8. Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Leff, P. and Williams, M. (1994) *Pharmacol. Rev.* **46**, 143-156.
9. Motte, S., Communi, D., Piroton, S. and Boeynaems, J. M. (1995) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 1-7.
10. Pearson, J. D. (1988) *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 480-482.
11. Gachet, C. and Cazenave, J. P. (1991) *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **33**, 347-358.
12. Vassort, G., Scamps, F., Pucéat, M., Clément-Chomienne, O. and Alvarez, J. (1993) *Drug Dev. Res.* **28**, 306-308.
13. Bakker, W. W., Poelstra, K., Barradas, M. A. and Mikhailidis, D. P. (1994) *Platelets* **5**, 121-129.
14. Kaul, S., Padgett, R. C. and Heistad, D. D. (1994) *Ann. NY Acad. Sci.* **714**, 122-135.
15. Lüthje, J. (1989) *Klin. Wochenschr.* **67**, 317-327.
16. Pearson, J. D. and Gordon, J. L. (1985) *Ann. Rev. Physiol.* **47**, 617-627.
17. Pearson, J. D., Coade, S. B. and Cusack, N. J. (1985) *Biochem. J.* **230**, 503-507.

18. Gordon, E. L., Pearson, J. D. and Slakey, L. L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 15496-15504.
19. Gordon, E. L., Pearson, J. D., Dickinson, E. S., Moreau, D. and Slakey, L. L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 18986-18992.
20. Coade, S. B. and Pearson, J. D. (1989) *Circ. Res.* **65**, 531-537.
21. Meghji, P., Pearson, J. D. and Slakey, L. L. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, H40-H47.
22. Beukers, M. W., Pirovano, I. M., Weert, A. V., Kerkhof, C. J. M., IJzerman, A. P. and Soudijn, W. (1993) *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1959-1956.
23. Meghji, P., Pearson, J. D. and Slakey, L. L. (1995) *Biochem. J.* **308**, 725-731.
24. Plesner, L. (1995) *Int. Rev. Cytol.* **158**, 141-214.
25. LeBel, D., Poirier, G. G., Phaneuf, S., St-Jean, P., Laliberté, J.-F. and Beaudoin, A. R. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1227-1233.
26. Yagi, K., Arai, Y., Kato, N., Hirota, K. and Miura, Y. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 509-513.
27. Côté, Y. P., Picher, M., St-Jean, P., Béliveau, R., Potier, M. and Beaudoin, A. R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1078**, 187-191.
28. Papamarcaki, T. and Tsolas, O. (1990) *Mol. Cell. Biochem.* **97**, 1-8.
29. Pieber, M., Valenzuela, M. A., Kettlun, A. M., Mancilla, M., Aranda, E., Collados, L. and Traverso-Cori, A. (1991) *Comp. Biochem. Biophys.* **100B**, 281-285.
30. Yagi, K., Kato, N., Shinbo, M., Shimba, L. S. and Miura, Y. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2143-2146.
31. Frassetto, S. S., Dias, R. D. and Sarkis, J. J. F. (1993) *Mol. Cell. Biochem.* **129**, 47-55.

32. Kettlun, A. M., Alvarez, A., Quintar, R., Valenzuela, M. A., Collados, L., Aranda, E., Banda, A., Chayet, L., Chiong, M., Mancilla, M. and Traverso-Cori, A. (1994) *Int. J. Biochem.* **26**, 437-448.
33. Zimmermann, H. (1992) *Biochem. J.* **285**, 345-365.
34. Laliberté, J.-F., St-Jean, P. and Beaudoin, A. R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3869-3874.
35. Laliberté, J.-F. and Beaudoin, A. R. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **742**, 9-15.
36. Côté, Y. P., Filep, J. G., Battistini, B., Gauvreau, J., Sirois, P. and Beaudoin, A. R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1139**, 133-142.
37. Côté, Y. P., Ouellet, S. and Beaudoin, A. R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1160**, 246-250.
38. Picher, M., Côté, Y. P., Béliveau, R., Potier, M. and Beaudoin, A. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4699-4703.
39. Sévigny, J., Côté, Y. P. and Beaudoin, A. R. (1995) *Biochem. J.* **312**, 351-356.
40. Thomas, T. C. and McNamee, M. G. (1990) *Methods Enzymol.* **182**, 499-520.
41. Picher, M., Sévigny, J., D'Orléans-Juste, P. and Beaudoin, A. R. (1996) *Biochem. Pharmacol.* **51**, 1453-1460.
42. Baykov, A. A., Evtushenko, O. A. and Avaeva, S. M. (1988) *Anal. Biochem.* **171**, 266-270.
43. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
44. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
45. Merril, C. R. (1990) *Methods Enzymol.* **182**, 477-488.



46. Tam, J. P. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5409-5413.
47. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
48. Schaffner, W. and Weissman, C. (1973) *Anal. Biochem.* **56**, 502-514.
49. Harlow, E. and Lane, D. (1988) in *Antibodies: A laboratory manual* (Harlow, E., ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
50. Miller, R. T. and Estran, C. (1995) *Appl. Immunohistochemistry* **3**, 190-193.
51. Colman, R. F. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 67-91.
52. Buhrow, S. A. and Staros, J. V. (1985) *Methods Enzymol.* **109**, 816-827.
53. Allison, W. S., Bullough, D. A. and Andrews, W. W. (1986) *Methods Enzymol.* **126**, 741-761.
54. Beaudoin, A. R., Sévigny, J. and Picher, M. (1996) in *Biomembranes* (Lee, A. G., ed.), Vol. 5, pp. 369-401, JAI Press inc., Greenwich, CT.
55. Garfin D. E. (1990) *Methods Enzymol.* **182**, 425-441.
56. Ochs, D. (1983) *Anal. Biochem.* **135**, 470-474.
57. Hochstrasser, D. F., Patchornik A. and Merrill, C. R. (1988) *Anal. Biochem.* **173**, 412-423.
58. Moodie, F. D. L., Baum, H., Butterworth, P. J. and Peters, T. J. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 1209-1215.
59. Christoforidis, S., Papamarcaki, T., Galaris, D., Kellner, R. and Tsolas, O. (1995) *Eur. J. Biochem.* **234**, 66-74.
60. Picher, M., Béliveau, R., Potier, M., Savaria, D., Rousseau, É. and Beaudoin, A. R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1200**, 167-174.

61. Kaczmarek, E., Koziak, K., Sévigny, J., Siegel, J. B., Anrather, J., Beaudoin, A. R., Bach, F. H. and Robson, S. C. J. Biol. Chem. in press.
62. Lieberman, G. E., Lewis, G. P. and Peters, T. J. (1977) *Lancet* **ii**, 330-332.
63. Glasgow, J. G., Schade, R. and Pitlick, F. A. (1978) *Thromb. Res.* **13**, 255-266.
64. Côté, Y. P., Pavate, C. T. and Beaudoin, A. R. (1993) *Curr. Top. Pharmacol.* **1**, 83-93.
65. Marcus, A. J. and Safier, L. B. (1993) *FASEB J.* **7**, 516-522.
66. Bakker, W. W., Willink, E. J., Donga, J., Hulstaert, C. E. and Hardonk, M. J. (1987) *J. Lab. Clin. Med.* **109**, 171-177.
67. Poelstra, K., Baller, J. F. W., Hardonk, M. J. and Bakker, W. W. (1991) *Blood* **78**, 141-148.
68. Fredholm, B. B. and Hedquist, P. (1980) *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1635-1643.
69. Filippini, A., Taffs, R. E. and Sitkovsky, M. V. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8267-8271.
70. Van Waeg, G. and Van der Berghe, G. (1991) *J. Clin. Invest.* **87**, 305-312.
71. Bakker, W. W., Poelstra, K. and Hardonk, M. J. (1993) *Nephron* **64**, 338-342.
72. Poelstra, K., Heynen, E. R., Baller, J. F. W., Hardonk, M. J. and Bakker, W. W. (1992) *Lab. Invest.* **66**, 555-563.
73. Ward, P. A., Cunningham, T. W., McCulloch, K. K., Phan, S. H., Powell, J. and Johnson, K.J. (1988) *Lab. Invest.* **58**, 37-47.

## CHAPITRE 3

### PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE L'ATP DIPHOSPHOHYDROLASE TYPE III, ET IMMUNOLOCA- LISATION DE L'ENZYME DANS LE POUMON DE BOEUF

Picher *et al.* (1993), ont mis en évidence une ATPDase dans le poumon de boeuf. La fraction particulière caractérisée montre que cette enzyme possède des caractéristiques biochimiques différentes de celles de l'ATPDase type I du pancréas, et partage plusieurs des propriétés biochimiques de l'ATPDase type II de l'aorte. Elle se distingue cependant de cette dernière par sa courbe d'inactivation par irradiation au  $^{60}\text{Co}$  et par son profil de migration en gel d'acrylamide après électrophorèse dans des conditions non-dénaturantes. Les auteurs ont proposé de nommer l'ATPDase du poumon: type III. Dans ce chapitre, nous identifions cette protéine. Les résultats montrent qu'il s'agit vraisemblablement d'un polypeptide identique à celui trouvé dans l'aorte. En effet, une protéine de 78 kDa a été isolée, et son identité confirmée par marquage au FSBA et par détection après immunobuvardage avec un anticorps anti-ATPDase. Cet anticorps a aussi été utilisé pour localiser la protéine dans les voies aériennes. L'ATPDase est présente dans de nombreuses cellules du système respiratoire dont les cellules épithéliales en général, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les cellules mésothéliales. Une distribution aussi large suggère un rôle de l'enzyme dans la régulation des concentrations de nucléotides extracellulaires pour maintenir l'homéostasie de ce système.

Ces résultats sont sous presse dans *American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology*. Nous remercions monsieur G. Grondin qui a effectué l'immunolocalisation ainsi que le docteur M. Picher qui a préparé la fraction enrichie en membrane plasmique et qui a participé à la rédaction de l'article.

# **Purification and Immunohistochemical Localization of the ATP Diphosphohydrolase in Bovine Lungs**

Jean Sévigny, Maryse Picher, Gilles Grondin, and Adrien R. Beaudoin

Département de biologie, Faculté des sciences,  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Québec, CANADA, J1K 2R1

## ABSTRACT

We have recently described different isoforms of mammalian ATP diphosphohydrolase (ATPDase: EC 3.6.1.5). In the present study, we purified the lung ATPDase by column chromatographies, followed by PAGE under non-denaturing conditions. The active polypeptide which has a molecular mass of 78 kDa, was identified by affinity labelling to the ATP analogue 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl-adenosine (FSBA), followed by detection on Western blot with an antibody specific for FSBA. N-glycosidase F treatment shifted the molecular mass of the 78 kDa polypeptide down to 54 kDa, indicating that the enzyme bears about 6 to 12 N-linked oligosaccharide chains. A polyclonal antibody raised against the pancreas ATPDase, that specifically recognized the 78 kDa glycoprotein on Western blot, was used to carry out an immunological survey of the enzyme distribution in bovine lungs. Immunoreactivity was detected on: airway epithelia from the trachea down to alveolar cells, airway and vascular smooth muscle cells, submucous glands, chondrocytes, leucocytes, as well as endothelial and mesothelial cells. Such a wide distribution suggests that the ATPDase may affect a variety of physiological effects mediated by extracellular nucleotides, such as airway smooth muscle tone, surfactant secretion, platelet aggregation and inflammation.

## INTRODUCTION

In lungs, extracellular adenine nucleotides and adenosine are now recognized as physiological regulators of surfactant and mucus secretions (21, 31), epithelial chloride ion transport (23), ciliary beating frequency (37), airway and vascular smooth muscle tone (9, 18) and pulmonary thrombosis (3). Apart from broken cells, these nucleotides are released in the walls and lumen of airways from sympathetic, cholinergic and non-adrenergic non-cholinergic nerves (9) and mast cells activated by other nucleotides or substance P (26). In the pulmonary circulation, ATP and ADP are released from platelets activated by various pro-aggregatory factors including ADP itself. Erythrocytes and endothelial cells release

ATP and ADP in response to flow-derived shear stress (30), which increases considerably in pulmonary vessels during each cardiac cycle (25).

The regulation of cellular functions by extracellular adenine nucleotides lies in part on the fact that ATP and/or ADP act through different cell surface receptors than adenosine, called  $P_2$  and  $P_1$ -purinoceptors respectively, and that these two classes of receptors are often responsible for opposite effects on the same cell (19). Adenine nucleotides are mainly released in the form of ATP and/or ADP in lungs, which may potentially lead to considerable damage caused by sustained broncho- or vasoconstriction, airway obstruction by mucus and surfactant, or pulmonary thrombosis. Hydrolysis of these nucleotides to adenosine would terminate these  $P_2$ -purinoceptor-mediated effects and activate  $P_1$ -purinoceptors, which induce beneficial effects such as smooth muscle relaxation and inhibition of platelet aggregation (4, 18).

Since the pioneer work of Binet and Burstein in 1950 (6), who reported that ATP and ADP are rapidly metabolized into adenosine in the pulmonary capillary bed, several ecto-adenosinetriphosphatase (ecto-ATPase), ecto-adenosinediphosphatase (ecto-ADPase) and ecto-5'-nucleotidase activities have been localized in lungs. In pulmonary vessels, cytochemical and perfusion studies have shown that circulating adenine nucleotides are metabolized by plasma membrane enzymes of endothelial cells (6, 11, 15, 34). The external orientation of their catalytic site has been confirmed by assays conducted on cultured pulmonary endothelial cells (13, 16). In the respiratory tract, all three enzyme activities were measured on isolated tracheal and bronchial segments (17, 20). An ecto-ATPase activity was detected by cytochemistry on trachea epithelial and smooth muscle cells (2). The biochemical properties of these enzymes have not been investigated and it was generally believed that extracellular nucleotides were hydrolyzed by three distinct ectoenzymes: an ATPase, an ADPase and a 5'-nucleotidase (11). However, recent observations on various organs, tissues and cell types support the concept of a two-enzyme system, composed of an ATP diphosphohydrolase (ATPDase) and a 5'-nucleotidase (5). Mammalian ATPDases are usually found in the plasma

membrane and catalyze the hydrolysis of the  $\gamma$  and  $\beta$  phosphate residues of all triphospho- and diphosphonucleosides. They are active in the neutral pH range, require divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ ), and are insensitive to inhibitors of P-type, F-type and V-type ATPases (5, 29).

We have recently demonstrated the presence of an ATPDase in bovine lungs (27). This enzyme may play a significant role in the control of extracellular concentrations of ATP and ADP and thereby would modify their purinergic effects all along the conducting airways. In this work, we have purified the lung ATPDase and we have carried out a survey of the enzyme distribution in bovine airways using a polyclonal antibody raised against the N-terminal amino acid sequence of the pancreas isoform.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials**

ATP, 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyladenine (FSBA), Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) and mouse monoclonal antibodies to rabbit IgG, conjugated to alkaline phosphatase, were obtained from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO, USA); ADP, AMP, 1,4-piperazinediethane-sulfonic acid (PIPES), Triton X-100, and N-glycosidase F were purchased from Boehringer-Mannheim (Laval, Québec, Canada);  $\text{CaCl}_2$  and Tween 20 from Fisher Scientific Co. (Montréal, Québec, Canada); Dialysis membrane Spectra/Por (6,000-8,000 Da) from Spectrum Medical Industries, Inc. (Los Angeles, CA, USA); Transfer membrane Immobilon-P was obtained from Millipore Corp. (Bedford, MA, USA); Wheat germ agglutinin-agarose (WGA-agarose) was bought from Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA); Bradford reagent, bovine serum albumin (BSA) fraction V, Affi-Gel Blue, DEAE Bio-Gel A agarose, sodium dodecyl sulfate (SDS), molecular-

mass standards and polyacrylamide from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, Ontario, Canada). Other reagents were of analytical grade.

### **ATPDase purification and assays**

Adult bovine lungs were obtained from a local slaughterhouse and a plasma membrane enriched fraction was isolated, as previously described (27). The following chromatographic steps were based on a procedure recently described in our laboratory to purify the bovine aorta ATPDase (33), with some modifications. Membrane proteins were solubilized at 4°C for 1 h, at a protein concentration of 1 mg/ml in 0.3% (v/v) Triton X-100, 30 mM Tris, pH 8.0, and centrifuged for 1 h at 100,000 *g*. The supernatant was loaded on an ion-exchange DEAE-agarose column (20 ml) preequilibrated with 7.5% (v/v) glycerin, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 20 mM Tris, pH 8.0. Proteins were eluted by a 0-0.13 M linear NaCl gradient in the same buffer, followed by a 2 M NaCl wash. The ADPase enriched fractions were pooled and dialysed against 0.05% (v/v) Triton X-100 and 30 mM Tris pH 7.5. The pH of the dialysate was adjusted to 5.9 with 200 mM histidine pH 4.0, and loaded on a 6 ml Affi-Gel Blue column, preequilibrated with 7.5% (v/v) glycerin, 0.07% (v/v) Triton X-100, 25 mM histidine and 25 mM Tris, pH 5.9. This column has an affinity for nucleotide binding proteins, which were eluted by a linear gradient made of buffers A and B (buffer A: 7.5% (v/v) glycerin, 0.07% (v/v) Triton X-100 in 10 mM Tris, pH 6.8; buffer B: 7.5% glycerin, 0.07% Triton X-100, 1 M NaCl and 10 mM Tris, pH 7.5), followed by a wash with 1 M NaCl, 0.07% Triton X-100 and 100 mM Tris, pH 8.5. Active fractions were pooled and dialysed overnight against 0.05% Triton X-100 in 1 mM Tris, pH 8.0, and concentrated on a 1 ml DEAE-agarose column as described above. Proteins were eluted by 0.4 M NaCl and dialysed against distilled water. This purified fraction was used for FSBA labelling and for electrophoresis under non-denaturing conditions (see ref. 33). Further purification was obtained by lectin chromatography with a WGA-agarose column of 2 ml. This lectin has strong affinities for *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) dimer or trimer structures/chitobiose and lower affinities for sialic acid and mannose-containing oligosaccharides. The WGA-



column, and the protein samples eluted from the Affi-Gel Blue column, were preequilibrated with 0.05 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl and 25 mM PIPES, pH 6.8. The unbound material was eluted with the preequilibration buffer and enzyme activity was eluted by adding 0.5 M GlcNAc to the preequilibration buffer. The purified sample was dialysed and concentrated on a 1 ml DEAE column, as described above. Column flow rates were 5-10 ml/h and all the purification steps were carried out at 4°C. Enzyme activity was measured with the malachite green method and protein by the technique of Bradford, as previously described (see ref. 33). One unit of ATPDase activity corresponds to the release of 1  $\mu$ mol of phosphate/min, at 37°C.

### **N-glycosidase F treatment**

Deglycosylation was carried out on the ATPDase enriched fractions eluted from the Affi-Gel Blue and WGA-agarose columns respectively, according to the manufacturer's recommendations (Boehringer-Mannheim, Laval, Québec, Canada). Proteins were boiled for 10 min in 0.2% SDS and 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol (6  $\mu$ g of protein in 50  $\mu$ l). The incubation volume was adjusted to obtain a final concentration of 0.4% (v/v) Triton X-100, 10 mM EDTA, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, and 1 unit of N-glycosidase F in 0.4 ml. After a 12 h incubation period at 37°C, the incubation medium was dialysed against distilled water, lyophilized, and proteins were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

### **FSBA labelling and SDS-PAGE**

The purified fraction from the DEAE-agarose (30  $\mu$ g) and the Affi-Gel Blue columns (20  $\mu$ g) were incubated with 0.125 mM FSBA (extinction coefficient:  $1.35 \times 10^4$ /cm/M in ethanol) in 150 mM KCl, 5% (v/v) dimethylsulfoxide, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 36 mM Tris/acetate pH 7.5 at 37°C in a final volume of 1 ml. The

reaction was started by adding FSBA and stopped after 7 min by adding 0.1 ml of 1 M 1,4-dithiothreitol in 1% SDS. The specificity of FSBA for the catalytic site of the ATPDase was assessed by preventing its binding with 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -ADP or  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP added 5 min before FSBA. After the incubation period, the medium was dialysed 8 h against water, at room temperature. The dialysate was lyophilized, resuspended in 1X sample buffer (2% (w/v) SDS, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerin, 0.001% Bromophenol Blue, 65 mM Tris, pH 6.8) and incubated 20 min at 37°C. Proteins were then fractionated by SDS-PAGE and the FSBA-labelled proteins were identified by immunoblotting procedure. Purity of the ATPDase was assessed by SDS-PAGE, followed by silver nitrate diamine staining (see ref. 33).

### **Immunoblotting procedure**

Immunoblotting procedures were carried out as previously reported (33) using primary antibodies, either a rabbit antiserum raised against FSBA (32) or a rabbit antiserum raised against a synthetic polypeptide corresponding to the N-terminal amino acid sequence of the pig pancreas type-I ATPDase (33). Both antisera were used at a dilution of 1:10,000. The secondary antibody was a mouse monoclonal anti-rabbit IgG (1:6,000) conjugated to alkaline phosphatase which was detected with NBT/BCIP.

### **Immunohistochemistry**

Freshly dissected tissues were fixed overnight with 2% paraformaldehyde and 0.17% glutaraldehyde in 0.1 M Na cacodylate buffer, pH 7.4, containing 4% sucrose. Tissues were dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in paraffin. Paraffin sections were cut at 4  $\mu\text{m}$  thickness and mounted on polyionic slides (Superfrost Plus Fisher, Montréal, Québec, Canada). Paraffin was removed with xylene and tissues were rehydrated through graded ethanol to water, and

rinsed in 150 mM NaCl, 0.1 M Tris, pH 7.5 (TBS). The slides were incubated 10 min in TBS containing 0.1 M glycine and subjected to pressure cooker heat induced epitope retrieval procedure (24) in 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.0 for 9 min. After a 10 min wash in TBS at room temperature, non-specific binding sites were blocked by a 30 min incubation at room temperature with 1% BSA and 1% fat free skimmed milk in TBS. Sections were incubated overnight at 4°C with the ATPDase antiserum, or preimmune serum (1:100), washed in TBS several times, and incubated with mouse monoclonal anti-rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase at a dilution of 1:100 for 2 h at room temperature. After several washings, visualization was carried out by the alkaline phosphatase reaction with NBT/BCIP. Sections were mounted in 5% gelatin, 27% glycerol, and 0.1% sodium azide, preheated at 45°C. Photographs were taken under bright field illumination using a Zeiss photomicroscope on Kodak T Max 100 film.

## **RESULTS**

### **ATPDase purification**

The different purification steps leading to the identification of the lung ATPDase are described in Table 1. The plasma membrane enriched fraction showed a 14-fold enrichment in ADPase activity as compared to the activity measured in the homogenate. Membrane solubilization in 0.3% Triton X-100 resulted in a 68% decrease in ADPase activity, from 0.5 to 0.16 unit/mg. Marked inhibition of enzyme activity by detergents has been commonly reported for ATPDases (29). After centrifugation, 66% of the proteins were recovered in the supernatant, along with 56% of the ADPase activity. ATPase and ADPase activities were coeluted from the DEAE-agarose column as a sharp peak and recovered in a fraction containing 57% of the total enzyme activity, for a 5-fold purification (Figure 1). Subsequent chromatographic separation on an Affi-Gel Blue column resulted in a 4-fold enrichment and 35% recovery of the ADPase activity (Figure 2). WGA-agarose chromatography resulted in an additional 3-fold purification of the

**Table 1. ATPDase purification**

Step	Total protein mg	Total activity units	Specific activity (ADP) units/mg	Yield %	Enrichment fold	Hydrolysis rate ATP/ADP
Particulate fraction (pf)	119	60	0.50	-	(14)†	2.0
pf + Triton X-100	119	18.9	0.16	100	1	1.4
100,000 g supernatant of solubilized pf	78	10.6	0.14	56	0.9	1.5
DEAE column	8.4	6.0	0.71	32	4.5	1.1
Affi-Gel Blue column	0.8	2.1	2.6	11	17	1.0
WGA column	0.17	1.2	7.3	6.4	46	1.0

Each determination was carried out in triplicate.

† We have obtained a 14-fold purification in ADPase activity for the particulate fraction (pf) as compared to the homogenate, as previously reported by Picher *et al.* (27).

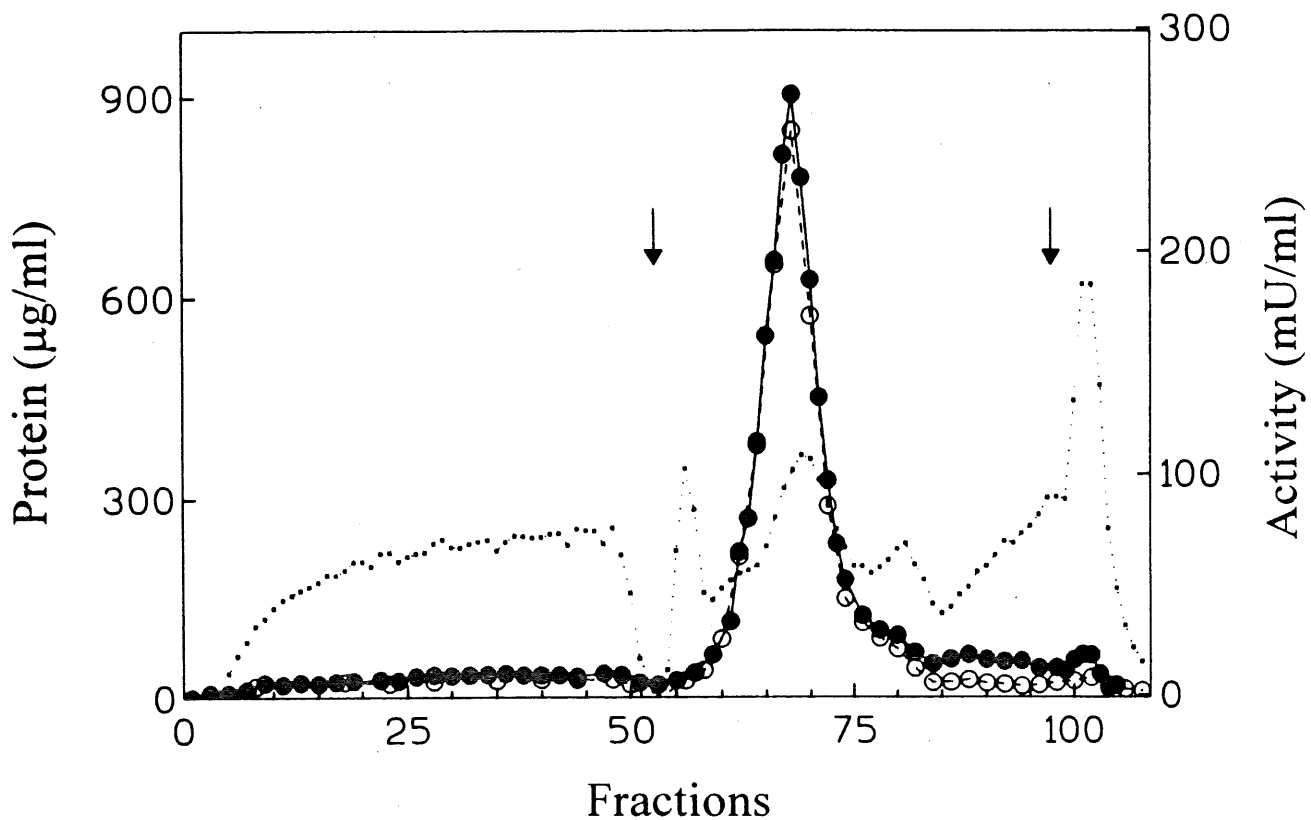


Figure 1. **DEAE-agarose chromatography of the particulate fraction solubilized with Triton X-100.** The left-hand arrow indicates the initiation of the NaCl gradient (0-0.13 M), and the right-hand arrow, the 2 M NaCl wash. Conditions of chromatography are described in the Materials and Methods section. Fractions of 3 ml were collected. Fractions 64-71 were pooled for the next purification step or for FSBA labelling. (.....) Protein concentration; (●) ATPase and (○) ADPase activities.

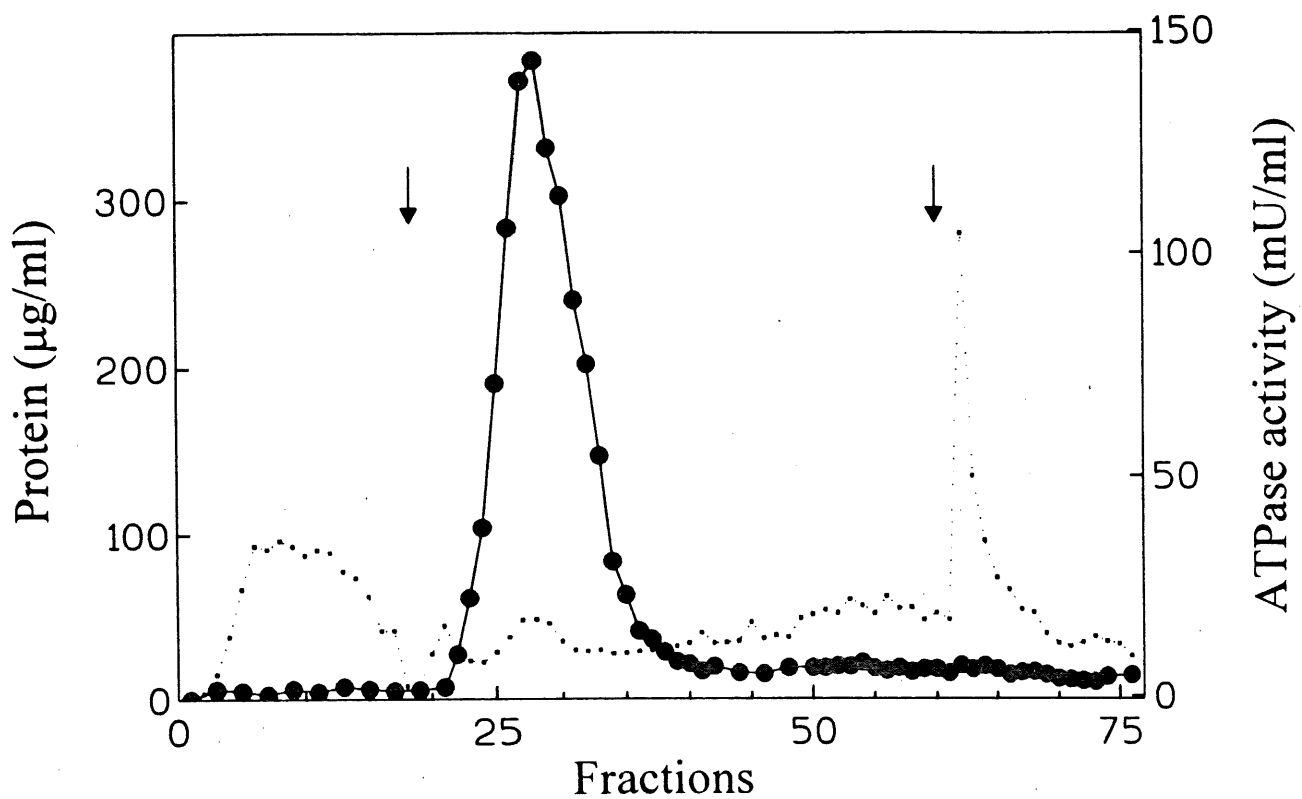


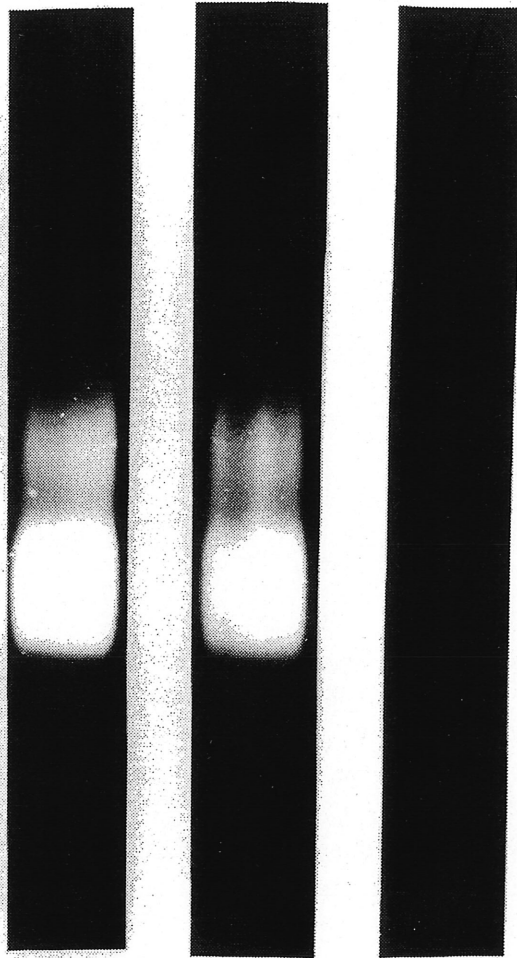
Figure 2. **Affi-Gel Blue chromatography of the active fractions from the DEAE-agarose column.** The left-hand arrow indicates the initiation of the NaCl gradient (0-1 M), and the right-hand arrow a wash with 1 M NaCl, 0.07% Triton X-100 and 100 mM Tris, pH 8.5. Fractions of 3 ml were collected. Fractions 25-32 were pooled for the next purification step or for FSBA labelling. (.....) Protein concentration; (●) ATPase activity.

ADPase, thus enriched by 46 fold compared to the particulate fraction, or 644 fold compared to the homogenate. In the course of the purification procedure, the ATPase/ADPase ratio of activity decreased from 2.0 to 1.0, indicating that other ATPase activities have been eliminated.

The last purification step consisted in fractionation of the enzyme preparation from the Affi-Gel Blue column by PAGE under non-denaturing conditions. Nucleotidases were detected by a calcium-phosphate precipitate formed following incubation of gel strips in the presence of either ATP, ADP or AMP as substrates. Figure 3 shows that two protein bands hydrolyze both ATP and ADP, but not AMP, which is in agreement with the characteristics of ATPDases. The presence of a less intense calcium-phosphate band above the major one suggests that this enzyme may form different complexes. Similar observations have been reported for the bovine aorta ATPDase (33). Five pieces of gel were excised from the non-denaturing gel and analyzed for their protein content by SDS-PAGE: two pieces from the most intense calcium-phosphate band (*B* and *C*), one piece from the upper less intense band (*E*) and two control pieces from areas lacking nucleotidase activity (*A* and *D*) (Figure 4, *lane N-D*). Detailed analysis of the protein profiles obtained from these different gel pieces after SDS-PAGE showed that the ATPDase activity was associated with the same polypeptide of 78 kDa. Indeed, four of the six polypeptides seen on the SDS-PAGE gel from the most intense calcium-phosphate band (*C*) could be eliminated as possible candidates, since they were also found in nucleotidase free areas (*lanes A and D*). Of the last two possible candidates, the 50 kDa and 78 kDa proteins, the latter was retained because its intensity followed that of the ATPDase activity in *B*, *C* and *E* (+ to +++; see Figure 4). It is noteworthy that the 78 kDa protein could be distinguished from a 77 kDa protein on the basis of their appearance after silver nitrate staining. The 77 kDa band appeared reddish and sharp, while the 78 kDa band was brownish and diffuse. The 77 kDa reddish band can be seen in Figure 4 *lanes C, D and E*, whereas the 78 kDa band appeared only in areas bearing a calcium-phosphate precipitate as shown in *lanes B, C and E* (see open arrowheads).

**Figure 3. Localization of the ATPDase by PAGE under non-denaturing conditions of the Affi-Gel Blue fraction.** A sample (50  $\mu\text{g}$ ) of protein was loaded in each well and separated on a 4-7% polyacrylamide gel gradient containing 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium deoxycholate. Enzyme activity was revealed by a 35 min incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$  in: 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM Tris/imidazole pH 7.5 and 4 mM ATP, ADP or AMP. Released phosphate forms a white  $\text{Ca}^{2+}$  precipitate at the reaction site. A) ATP, B) ADP, C) AMP.



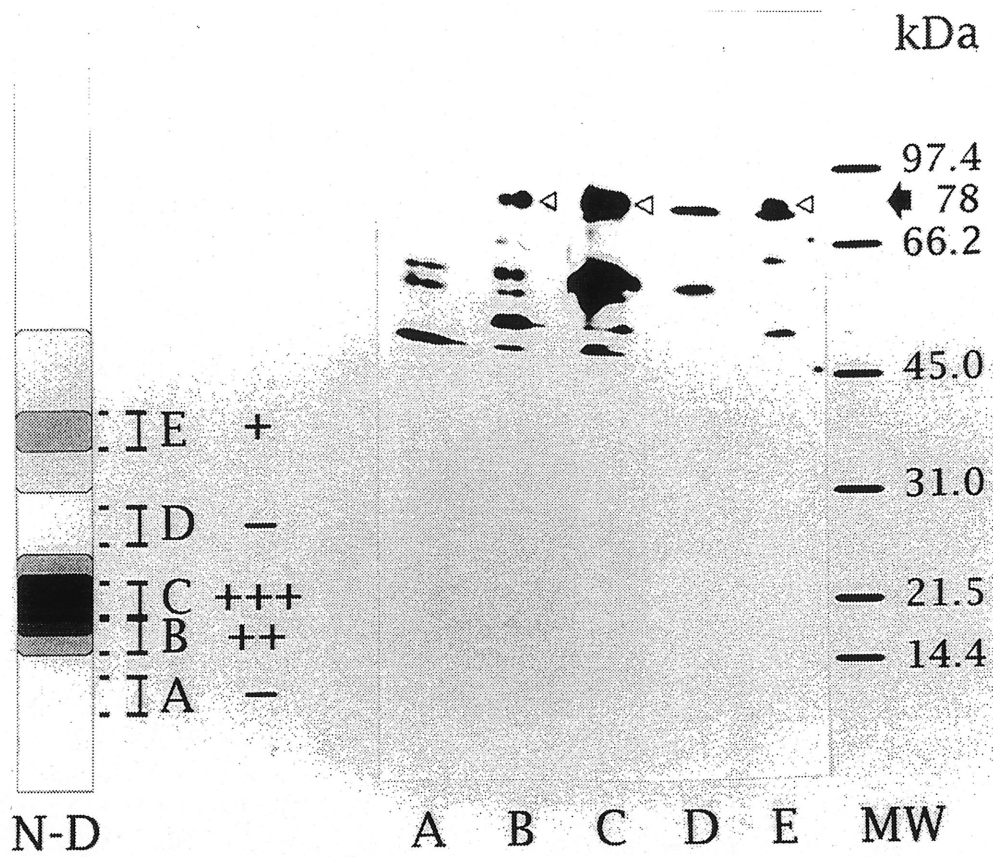


A

B

C

**Figure 4. SDS-PAGE analysis of the enzymogram obtained after separation of the Affi-Gel Blue fraction by PAGE under non-denaturing conditions.** Lane N-D: Enzymogram as described in Figure 3 (50  $\mu\text{g}$  of protein). Five areas on the gel designated as A to E were rated from “-” to “+++” on the basis of the intensity of the  $\text{Ca}^{2+}$ -phosphate precipitate. A piece of gel was excised from each area and incubated one min in 0.4% SDS and 0.5 M Tris, pH 6.8. The solution was discarded and the gel was boiled 10 min with 50 ml of 3X sample buffer (see Materials and Methods section). Each mixture was then fractionated by an SDS/8-13.5% polyacrylamide gel. The SDS gel was stained with silver nitrate. Open arrowheads indicate the 78 kDa polypeptide identified as the ATPDase. Lane MW: molecular-mass standards.



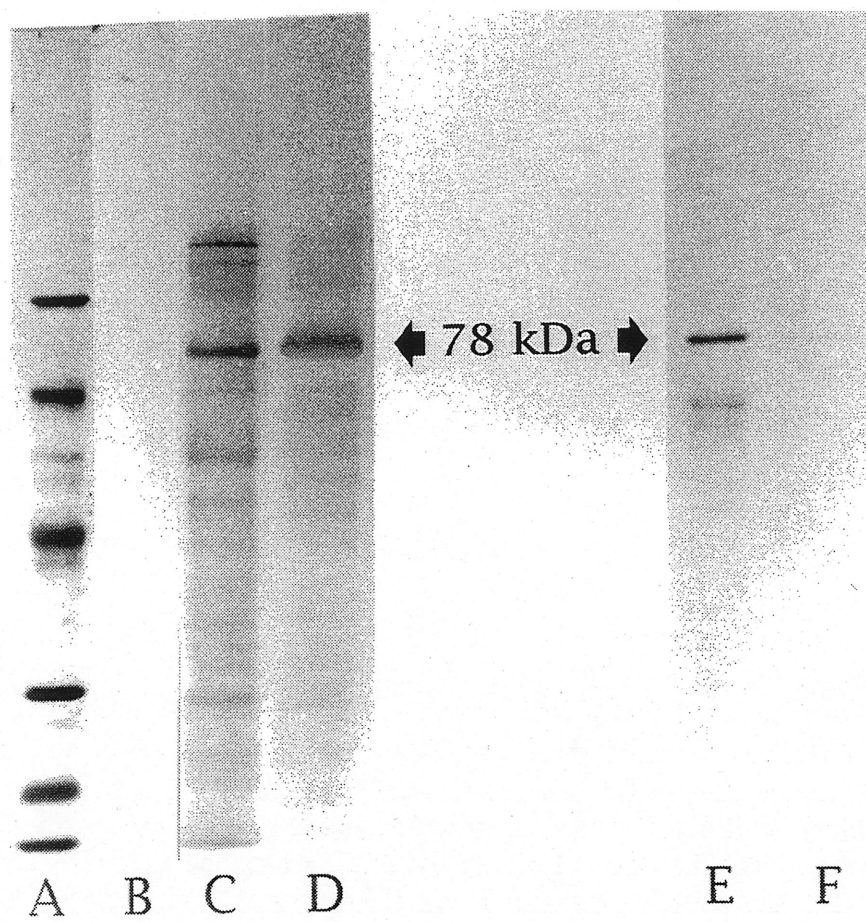
## FSBA labelling of the ATPDase

The nucleotide-binding properties of the 78 kDa polypeptide were demonstrated by affinity labelling to FSBA, an ATP analogue which covalently binds to ATP-binding sites (8). An incubation period of 7 min with 0.125 mM FSBA was chosen in order to inhibit both ATPase and ADPase activities of the DEAE or Affi-Gel Blue fractions by 25%, which was a good compromise for both labelling and competition experiments (not shown). Labelled proteins were identified on Western blot (Figure 5) with a polyclonal antibody specific for FSBA developed in our laboratory (32). Specificity of the latter antibody is shown in *lane B*, where no reaction could be detected from a protein fraction that was incubated without FSBA. After incubation with FSBA, several polypeptides of the DEAE fraction were recognized by the anti-FSBA antibody, the strongest signal corresponding to the 78 kDa band (Figure 5, *lane C*). Immunodetection of the 78 kDa band was enhanced on the Affi-Gel Blue purified fraction, while the other ATP-binding proteins were eliminated (Figure 5, *lanes D and E*). Addition of an excess of ATPDase substrates,  $\text{Ca}^{2+}$ -ADP (not shown) or  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP, to the incubation medium before FSBA totally prevented FSBA labelling of the 78 kDa band, as would be expected for an ATPDase (Figure 5, *lane F*).

## The 78 kDa ATPDase is a glycoprotein

We have previously shown that the bovine aorta ATPDase could specifically bind the lectins Concanavalin A and WGA (33). Here, the WGA-agarose column was successfully used to further purify the lung enzyme. About 95% of the ATPDase activity was bound to the lectin and about 60% of it could be specifically eluted by GlcNAc. SDS-PAGE analysis of the WGA eluted fraction revealed by silver staining the presence of the diffuse brownish 78 kDa band, we identified as the ATPDase in Figure 4, and three other bands: a wide band around 60 kDa, and 2 very weak bands (Figure 6). N-glycosidase F treatment of the WGA fraction, which removes N-linked oligosaccharide chains from glycoproteins, shifted the

**Figure 5. Western blot of FSBA-labelled proteins from the DEAE and Affi-Gel Blue fractions.** Protein samples were incubated with FSBA as described in Materials and Methods section, fractionated on SDS/8-13.5% polyacrylamide gel and transferred to an Immobilon-P membrane. The membrane was incubated with rabbit anti-FSBA antibodies, which were detected with a secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase. Thirty  $\mu\text{g}$  of DEAE purified proteins were used in lanes B and C, and 20  $\mu\text{g}$  of Affi-Gel Blue purified proteins were used in lanes D, E and F. Lane A, molecular-mass standards: 97.4, 66.2, 45.0, 31.0, 21.5 and 14.4 kDa; lane B, DEAE fraction without FSBA; lane C, FSBA-labelled DEAE proteins; lane D, FSBA-labelled Affi-Gel Blue proteins; lane E, same as D on another gel. Lane F, the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP during incubation with FSBA prevented the labelling of the 78 kDa protein purified by Affi-Gel Blue chromatography.



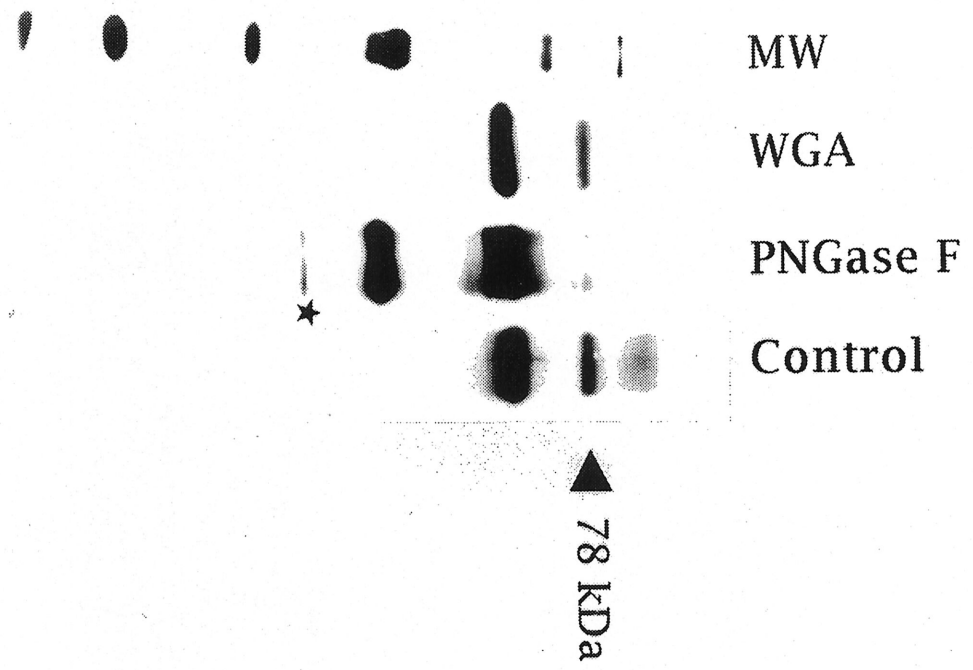
protein bands to lower molecular masses, including the 78 kDa polypeptide (Figure 6). Final identification of the deglycosylated form of the 78 kDa protein was carried out by Western blot with an antiserum raised against a fragment of the pancreas ATPDase. This antibody specifically detected the 78 kDa lung ATPDase from the WGA-agarose and Affi-Gel Blue fractions (Figure 7, *lanes B and C*) as well as from the particulate fraction (not shown). After N-glycosidase F treatment of the Affi-Gel Blue fraction, the antibody detected only a 54 kDa polypeptide (Figure 7, *lane D*). Control experiments without N-glycosidase F failed to shift any band, thereby ruling out the possibility of a potential proteolytic cleavage by some endogenous proteases (Figure 6, and Figure 7, *lane C*). It is noteworthy that the same SDS-PAGE pattern was obtained for the 78 kDa band in the absence of mercaptoethanol and without boiling the samples (not shown).

### **Immunolocalization of the bovine lung ATPDase**

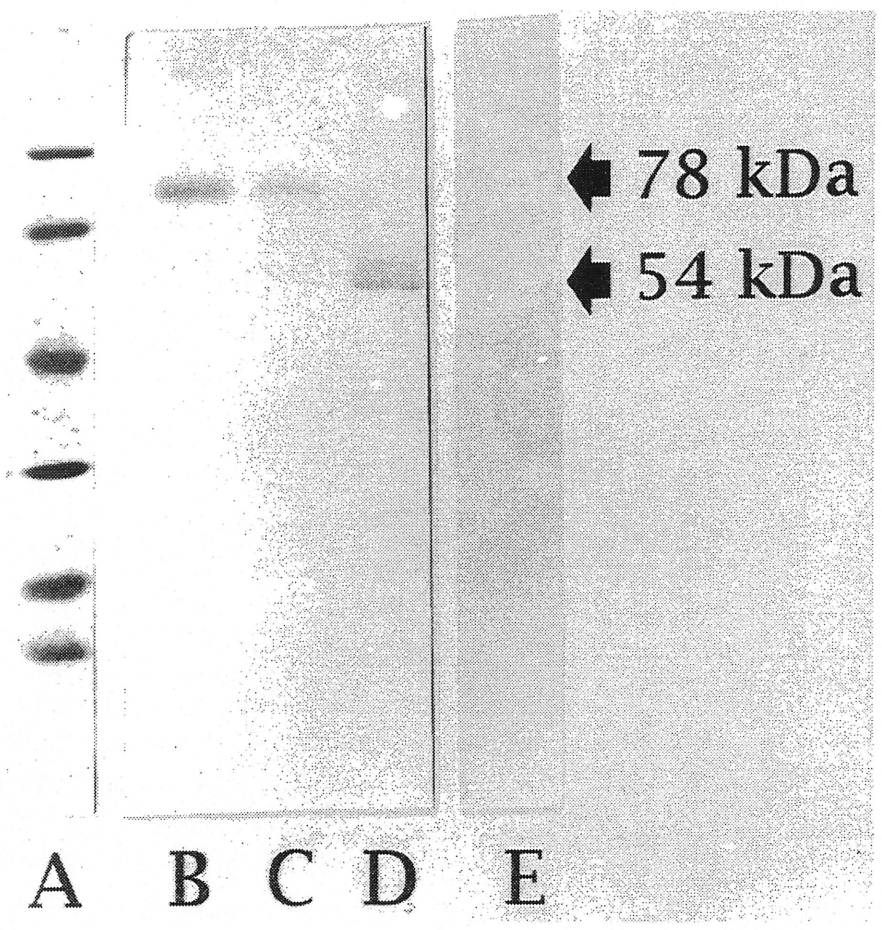
Since the pancreas anti-ATPDase antibody cross-reacted specifically on Western blot with the lung ATPDase (Figure 7), this antibody was used to establish the enzyme distribution in the bovine respiratory system. In the trachea, a very strong signal was observed on the pseudo-stratified columnar epithelium (Figure 8A). Immunostaining was more intense on the apical than on the basolateral membranes, and the ATPDase was not detected on basal cells. Submucosal glands reacted with the antibody with variable intensity among acinar cells (Figure 8B), which was not observed in control sections (Figure 8C). Tracheal airway smooth muscle cells were also immunoreactive (not shown). Figure 8D presents a section of lower bronchus stained with hematoxylin and eosin, featuring a cartilaginous ring beneath the epithelium. Figure 8E shows that the ATPDase is also present on epithelial cells of smaller airways. In the cartilage, the chondrocytes were strongly immunoreactive, but not the surrounding mesenchymal cells (Figure 8E). ATPDase-immunoreactive cells were also detected in the wall of bronchioles and small blood vessels, as well as in alveolar sacs (Figure 9A). Higher magnification of the respiratory tissue clearly shows the presence of ATPDase on both epithelial and smooth muscle cells of bronchioles, as well as on endothelial and smooth

Figure 6. **N-glycosidase F treatment of the WGA-agarose purified fraction.** The purified fraction was fractionated on SDS/8-13.5% polyacrylamide gel. The SDS gel was stained with silver nitrate. Six  $\mu\text{g}$  of proteins were used in each assay. Lane MW, molecular-mass standards: 97.4, 66.2, 45.0, 31.0, 21.5 and 14.4 kDa; lane WGA, purified fraction; lane PNGase F, fraction incubated with N-glycosidase F, followed by dialysis and lyophilization; lane Control, fraction incubated without N-glycosidase F, followed by dialysis and lyophilization. The star designates N-glycosidase F on the gel.

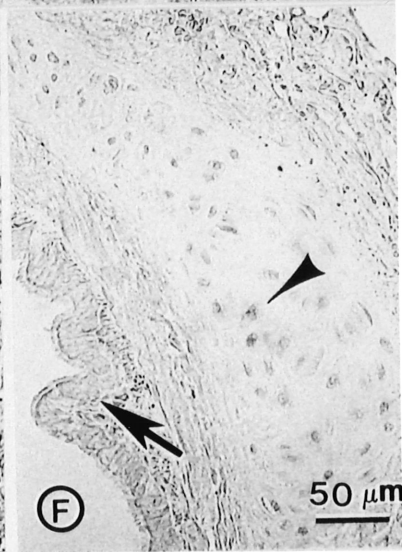
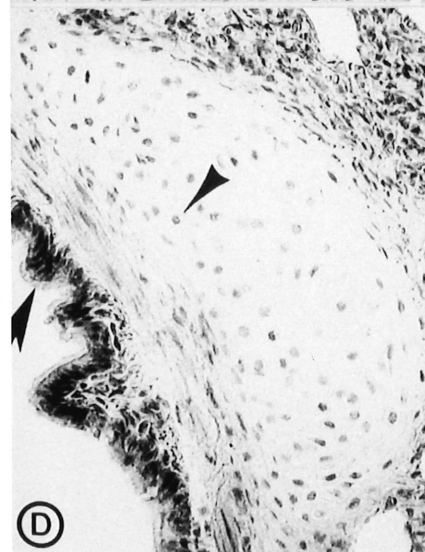
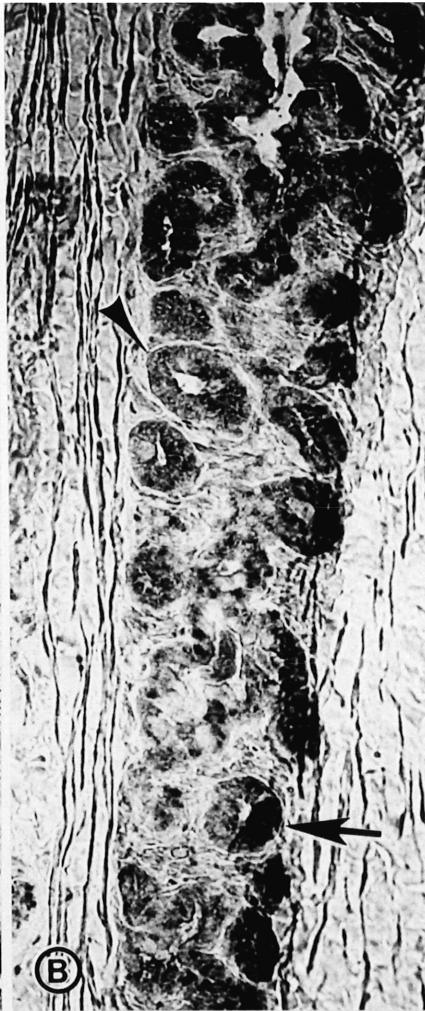




**Figure 7. Immunodetection of the lung ATPDase with anti-ATPDase antibodies.** Affi-Gel Blue or WGA-agarose purified fractions were fractionated on an SDS/8-13.5% polyacrylamide gel, transferred to an Immobilon-P membrane and incubated with the antiserum, as described in Materials and Methods section. Lane A, molecular-mass standards: 97.4, 66.2, 45.0, 31.0, 21.5 and 14.4 kDa; lane B, WGA-agarose fraction (5  $\mu$ g); lane C, control: Affi-Gel Blue fraction incubated without N-glycosidase F (6  $\mu$ g); lane D, Affi-Gel Blue fraction incubated with N-glycosidase F (6  $\mu$ g); lane E, preimmune serum on a WGA-agarose fraction (5  $\mu$ g).



**Figure 8. Immunohistological localization of the ATPDase in the bovine respiratory tract.** *A*: Section of a trachea showing a strong signal on the apical membrane of the pseudostratified columnar epithelium, with some staining of the basolateral membranes (arrow), and on the submucosal glands (arrowheads). Basal cells and the connective tissue matrix showed no reaction. *B*: Heterogeneous staining of the submucosal gland cells showing strong (arrow) and weak reactions (arrowhead). *C*: Control with preimmune serum, showing no staining of the epithelial cells (arrow) and submucosal glands (arrowheads). *D*: Histology of a bronchus stained with hematoxylin and eosin, featuring the pseudo-stratified columnar epithelium (arrow) and the chondrocytes of the hyaline cartilage (arrowhead). *E*: Immunolocalization of the ATPDase on the epithelial cells (arrow) and chondrocytes (arrowhead), but not on the surrounding mesenchymal cells. *F*: Control with preimmune serum. Original magnifications: *A* to *F* (X 200).



**Figure 9. Immunohistological localization of the ATPDase at the level of bronchioles and alveoli.** *A*: Section through the lung showing very strong signals on bronchioles (big arrow), on endothelial (arrowhead) and smooth muscle cells (snake arrow) of arteries, as well as on alveolar cells (open arrow). *B*: Control with preimmune serum. Non-specific signals in the lumen of blood vessels were occasionally observed, as seen in *A* after immunolabelling (small arrow). *C*: Higher magnification of a constricted bronchiole showing a strong signal on both epithelial (arrow) and smooth muscle cells (arrowhead). *D*: Same magnification as in *C* indicating the presence of ATPDase on epithelial (arrow) and smooth muscle cells of a semi-dilated bronchiole, as well as on vascular smooth muscle cells in transversal (arrowhead) and longitudinal (snake arrow) orientation. Connective tissue matrix shows no reaction. Original magnifications: *A, B* (X 50); *C, D* (X 200).

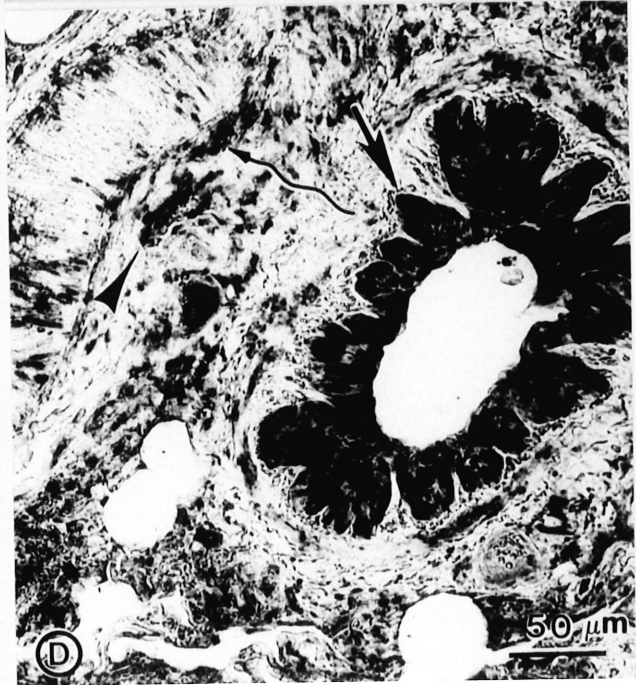
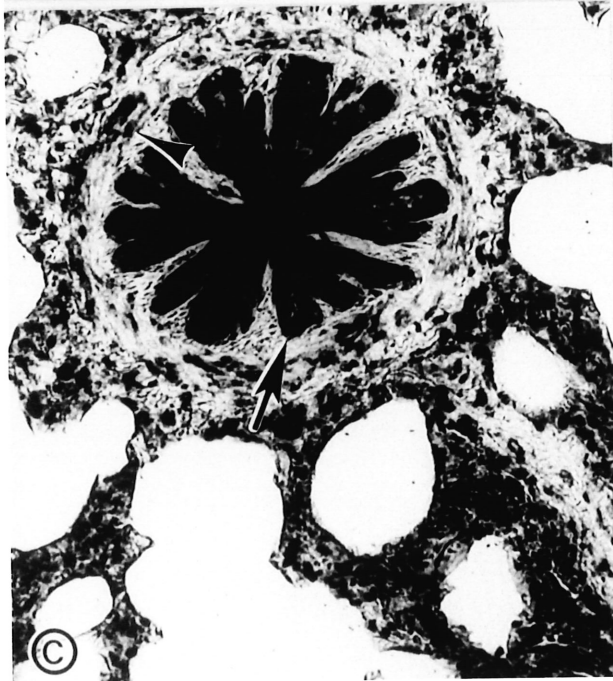
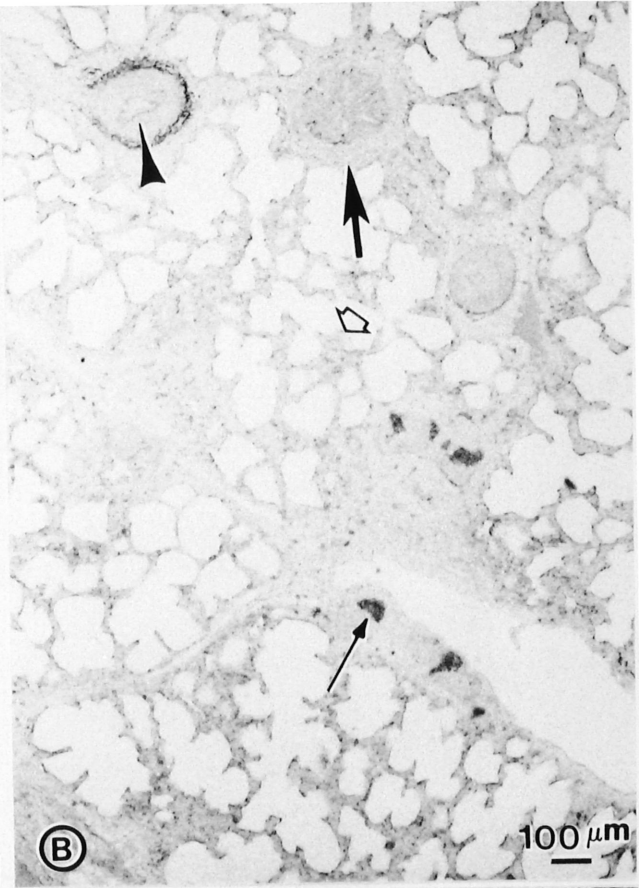
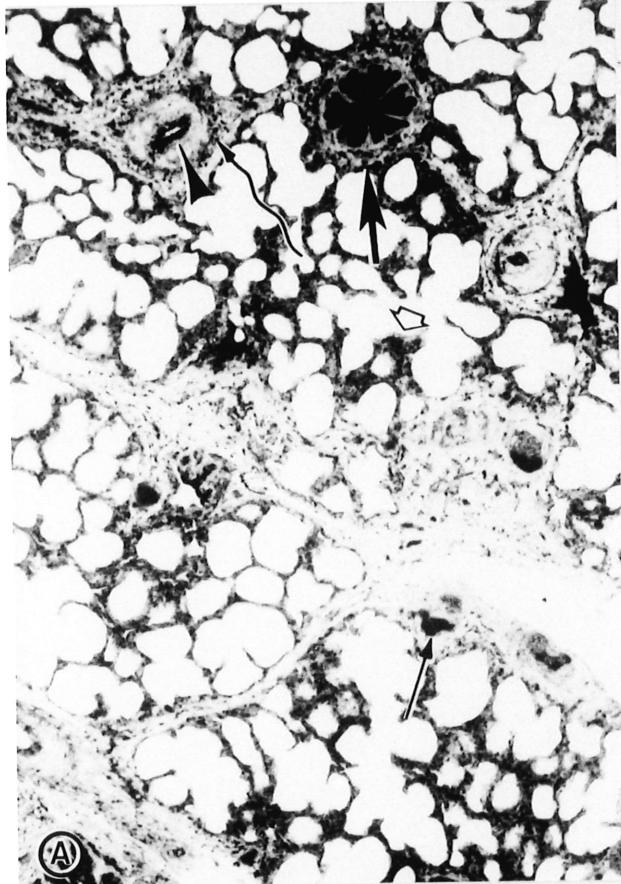
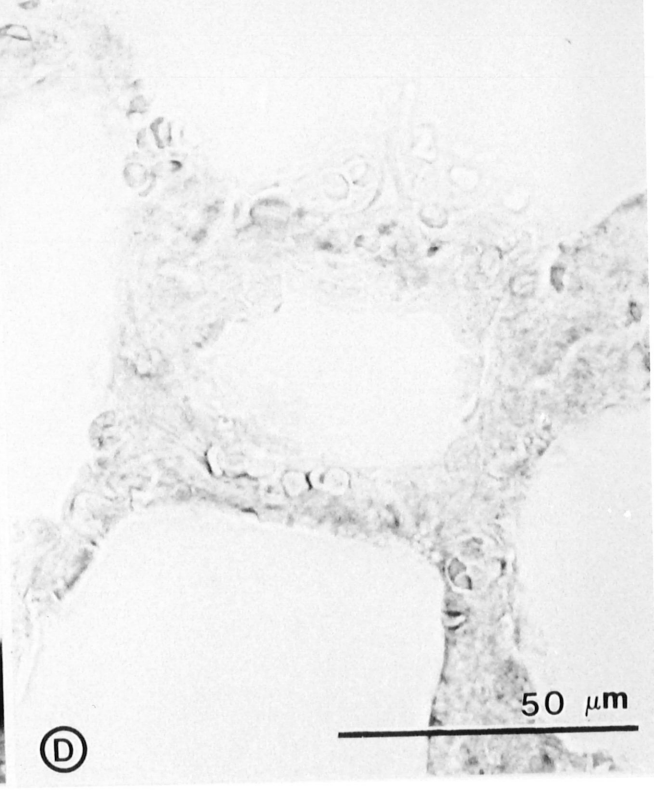
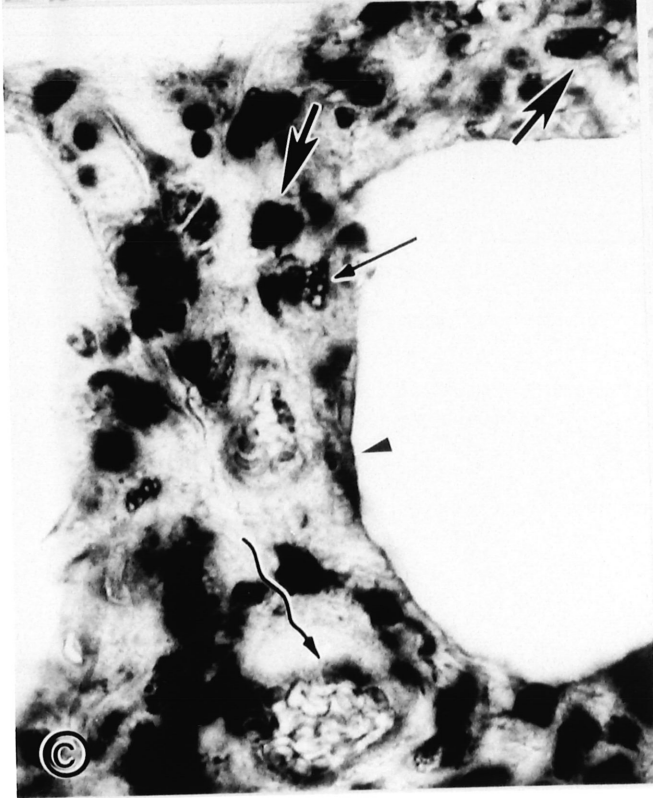
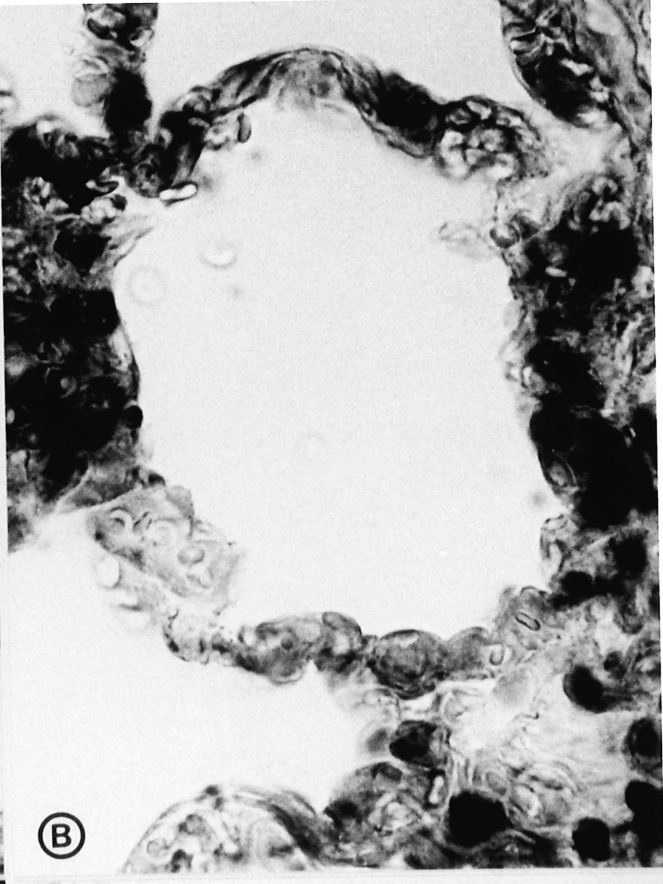
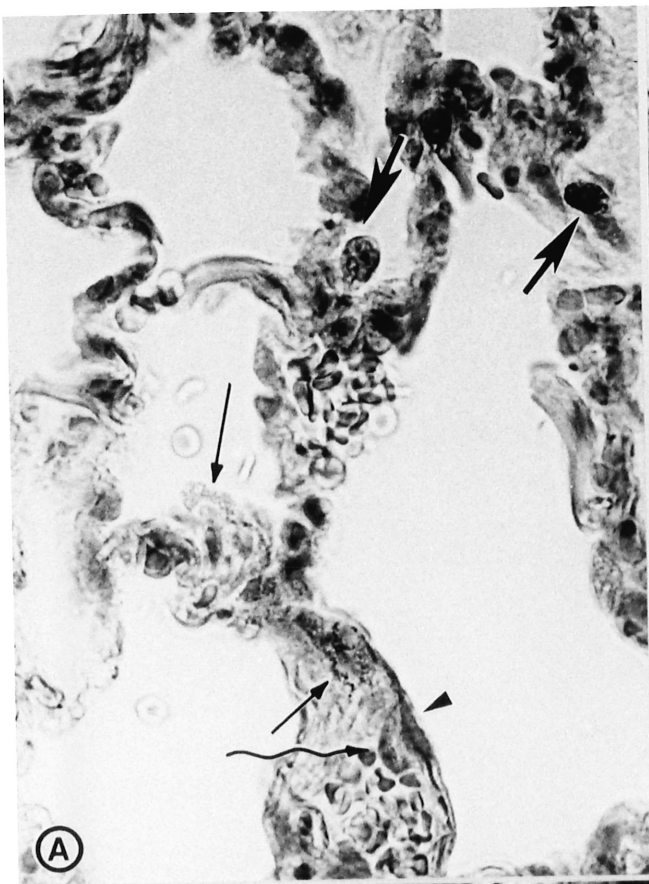
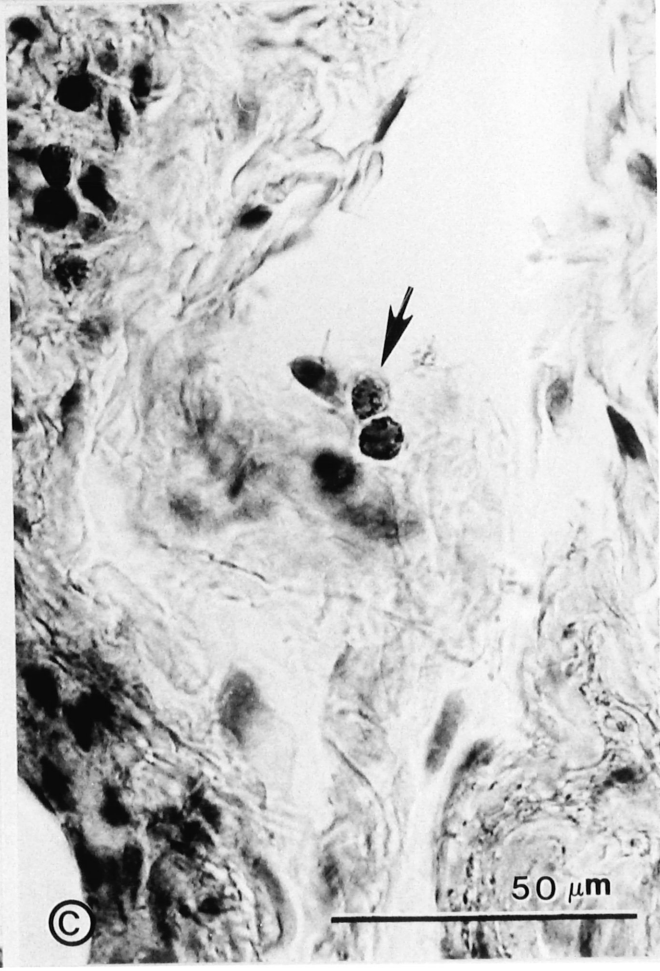
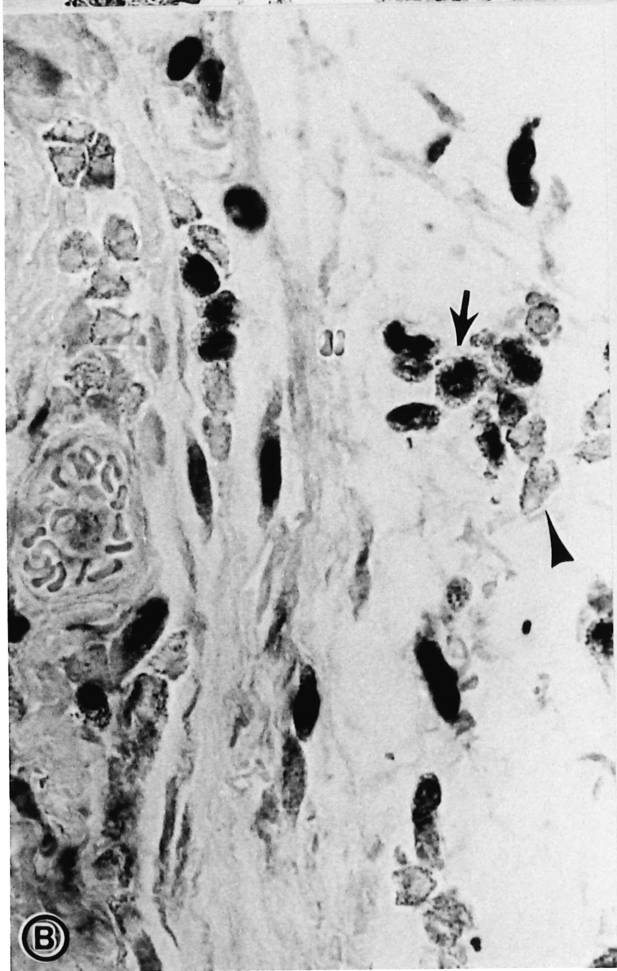
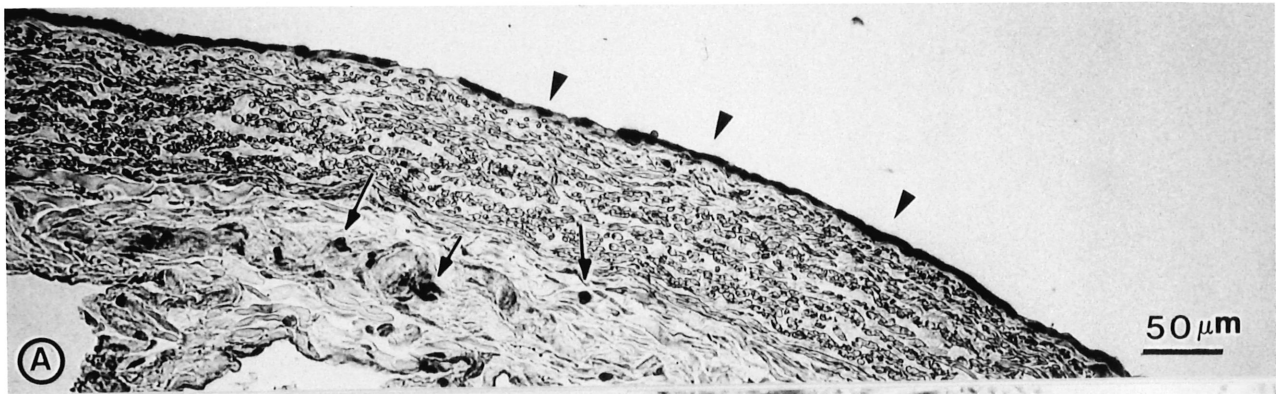


Figure 10. **Immunohistological localization of the ATPDase in alveolar sacs.** *A*: Histology of the alveolar sacs stained with hematoxylin and eosin, showing squamous cells (arrowhead), cuboidal septal cells (small arrows), macrophages (big arrows) and capillary endothelial cells (snake arrow). *B and C*: Most cell types of alveolar sacs which include pneumocytes (arrowhead and small arrow), macrophages (big arrows) and endothelial cells (snake arrow), were strongly immunostained. Notice that erythrocytes and connective tissue matrix are unreactive. *D*: Control with preimmune serum. Original magnifications: *A to D* (X 800).





**Figure 11. Immunohistological localization of the ATPDase at the level of the visceral pleura.** *A*: Immunostaining was detected on mesothelial cells (arrowheads) and on cells embedded in the elastic network of the pleura (arrows). No reaction was detected on collagen or elastin fibers. *B*: Higher magnification of the innermost layer of the pleura indicating that these cells are eosinophils. Notice the presence of both immunoreactive (arrow) and non-reactive eosinophils (arrowhead). *C*: Eosinophils observed after staining by hematoxylin and eosin (arrow). Original magnifications: *A* (X 200); *B*, *C* (X 800).



muscle cells of small vessels (Figure 9C,D). Figure 10A shows alveolar sacs stained with hematoxylin and eosin. Alveolar pneumocytes, capillary endothelial cells and macrophages were all strongly reactive to the anti-ATPDase antibody (Figure 10B,C). We also noticed that erythrocytes trapped in the vessels did not react with the antibody (see Figure 10C, snake arrow), their coloration being comparable to those found in control tissues (Figure 10D). Finally, the ATPDase was also detected in the lung outermost tissue layers: in the mesothelium and in granulocytes localized in the pleura (Figure 11A). Higher magnification of the innermost layer of the pleura indicated that not all granulocytes were immunoreactive (Figure 11B). These cells were identified as eosinophils from their cytological characteristics and their strong staining by eosin (Figure 11C).

## DISCUSSION

In this study, we have purified and identified the polypeptide responsible for ATPDase activity in bovine lungs. Analysis of SDS-PAGE bands, obtained from enzymograms after electrophoresis under non-denaturing conditions, has indicated that this polypeptide has an apparent molecular mass of 78 kDa. This finding was corroborated by affinity labelling with FSBA, an analogue of ATP which covalently links ATP-binding sites of proteins (8). The 78 kDa protein was specifically labelled by FSBA, as shown on Western blot using a polyclonal antibody to FSBA. As an additional proof for the identification of this band as an ATPDase, rabbit polyclonal antibodies raised against the N-terminal amino acid sequence of the pig pancreas ATPDase cross-reacted specifically with the 78 kDa protein band. We also showed, by WGA-agarose chromatography and N-glycosidase F treatment, that the lung ATPDase is a glycoprotein. Indeed, removal of the N-linked oligosaccharide chains by N-glycosidase F treatment shifted the molecular mass of the 78 kDa polypeptide down to 54 kDa, as identified by Western blot with the anti-ATPDase antibody. Assuming a molecular mass contribution of 2-4 kDa per oligosaccharide, the lung ATPDase would be expected to bear 6 to 12 N-linked oligosaccharide chains.

We have previously described different isoforms of ATPDase in mammalian tissue, type-I ATPDase in pig pancreas and type-II ATPDase in bovine aorta. N-glycosidase F treatment reduced the molecular mass of the type-I ATPDase from 54 to 35 kDa (32, 33), whereas the molecular mass of the type-II ATPDase was shifted from 78 to 54 kDa (33). These findings suggest that the lung ATPDase would correspond to the aorta isoform. However, these two ATPDases show different patterns of migration after PAGE under non-denaturing conditions (27). Also, their native molecular mass, estimated from  $^{60}\text{Co}$  irradiation-inactivation curves, were 70 and 190 kDa, respectively (27, 14). These discrepancies suggest that lung and aorta ATPDases may differ in their native form, either as a result of different multimerisations of the 78 kDa unit and/or by association with other proteins. The fact that the 78 kDa protein was found in the two active gel bands detected after PAGE under non-denaturing conditions supports this view. The ATPDase complex was completely dismantled after SDS-PAGE, since the anti-ATPDase antibody detected only the 78 kDa protein band on Western blot. The dissociation was not affected by mercaptoethanol, thereby indicating that the integrity of this complex may not be dependent on disulfide bridges. Other ATPDases of molecular mass comparable to the lung and aorta enzymes have been reported, a protein of 82 kDa in human placenta (12), and a protein of 80 kDa in chicken oviduct (36).

Immunolocalization of the ATPDase in the conducting airways, showed that it was highly concentrated on the apical membrane of epithelial cells, with a weaker signal on basolateral membranes. This heterogeneity in enzyme density on airway epithelium was previously reported for an ecto-ATPase in rat trachea by cytochemistry (2). ATPDase was not detected on epithelial basal cells, which eventually differentiate into specialized ciliated or secretory cells to replace those lost by desquamation (7), indicating that the appearance of the enzyme is part of the differentiation process. ATPDase was also detected on smooth muscle cells throughout the conducting airways. This enzyme most probably corresponds to the ecto-ATPase previously localized in rat trachea smooth muscles by cytochemistry (2) and to the ATPDase activity measured at the surface of bovine trachea smooth muscle cells (28). Submucosal glands were recognized by the

anti-ATPDase antibody. Heterogeneity in enzyme density among acinar cells may result from this mixed population of serous- and mucus-secreting cells (7). The ATPDase was also present in airways cartilage rings, more specifically on chondrocytes. This constitutes the first report of an ectonucleotidase in lung cartilage. However, an ATPase activity has been detected by cytochemistry on the plasma membrane of epiphyseal growth-plate cartilage chondrocytes (1).

In lung parenchyma, the anti-ATPDase antibody reacted with most alveolar cells including macrophages and pneumocytes. To our knowledge, the presence of ectonucleotidases on pneumocytes has not been previously reported, whereas a macrophage ecto-ATPase has been described in alveoli (22) and other tissues (10, 35). The latter enzyme has a broad substrate specificity and is activated either by  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  (35). In addition, we found an ATPDase on granulocytes identified as eosinophils. The roles of extracellular nucleotides in inflammatory responses are just starting to emerge, with the recent findings of  $\text{P}_1$ - and  $\text{P}_2$ -purinoceptors on macrophages, mast cells, granulocytes and lymphocytes (4, 26). Finally, the ATPDase was detected on pleural mesothelial cells and throughout lung vascular tissues, on endothelial and smooth muscle cells. On the latter cells, the ATPDase could explain the ecto-ATPase and ecto-ADPase activities previously reported in lung vessels by cytochemistry and perfusion studies (6, 11, 15, 34).

In conclusion, we have purified and identified the lung ATPDase as a glycoprotein of 78 kDa. This enzyme was immunolocalized in airways and blood vessels throughout the respiratory system, including epithelial, endothelial, smooth muscle and inflammatory cells. Such a wide distribution of the ATPDase in lungs suggests the importance of controlling extracellular concentrations of nucleotides for the maintenance of lung homeostasis.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Quebec Heart and Stroke Foundation and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). J. Sévigny is a recipient of Scholarships from "Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec" (FCAR) and from the Heart and Stroke Foundation of Canada, and M. Picher is a recipient of a Scholarship from "Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

## REFERENCES

1. Akisaka, T., and C. V. Gay. Ultrastructural localization of calcium-activated adenosine triphosphate ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) in growth-plate cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 925-932, 1985.
2. Ando, T., H. Mayahara, K. Fujimoto, H. Miyajima, and K. Ogawa. Ultracytochemical localization of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity on the epithelial cells of rat trachea. *Acta Histochem. Cytochem.* 15: 812-826, 1982.
3. Bakhle, Y. S., and R. Chelliah. Effect of streptozotocin-induced diabetes on the metabolism of ADP, AMP and adenosine in the pulmonary circulation of rat isolated lung. *Diabetologia* 24: 455-459, 1983.
4. Bakker, W. W., K. Poelstra, M. A. Barradas, and D. P. Mikhailidis. Platelets and ectonucleotidases. *Platelets* 5: 121-128, 1994.
5. Beaudoin, A. R., J. Sévigny, and M. Picher. ATP-Diphosphohydrolases, Apyrases, and Nucleotide Phosphohydrolases: Biochemical Properties and Functions. In: *Biomembranes*, edited by A. G. Lee. Greenwich, CT: JAI Press Inc., vol. 5, p. 369-401, 1996.

6. Binet, L., and M. Burstein. Poumon et action vasculaire de l'adénosine triphosphate (ATP). *Presse Méd.* 58: 1201-1203, 1950.
7. Breeze, R. G., and E. B. Wheeldon. The cells of the pulmonary airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 116: 705-777, 1977.
8. Buhrow, S. A., and J. V. Staros. 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyladenosine as a probe of ATP-binding sites in hormone receptor-associated kinase. *Methods Enzymol.* 109: 816-827, 1985.
9. Burnstock, G. Purinergic mechanisms. *Ann. NY Acad. Sci.* 603: 1-542, 1990.
10. Chakravarty, N., and Z. Echeteu. Plasma membrane adenosine triphosphatases in rat peritoneal mast cells and macrophages. The relation of the mast cell enzyme to histamine release. *Biochem. Pharmacol.* 27:1561-1569, 1978.
11. Chelliah, R., and Y. S. Bakhle. The fate of adenine nucleotides in the pulmonary circulation of isolated lung. *Q. J. Exp. Physiol.* 68: 289-300, 1983.
12. Christoforidis, S., T. Papamarcaki, D. Galaris, R. Kellner, and O. Tsolas. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. *Eur. J. Biochem.* 234: 66-74, 1995.
13. Cooper, D. R., G. P. Lewis, G. E. Lieberman, H. Webb, and J. Westwick. ADP metabolism in vascular tissue, a possible thrombo-regulatory mechanism. *Thromb. Res.* 14: 901-914, 1979.
14. Côté, Y. P., M. Picher, P. St-Jean, R. Béliveau, M. Potier, and A. R. Beaudoin. Identification and localization of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) in bovine aorta: relevance to vascular tone and platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* 1078: 187-191, 1991.
15. Crutchley, D. J., T. E. Eling, and M. W. Anderson. ADPase activity of isolated perfused rat lung. *Life Sci.* 22: 1413-1420, 1978.



16. Crutchley, D. J., U. S. Ryan, and J. W. Ryan. Effects of aspirin and dipyridamole on the degradation of adenosine diphosphate by cultured cells derived from bovine pulmonary artery. *J. Clin. Invest.* 66: 29-35, 1980.
17. Farmer, J. B., and D. G. Farrar. Pharmacological studies with adenine, adenosine and some phosphorylated derivatives on guinea-pig tracheal muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 28: 748-752, 1976.
18. Fedan, J. S., J. J. Belt, L.-X. Yuan, and D. G. Frazer. Relaxant effects of nucleotides in guinea pig isolated, perfused trachea: lack of involvement of prostanoids, Cl<sup>-</sup> channels and adenosine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 217-220, 1992.
19. Fredholm, B. B., M. P. Abbracchio, G. Burnstock, J. W. Daly, T. K. Harden, K. A. Jacobson, P. Leff, and M. Williams. IV. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46: 143-156, 1994.
20. Jones, T. R., N. M. Lefcoe, and J. T. R. Hamilton. Pharmacological study of adenosine and related compounds on isolated guinea pig trachea: evidence for more than one type of purine receptor. *Can. J. Physiol. Pharm.* 58: 1356-1365, 1980.
21. Kim, K. C., and B. C. Lee. P<sub>2</sub>-purinoceptor regulation of mucin release by airway goblet cells in primary culture. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1053-1056, 1991.
22. Low, E. S., R. B. Low, and G. M. Green. Correlated effects of cigarette smoke components on alveolar macrophage adenosine triphosphatase activity and phagocytosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115: 963-970, 1977.
23. Mason, S. J., A. M. Paradiso, and R. C. Boucher. Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1649-1656, 1991.

24. Miller, R. T., and C. Estran. Heat-induced epitope retrieval with a pressure cooker. *Appl. Immunohistochemistry* 3: 190-193, 1995.
25. Milnor, W. R. Pulmonary circulations. In: *Cardiovascular Physiology*, Oxford: University Press, 1990.
26. Picher, M. Caractérisation des ATP-diphosphohydrolases du système respiratoire des mammifères. Ph.D. Thesis. Faculty of Sciences, University of Sherbrooke, 1995, 190 p.
27. Picher, M., Y. P. Côté, R. Béliveau, M. Potier, and A. R. Beaudoin. Demonstration of a novel type of ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in the bovine lung. *J. Biol. Chem.* 268: 4699-4703, 1993.
28. Picher, M., R. Béliveau, M. Potier, D. Savaria, É. Rousseau, and A. R. Beaudoin. Demonstration of an ectoATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in non-vascular smooth muscles of the bovine trachea. *Biochim. Biophys. Acta* 1200: 167-174, 1994.
29. Plesner, L. Ecto-ATPases: Identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158: 141-214, 1995.
30. Ralevic, V. P, P. Milner, K. A. Kirkpatrick, and G. Burnstock. Flow-induced release of adenosine 5'-triphosphate from endothelial cells of the rat mesenteric arterial bed. *Experimentia* 48: 31-34, 1992.
31. Rice, W. R., and F. M. Singleton. P<sub>2</sub>-purinoceptors regulate surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells. *Br. J. Pharmacol.* 89: 485-491, 1986.
32. Sévigny, J., Y. P. Côté, and A. R. Beaudoin. Purification of pancreas type-I ATP diphosphohydrolase and identification by affinity labelling with the 5'-p-fluorosulfonyl benzoyladenine ATP analogue. *Biochem. J.* 312: 351-356, 1995.

33. Sévigny, J., F. P. Levesque, G. Grondin, and A. R. Beaudoin. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochim. Biophys. Acta* 1334: 73-88, 1997.
34. Smith, U., and J. W. Ryan. Pulmonary endothelial cells and the metabolism of adenine. Nucleotides, kinins and angiotensin I. *Adv. Exp. Med. Biol.* 21: 267-276, 1972.
35. Steinberg, T. H., and S. C. Silverstein. Extracellular ATP<sup>4-</sup> promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 262: 3118-3122, 1987.
36. Strobel, R. S., A. K. Nagy, A. F. Knowles, J. Buegel, and M. D. Rosenberg. Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase: Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 271: 16323-16331, 1996.
37. Wong, L. B., and D. B. Yates. Luminal purinergic mechanisms of tracheal ciliary beat frequency. *Am. J. Resp. Cell and Mol.* 7: 447-454, 1992.

## CHAPITRE 4

### COMPARAISON DE DIFFÉRENTES ISOFORMES D'ATP DIPHOSPHOHYDROLASE DE MAMMIFÈRES ET LEUR IDENTIFICATION À CD39

Dans ce chapitre nous comparons les ATPDases purifiées dans notre laboratoire et en étudions la structure primaire. Afin de séquencer ces protéines, nous avons d'abord purifié une grande quantité d'enzyme. Une séquence de 19 acides aminés de la portion N-terminale de l'ATPDase du pancréas de porc a été identifiée. Puisque la séquence N-terminale de l'enzyme de l'aorte de boeuf n'a pu être obtenue, la protéine a été fragmentée par traitement au CNBr et ses constituants séparés par HPLC. Cinq des fragments obtenus ont été séquencés. L'analyse de ces six séquences, à l'aide des banques de données, a révélé dans chacun des cas une forte homologie avec une protéine nommée CD39. Une comparaison entre CD39 et les ATPDases a montré une grande similitude entre les caractéristiques physiques de ces protéines: la masse moléculaire et le niveau de N-glycosylation étant identiques. Très récemment, CD39 a été associée à une nouvelle famille de nucléotidases dont les séquences en acides aminés partagent cinq régions conservées. Or, d'après la séquence N-terminale de l'ATPDase du pancréas de porc on peut déduire que cette protéine ne possède que les deux dernières régions conservées, suggérant ainsi que l'une d'elle soit impliquée dans l'hydrolyse des nucléotides.

Les résultats décrits dans ce chapitre ont été publiés en 1997, aux pages 143-151, dans un livre intitulé "Ecto-ATPases: recent progress on structure and function", édité par L. Plesner, T.L. Kirley et A.F. Knowles, et imprimé par Plenum Publishing Corporation à New York. Madame F. Dumas a produit les six séquences en acides aminés, à partir des échantillons que nous lui avons fournis.

# **Purification and Identification by Immunological Techniques of Different Isoforms of Mammalian ATP Diphosphohydrolases**

Jean Sévigny\*, France Dumas§ and Adrien R. Beaudoin\*

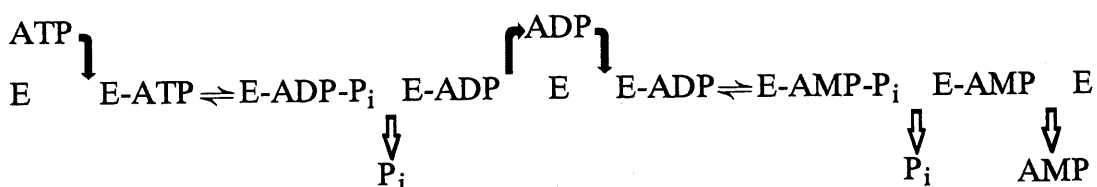
\* Département de biologie, Faculté des sciences,  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Québec, CANADA, J1K 2R1

§ Conseil National de Recherches du Canada,  
Institut de recherche en biotechnologie  
6100, avenue Royalmount  
Montréal, Québec, CANADA, H4P 2R2

## ATP DIPHOSPHOHYDROLASES: A WIDE DISTRIBUTION

Apyrases or ATP diphosphohydrolases (ATPDases: EC 3.6.1.5) first mentioned by Meyerhof in 1945<sup>1</sup> refer to a family of enzymes that catalyse the hydrolysis of the  $\gamma$  and  $\beta$  phosphate residues of triphospho- and diphosphonucleosides. The original report by Kalckar in 1944<sup>2</sup> of an ATPDase in potato extracts initiated a series of studies on this enzyme (for reviews see 3, 4). Two isoforms have been described from *Solanum tuberosum*, varieties Desirée and Pimpernel respectively<sup>5</sup>. ATPDases were later found in other plant tissues: cabbage leaves, clover seeds, pea plumules, chick-pea roots, Alaska pea stems, *Mimosa pudica* pulvinus and yellow lupin cotyledons<sup>3, 4</sup>. The role of ATPDases in plants has not yet been clearly defined but an implication in starch synthesis has been proposed<sup>6</sup>. ATPDases have been reported in invertebrates including hematophagous insects, ticks and leeches (for reviews see 3, 4 and 7) and in a parasitic worm<sup>8</sup>. In most of these species, ATPDases would act as antiplatelet agents preventing blood clotting<sup>3, 7</sup>. The enzyme also exists in prokaryotes<sup>9-11</sup>, among them, a virulent *Shigella* where it is localized in the periplasmic space. In the latter case, it was suggested that the ATPDase plays the role of a general cytotoxin involved directly or indirectly in the actual killing of the host cells<sup>11</sup>.

In 1980 LeBel *et al.* partially purified (270 fold) and characterised an ATPDase from mammalian tissues<sup>12</sup>, the pig pancreas (isoform I). A couple of years later, Laliberté *et al.* further purified the enzyme (1500 fold) and described some of its kinetic properties<sup>13</sup>. They showed that pancreas ATPDase catalyses the hydrolysis of ATP and ADP according to the following scheme<sup>14</sup>:



By keeping free  $\text{Ca}^{2+}$  or free  $\text{ATP}^{4-}$  constant, they showed that  $\text{Ca}^{2+}$  exerts its kinetic effects only through its binding to  $\text{ATP}^{4-}$ ;  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}^{2-}$  being a better substrate. It is noteworthy that the enzyme was not activated by free  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>13</sup>. Pancreas ATPDase apparently differs from most of the ATPDases by the fact that it can also hydrolyse  $\text{ATP}^{4-}$  <sup>13</sup> whereas most of the ATPDases use  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}$  and  $\text{-ADP}$  complexes, as substrates. In these cases free  $\text{ATP}^{4-}$  could potentially act as a competitive inhibitor.

In 1983, Knowles *et al.* reported ATPDase activities in mammalian cells<sup>15</sup>. In 1987, Miura *et al.* described an ATPDase in bovine aorta microsomes and suggested that it worked as an antiplatelet agent<sup>16</sup>. Côté *et al.* further characterised the bovine aorta ATPDase<sup>17-19</sup> and concluded that the bovine aorta enzyme was different from the pig pancreas ATPDase. Indeed, these enzymes differed in many respects: pH dependency profiles, heat denaturation curves, <sup>60</sup>Co irradiation-inactivation curves and enzyme localizations after polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under non-denaturing conditions. More recently, Picher *et al.* described an ATPDase in bovine lungs<sup>20</sup> that displayed biochemical properties quite similar to those of the bovine aorta enzyme but some differences were observed leading them to propose a third isoform. To further define the biochemical properties and to clarify the structural relationship between these different isoforms of ATPDases, it became essential to purify them. We summarise the results obtained with these various ATPDase isoforms in Table 1.

## **PURIFICATION OF MAMMALIAN ATPDASES**

### **Pig pancreas ATPDase: isoform I**

The pig pancreas enzyme was purified according to the following procedure. Briefly, after homogenisation of the tissues, the zymogen granule membrane was isolated. Proteins were solubilized with Triton X-100 resulting in a loss of about

**Table 1. Biochemical properties of mammalian ATP diphosphohydrolases purified in our laboratory**

ATPDase (isoforms)	Optimum pH (substrate)	apparent $K_m$ (in $\mu\text{M}$ )		Molecular mass (in kDa)	PNGase F treatment (in kDa)	FSBA labelled	Ratio* ATP/ADP	References
		ATP	ADP					
Pig pancreas (I)	8.0 (ATP) 8.5 (ADP)	7.3 <sup>12</sup> 3.1 <sup>14</sup>	7.4 <sup>12</sup> 5.6 <sup>14</sup>	54	35	+	1.3	12, 14, 21
Bovine aorta (II)†	7.5 (ATP & ADP)	23 ± 3 <sup>19</sup> 14.1±1.3 <sup>22</sup>	- 12.0±1.9 <sup>22</sup>	78	54	+	1.1	17, 19, 22, 23
Bovine lung†‡	7.5 (ATP & ADP)	7 ± 2	?	78	54	+	1.0	20, 24
Bovine heart (I & II)	7.5 (ATP & ADP)	?	29	78 & 56	?	?	1.1	25
Human CD39	?	?	?	78	54	?	?	26

\* The ATP/ADP ratio is influenced by the incubation buffer and pH. The ATP/ADP ratio from the purified pancreas ATPDase was evaluated at pH 8.0 and for the aorta, lung and heart enzyme at pH 7.5.

† Western blot showed also the presence of a weak proportion of the isoform I in the bovine aorta and lung particulate fraction<sup>23, 27</sup>.

‡ This type of ATPDase shows different properties when compared to the aorta enzyme (see text).



33% of either ATPase or ADPase activity. The ATPDase was further purified by DEAE-agarose and Affi-Gel Blue-sepharose chromatographies. Even though the steps mentioned above produced an enrichment in ADPase activity by about 3500 fold when compared with the homogenate, the enzyme was not yet in a homogeneous state. Further purification was obtained by fractionation by PAGE under non-denaturing conditions. The enzyme could be visualised directly in the gel. A single band of activity was obtained with either ATP or ADP as the substrate (Figure 1). When the latter band of activity was fractionated by SDS-PAGE, a protein with a molecular mass of about 54-56 kDa was put in evidence<sup>21</sup>. This polypeptide bears an ATP-binding site, as demonstrated by labelling with the ATP analogue 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl adenosine (FSBA), detected by a Western blot technique<sup>21</sup>. Labelling specificity was demonstrated by competition experiments with an excess ATP or ADP. N-glycosidase F (PNGase F) treatment, which removes N-linked oligosaccharide chains reduced its molecular mass by about 19 kDa<sup>21, 23</sup>.

### **Bovine aorta ATPDase: isoform II**

The purification procedure of the bovine aorta included the isolation of a particulate fraction by differential and sucrose cushion centrifugations which showed a 33-fold enrichment in ADPase activity<sup>17</sup>. The enzyme was solubilized with Triton X-100, which caused about 60% loss of ADPase and ATPase activity, and then purified by DEAE-agarose, Affi-Gel Blue and Concanavalin A column chromatographies. These latter steps produced a 138-fold enrichment of ADPase activity giving approximately a 4500-fold purification<sup>23</sup>. The enzyme was further purified by PAGE under non-denaturing conditions, followed by its localization in the gel. Three bands of activity were detected with either ATP or ADP as the substrate (Figure 1). The most intense band was excised and separated by SDS-PAGE. Overstaining with silver nitrate revealed a single band, corresponding to a molecular mass of about 78 kDa. In the two other bands detected on the non-denaturing gel, the 78 kDa band was there but there were other protein bands, as seen by SDS-PAGE. The ATP binding site of the 78 kDa polypeptide was

confirmed by FSBA labelling. PNGase F treatment caused a reduction of the apparent molecular mass by about 24 kDa as assessed by SDS-PAGE<sup>23</sup>.

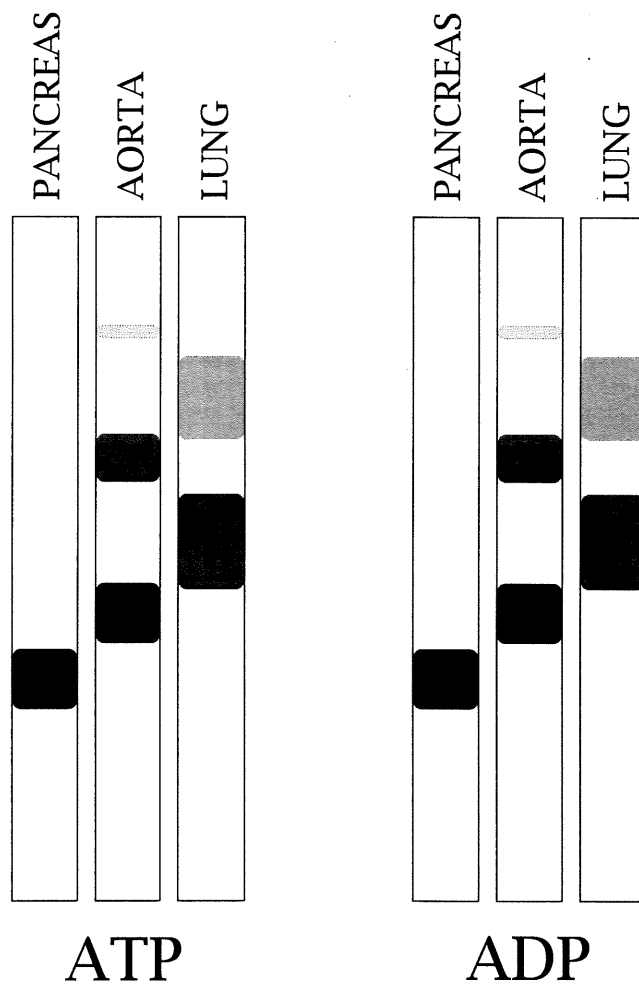


Figure 1. **Schematic representation of the enzymograms of the highly purified fractions of ATPDase from different sources.** Highly purified protein fractions were separated in a 4-7% polyacrylamide gel gradient containing 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium deoxycholate. Enzyme activity was detected by incubating the gel at 37 °C in: 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris/imidazole pH 7.5 and 4 mM ATP, ADP or AMP. Released P<sub>i</sub> forms a Ca<sup>2+</sup> precipitate at the reaction site. No band of activity could be detected with AMP as substrate for any of the ATPDases shown here.

## Bovine lung ATPDase: isoform II or III ?

The purification procedure of the lung ATPDase was essentially the same as the one used for the aorta enzyme, except that the Concanavalin A-agarose column was substituted by a Wheat germ agglutinin-agarose column. Solubilization with triton X-100 caused about 70% loss of activity. In the purification experiments described above, as for the lung, the ATPDase activity remained stable after the detergent solubilization step. The estimated molecular mass of the purified enzyme was 78 kDa. The presence of an ATP binding site was confirmed by FSBA labelling and PNGase F treatment reduced its molecular mass by 24 kDa<sup>24</sup>. Hence bovine aorta isoform II and lung enzyme would have the same molecular mass and the same level of glycosylation. This led us to wonder how the different properties of these two enzymes namely irradiation-inactivation curves and localizations after PAGE under non-denaturing conditions, could be explained. A partial answer may be found in the analysis of the migration patterns after PAGE under non-denaturing conditions. In Figure 1 we have schematically represented the enzymograms of the purified isoforms isolated from pancreas (isoform I), aorta (isoform II) and lung<sup>21, 23, 24</sup>. The latter concord with some enzymograms with less purified enzymes<sup>17, 20</sup>. Pancreas isoform I produced only one band of activity whereas aorta isoform II and lung ATPDase produced three and two bands respectively. In the latter cases the bands were not found at the same level. It is clear from the analysis of the protein composition by SDS-PAGE of the various bands of activity that these different isoforms can exist as homogeneous entities (see previous section). In some cases, where the migration is retarded it coincides with the presence of other proteins. Whether these proteins are associated in some way with the 78 kDa polypeptide and whether the enzymes exist as monomers or multimeric structures are a matters of speculation. Even the lipids attached to the solubilized enzyme could have an influence on the migration pattern. Various structural associations may well bring an explanation for the biochemical differences observed between bovine aorta (II) and lung ATPDases.

## PARTIAL AMINO ACID SEQUENCES OF ATPDASE ISOFORMS I AND II

### An antibody

The N-terminal amino acid sequence obtained for the pancreas ATPDase (isoform I) was used to raise a polyclonal antibody in rabbits. For this purpose a high density multigenic peptide system (MAPS) was synthesised with the following polypeptide (KSDTQETYGALDLGGA) by the "Service de Séquence de Peptides de l'Est du Québec", CHUL Research Center, Québec. This approach uses a small peptidyl core matrix of four lysine residues bearing four branching peptides. One of the immunised rabbits produced a polyclonal antibody "Ringo". This antibody could recognise both isoforms (I and II) of the ATPDase from a variety of pig and bovine tissues<sup>23, 24, 27</sup>.

Attempts to sequence the N-terminal amino acids of bovine aorta ATPDase (isoform II) were unsuccessful. Internal sequences were obtained after CNBr treatment. As shown in Figure 2, the sequences obtained from pig pancreas and bovine aorta ATPDases both showed high similarity with human CD39. This protein has been previously described as a lymphocyte activation antigen. It is present on mature B cells, activated T cells and activated NK cells<sup>26, 28</sup>. Up until now the function of this protein was not known. CD39 is a glycoprotein of about 78 kDa containing a 54 kDa polypeptide core with no detectable O-linked sugars<sup>26</sup>. These characteristics concord perfectly with the data obtained for the bovine aorta and lung ATPDases (table 1). The identification of CD39 as the ATPDase was confirmed by reexpression of its cDNA in COS cells. These experiments also confirmed the ectonucleotidase character of the ATPDase<sup>29</sup> (Kaczmarek *et al.* and Marcus *et al.* this book) as previously shown by Yagi *et al.*<sup>30</sup> and Picher *et al.*<sup>31</sup>.

N-terminal amino acid sequence of pig pancreas ATPDase (I)

**K S D T Q E T Y G A L D L G G A S T Q**  
*CD39 E T N N Q E T F G A L D L G G A S T Q* [202-220]

Five internal sequences of bovine aorta ATPDase (II)

1 **E T P V Y L G A T A G**  
*CD39 E T P V Y L G A T A G* [123-133]

2 **X L L R M E X X E**  
*CD39 R L L R M E S E E* [135-143]

3 **A D K I L A A V A X S I X X Y P F D F Q G A R I**  
*CD39 A D R V L D V V E R S L S N Y P F D F Q G A R I* [145-168]

4 **X V L N X G (S or F)**  
*CD39 K F L N L T S* [368-374]

5 **L X L T N V I P A E X P M**  
*CD39 L N L T N M I P A E Q P L* [456-468]

Figure 2. Partial amino acid sequences of ATPDase isoforms I and II, and human CD39.

## A putative conserved region involved in catalytic activity

Potato apyrase cDNA has recently been cloned<sup>32</sup>. Analysis of this cDNA with other sequences recently deposited in the data bank showed considerable homology with related ATPDases<sup>32, 33</sup>. Handa and Guidotti described four conserved regions shared by the member of this new family of proteins<sup>32</sup>. Three of these conserved regions were found in the first 180 amino acid residues of CD39. The other corresponded to amino acids 213-220 of human CD39. A comparison of the N-terminal amino acid sequence of isoform I ATPDase from pig pancreas showed a high level of identity with an internal sequence of CD39 starting at amino acid # 202 of the 510 of human CD39 amino acid sequence. It now appears that isoform I is a truncated form of CD39 (ATPDase isoform II). In agreement with this proposal, the residual part of CD39 which is 309 amino acid residues corresponds to the molecular mass of the deglycosylated isoform I, which is 35 kDa. This truncated isoform of ATPDase possesses only the fourth conserved region. Thus, this conserved region could represent the putative catalytic site of the ATPDases. The sequence "DLGGASTQ" of the porcine pancreas ATPDase is 100% identical to murine and human CD39. Vasconcelos *et al.*<sup>33</sup> reported the conserved regions between nucleoside triphosphatases which are in agreement with the results of Handa and Guidotti<sup>32</sup>. They found an additional conserved motif at the carboxy terminus corresponding to the amino acid residues 447 to 453 of human CD39. This latter box of homology should also be considered as a potentially important region for the catalytic activity of the enzyme.

## SUMMARY AND CONCLUSION

Our work shows that at least two isoforms of ATPDase are present in mammalian tissues. Isoform I is a truncated form of isoform II. Western blots have indicated that both 78 and 54-56 kDa isoforms coexist in many bovine and pig tissues, isoform II being generally the most abundant one<sup>27</sup>. Christoforidis *et al.* reported an ATPDase of 82 kDa from human placenta<sup>34</sup> whereas Kettlun *et al.* described an

ATPDase from the same organ of about 60 kDa (Kettlun *et al.*, this book). These apparent discrepancies could tentatively be explained by the two isoforms of the enzyme. Sequence analysis showed high similarity between ATPDase I and II, and CD39, supporting the view that CD39 was an ATPDase. Cloning and reexpression of CD39 cDNA in COS cells confirmed it and also demonstrated the extracellular orientation of the catalytic site of the enzyme<sup>29</sup> (Kaczmarek *et al.*, this book).

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Heart and Stroke Foundation of Québec, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and "Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec" (FCAR). J. Sévigny is a recipient of studentships from FCAR and from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

## REFERENCES

1. O. Meyerhof, 1945, The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation, *J. Biol. Chem.* **157**: 105-119.
2. H.M. Kalckar, 1944, Adenylpyrophosphatase and myokinase, *J. Biol. Chem.* **153**: 355-367.
3. A.R. Beaudoin, J. Sévigny, and M. Picher, 1996, ATP-diphosphohydrolases, Apyrases, and Nucleotide Phosphohydrolases: biochemical properties and functions. in *Biomembranes*. Vol. 5 (A.G. Lee, ed.), pp. 369-401, JAI Press Inc., Greenwich.

4. J.J.F. Sarkis, A.M.O. Battastini, E.M. Oliveira, S.S. Frassetto, and R.D. Dias, 1995, ATP diphosphohydrolase: an overview, *Ciência e Cultura (J. Braz. Asso. Adv. Sci.)* **47**: 131-136.
5. A.M. Kettlun, L. Uribe, V. Calvo, S. Silva, J. Rivera, M. Mancilla, M.A. Valenzuela, and A. Traverso-Cori, 1982, Properties of two apyrases from *Solanum Tuberosum*, *Phytochemistry* **21**: 551-558.
6. M. Anich, N. Fanta, M. Mancilla, A.M. Kettlun, M.A. Valenzuela, and A. Traverso-Cori, 1990, Apyrase activity and changes in metabolites during germination and tuberization of *Solanum Tuberosum*, *Phytochemistry* **29**: 1411-1415.
7. J.M.C. Ribeiro, 1987, Role of saliva in blood-feeding by arthropods, *Ann. Rev. Entomol.* **32**: 463-478.
8. E.G. Vasconcelos, P.S. Nascimento, M.N.L. Meirelles, S. Verjovski-Almeida, and S.T. Ferreira, 1993, Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma Mansoni*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 205-214.
9. E. Curdova, V. Jechova, and Z. Hostalek, 1982, Properties of apyrase and inorganic pyrophosphatase in *Streptomyces aureofaciens*, *Folia Microbiol.* **27**: 159-166.
10. L.V. Trilisenko, J. Novotna, V. Erban, V. Behal, and Z. Hostalek, 1987, Subcellular localization of enzymes in *Streptomyces aureofaciens* and its alteration by benzyl thiocyanate. I. Phosphatases and ATP-glucokinase, *Folia Microbiol.* **32**: 402-410.
11. T. Bhargava, S. Datta, V. Ramachandran, R. Ramakrishnan, R.K. Roy, K. Sankaran, and Y.V.B.K. Subrahmanyam, 1995, Virulent *Shigella* codes for a soluble apyrase: Identification, characterization and cloning of the gene, *Curr. Sci. India* **68**: 293-300.



12. D. LeBel, G.G. Poirier, S. Phaneuf, P. St-Jean, J.-F. Laliberté, and A.R. Beaudoin, 1980, Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas, *J. Biol. Chem.* **255**: 1227-1233.
13. J.-F. Laliberté, P. St-Jean, and A.R. Beaudoin, 1982, Kinetic effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  on ATP hydrolysis by the purified ATP-diphosphohydrolase, *J. Biol. Chem.* **257**: 3869-3874.
14. J.-F. Laliberté, and A.R. Beaudoin, 1983, Sequential hydrolysis of the  $\gamma$  and  $\beta$ -phosphate groups of ATP by the ATP diphosphohydrolase from pig pancreas, *Biochim. Biophys. Acta* **742**: 9-15.
15. A.F. Knowles, R.E. Isler, and J.F. Reece, 1983, The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **731**: 88-96.
16. Y. Miura, K. Hirota, Y. Arai, and K. Yagi, 1987, Purification and partial characterization of adenosine diphosphatase activity in bovine aorta microsomes, *Thromb. Res.* **46**: 685-695.
17. Y.P. Côté, M. Picher, P. St-Jean, R. Béliveau, M. Potier, and 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.
18. Y.P. Côté, J.G. Filep, B. Battistini, J. Gauvreau, P. Sirois, and A.R. Beaudoin, 1992, Characterization of ATP-diphosphohydrolase activities in the intima and media of the bovine aorta: evidence for a regulatory role in platelet activation in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* **1139**: 133-142.
19. Y.P. Côté, S. Ouellet, and A.R. Beaudoin, 1992, Kinetic properties of type-II ATP diphosphohydrolase from the tunica media of the bovine aorta, *Biochim. Biophys. Acta* **1160**: 246-250.

20. M. Picher, Y.P. Côté, R. Béliveau, M. Potier, and A.R. Beaudoin, 1993, Demonstration of a novel type of ATP-diphosphohydrolase (E.C.3.6.1.5) in the bovine lung, *J. Biol. Chem.* **268**: 4699-4703.
21. J. Sévigny, Y.P. Côté, and 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.
22. M. Picher, J. Sévigny, P. D'Orléans-Juste, and A.R. Beaudoin, 1996, Hydrolysis of P<sub>2</sub>-purinoceptor agonists by a purified ectonucleotidase from the bovine aorta, the ATP-diphosphohydrolase, *Biochem. Pharmacol.* **51**: 1453-1460.
23. J. Sévigny, F.P. Levesque, G. Grondin, and A.R. Beaudoin, 1997, Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques, *Biochim. Biophys. Acta* **1334**: 73-88.
24. J. Sévigny, M. Picher, G. Grondin, and A.R. Beaudoin, 1997, Purification and immunohistochemical localization of the ATP diphosphohydrolase in bovine lungs, *Am. J. Physiol.* in press.
25. A.R. Beaudoin, J. Sévigny, G. Grondin, S. Daoud, and F.P. Levesque, 1997, Purification, characterization and localization of two ATP diphosphohydrolase isoforms in the bovine heart, *Am. J. Physiol.* in press.
26. G.S. Kansas, G.S. Wood, and T.F. Tedder, 1991, Expression, distribution, and biochemistry of human CD39: Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes, *J. Immunol.* **146**: 2235-2244.
27. J. Sévigny, J. Roy, G. Grondin, and A.R. Beaudoin, 1996, Distribution of ATP diphosphohydrolase in pig tissues, 1<sup>st</sup> Int. Workshop on Ecto-ATPases, Mar del Plata, Argentina. Abstract #17.
28. C.R. Maliszewski, G.J.T. Delespesse, M.A. Schoenborn, R.J. Armitage, W.C. Fanslow, T. Nakajima, E. Baker, G.R. Sutherland, K. Poindexter, C. Birks, A.

- Alpert, D. Friend, S.D. Gimpel, and R.B. Gayle III, 1994, The CD39 lymphoid cell activation antigen: Molecular cloning and structural characterization, *J. Immunol.* **153**: 3574-3583.
29. T.F. Wang, and G. Guidotti, 1996, CD39 is an ecto-(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)-apyrase, *J. Biol. Chem.* **271**: 9898-9901.
30. K. Yagi, M. Shinbo, M. Hashizume, L.S. Shimba, S. Kurimura, and Y. Miura, 1991, ATP diphosphohydrolase is responsible for ecto-ATPase and ecto-ADPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**: 1200-1206.
31. M. Picher, R. Béliveau, M. Potier, D. Savaria, É. Rousseau, and A.R. Beaudoin, 1994, Demonstration of an ectoATP-diphosphohydrolase (E.C. 3.6.1.5.) in non-vascular smooth muscles of the bovine trachea, *Biochim. Biophys. Acta* **1200**: 167-174.
32. M. Handa, and G. Guidotti, 1995, Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**: 916-923.
33. E.G. Vasconcelos, S.T. Ferreira, T.M.U. de Carvalho, W. de Souza, A.M. Kettlun, M. Mancilla, M.A. Valenzuela, and S. Verjovski-Almeida, 1996, Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma Mansoni*: Immunological cross-reactivity with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleotide triphosphatase hydrolase, *J. Biol. Chem.* **271**: 22139-22145.
34. S. Christoforidis, T. Papamarcaki, D. Galaris, R. Kellner, and O. Tsolas, 1995, Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase, *Eur. J. Biochem.* **234**: 66-74.

## CHAPITRE 5

### CLONAGE ET EXPRESSION DE L'ADNC DE CD39/ATPDASE: INHIBITION DE L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE

Après avoir purifié et séquencé différentes isoformes d'ATPDase de mammifères, il devenait alors possible de cloner son gène. Comme nous l'avons constaté au chapitre 4, l'analyse des séquences nous a révélé une forte homologie avec CD39 humaine qui était corroborée par la comparaison des propriétés physiques de ces protéines. Or, nous savions que les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins possédaient une forte activité ATPDasique. Comme nous nous intéressions particulièrement au rôle inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, possiblement attribuable à l'ATPDase, nous étions intéressés à cloner le gène de l'ATPDase exprimé dans les cellules endothéliales. Nous avons d'abord isolé l'ADNc du gène de CD39 de cellules endothéliales humaines, afin de vérifier l'hypothèse que CD39 était une ATPDase. Les résultats sont concluants: CD39 est une ATPDase. En effet, la protéine produite par l'expression de l'ADNc du gène de CD39 humaine, après transfection transitoire dans les cellules COS, possédait les propriétés biochimiques des ATPDases, et était reconnue par un anticorps anti-ATPDase. L'expression de ce gène dans les cellules COS a aussi montré que le site actif de la protéine produite était dirigé du côté extracellulaire à la cellule. Le fait que l'ATPDase/CD39 hydrolyse les nucléotides extracellulaires est en accord avec un rôle de contrôle de l'agrégation plaquettaire, que nous avons d'ailleurs montré *in vitro*. Effectivement, la protéine produite dans les cellules COS était capable d'inhiber l'agrégation des plaquettes induite par divers agonistes physiologiques.

Ces résultats ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du docteur S.C. Robson à Boston et ont fait l'objet d'une publication parue en 1996 dans *Journal of Biological Chemistry*, volume 271, pages 33116-33122. Notre laboratoire a contribué à l'article de la façon suivante: (1) Nous avons effectué les études d'homologies avec les séquences partielles de diverses ATPDases, ainsi que d'autres

ATPases et protéines reliées à cette famille d'enzymes. (2) Nous avons identifié une séquence de huit acides aminés correspondant possiblement au site actif de l'enzyme. Ces analyses ont par la suite été vérifiées par le docteur E. Kaczmarek. (3) Nous avons effectué les expériences d'immunoprécipitation et avons développé le protocole de préparation des fractions particulières. (4) Plusieurs clones d'ADNc de CD39 furent obtenus par RT-PCR et analysés, dont trois par monsieur J. Sévigny, alors en stage à Boston.

# **Identification and Characterization of CD39/Vascular ATP Diphosphohydrolase**

Elzbieta Kaczmarek, Katarzyna Koziak, Jean Sévigny\*, Jonathan B. Siegel,  
Josef Anrather, Adrien R. Beaudoin\*, Fritz H. Bach, and Simon C. Robson

Sandoz Center for Immunobiology  
New England Deaconess Hospital  
Harvard Medical School  
99 Brookline Avenue, Boston, MA 02215

\* Département de biologie, Faculté des sciences,  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Québec, CANADA, J1K 2R1

## SUMMARY

Vascular ATP diphosphohydrolase (ATPDase) is a plasma membrane-bound enzyme that hydrolyses extracellular ATP and ADP to AMP. Analysis of amino acid sequences available from various mammalian and avian ATPDases revealed their close homology with CD39, a putative B cell activation marker. We therefore isolated CD39 cDNA from human endothelial cells and expressed this in COS-7 cells. CD39 was found to have both immunological identity to, and functional characteristics of the vascular ATPDase. We also demonstrated that ATPDase could inhibit platelet aggregation in response to ADP, collagen and thrombin, and that this activity in transfected COS-7 cells was lost following exposure to oxidative stress. ATPDase mRNA was present in human placenta, lung, skeletal muscle, kidney and heart and was not detected in brain. Multiple RNA bands were detected with the CD39 cDNA probe that most probably represent different splicing products. Finally, we identified an unique conserved motif, DLGGASTQ, that could be crucial for nucleotide binding, activity and/or structure of ATPDase. Because ATPDase activity is lost with endothelial cell activation, over-expression of the functional enzyme, or a truncated mutant thereof, may prevent platelet activation associated with vascular inflammation.

## INTRODUCTION

The quiescent vascular endothelium maintains blood fluidity by inhibiting blood clotting, by the regulation of platelet activation and adhesion, and by promoting fibrinolysis. In large part, the antithrombotic effects are mediated by surface molecules present on resting endothelial cells, such as thrombomodulin and heparan sulfate (1). Endothelial cells also have the potential to regulate platelet activation by the synthesis of prostacyclin and nitric oxide and by the surface expression of ATP diphosphohydrolase (ATPDase). This ectoenzyme (EC 3.6.1.5) has been also described as apyrase, ecto-ATPase, ecto-ADPase, nucleotide phosphohydrolase or ATP pyrophosphohydrolase (2). ATPDases are generally

low abundance proteins which have been difficult to purify, given their sensitivity to detergents and the propensity to co-isolate with other proteins. High levels of ATPDase activity are associated with the vasculature (endothelium, smooth muscle, cardiac cells), lymphocytes, and platelets (2).

Extracellular tri- and diphosphate nucleosides appear in tissue fluids and plasma as a consequence of lysis of blood cells and tissues, and through secretion from platelet dense granules (3). Vascular ATPDase expressed by quiescent endothelial cells, hydrolyzes extracellular ATP and ADP to AMP, which is further converted to adenosine by 5'-nucleotidase (3, 4). In addition, ADP, which interacts with purinergic P<sub>2T</sub> receptors is a powerful agonist for platelet recruitment, adhesion and aggregation while adenosine is an antagonist of these processes (5-7). Thus, the function of ATPDase is critical for the inhibition of platelet aggregation following the hydrolysis of ADP to AMP with the ultimate generation of adenosine (4). However, we have recently provided evidence for the loss of ATPDase activity following endothelial cell activation, such as would occur in vascular inflammatory states or xenograft rejection, where platelet deposition is a consistent component (8, 9). Such changes in the level of expression and activity of the ATPDase may therefore be of pathogenetic significance and prompted our attempts to identify and study this vascular ectoenzyme.

The biochemical characterization of ATPDase purified from various tissues and organisms has generally revealed a highly glycosylated protein of molecular mass 60–100 kDa. This ectoenzyme is Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> dependent, is not sensitive to known inhibitors of the various other ATPases, and hydrolyzes nucleoside tri- and diphosphates but not monophosphates. These enzymatic characteristics have facilitated classification of these proteins into a subgrouping termed E-type ATPases (2).

Recently, ATPDase from human placenta, porcine pancreas, bovine aorta, and chicken gizzard have been purified and partially sequenced (10-13). Our analysis



of these sequence data has shown significant homology to human CD39 (Figure 1) (14). CD39 is known to be an acidic glycoprotein with molecular mass 78 kDa, that contains two potential transmembrane regions and six potential glycosylation sites. Interestingly, CD39 was originally described as a B cell activation marker and has been shown to be expressed on the surface of other activated lymphocytes and quiescent vascular endothelium (14). Additionally, CD39 is considered to participate in the enhancement of cell-cell interactions; monoclonal antibodies (mAb) to certain epitopes of CD39 induce homotypic adhesion, probably through involvement of LFA-1 (CD11a/CD18) (15). Recently, potato apyrase (a plant ATPDase) has been also purified and was independently found to have sequence homology to certain newly identified nucleotide triphosphatases and to murine and human CD39 (16). Subsequent work by Wang and Guidotti has confirmed that B cell CD39 had ecto-apyrase activity (17). As the functional significance of these observations remains unclear, we have further evaluated the role of CD39/ATPDase in modulating platelet reactivity and examined the distribution and nature of CD39 mRNA expression in human tissues.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Purification and sequencing of mammalian ATPDase**

Porcine pancreas and bovine aorta ATPDases were purified according to the previously described methods (11, 12). Purified proteins were then sequenced at the Biotechnology Research Institute of Montréal. The sequence of N-terminus of the porcine pancreatic ATPDase and 5 internal sequences from the bovine aortic ATPDase following CNBr cleavage were obtained and were available for our study.

## RT-PCR

To amplify a cDNA fragment directly from mRNA, 0.1  $\mu$ g of total RNA was prepared from human umbilical endothelial cells (18), annealed with oligo-(dT)16 primer and the first strand cDNA synthesis was carried out with Superscript Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL, Grand Island, NY). The product of this reaction served as a template for PCR amplification. The following primers were designed based on the CD39 cDNA sequence (14) (GenBank accession No. S73813):

forward primer: 5' - GAAAGGATCCGAAAACAAAAGCTGCTACT - 3';  
reverse primer: 5' - AGAATCTAGACAGTAAAAGCCAAGGAAGC - 3'.

The DNA fragment of interest was amplified by PCR with the "hot start" technique, according to the Perkin-Elmer protocol. Amplification was carried out for 36 cycles (1 min at 94°C, 2 min at 57°C, and 3 min at 72°C) followed by 10 min at 72°C. The amplified PCR product was examined on 1% Agarose gel. Restriction enzyme digestion and sequencing confirmed that the obtained cDNA fragment was CD39. The PCR product was subcloned into the pCRII vector (TA cloning kit, Invitrogen, San Diego, CA); subsequently plasmid was multiplied in "One Shot" bacteria (Invitrogen, San Diego, CA), purified and digested with *Not* I and *Spe* I. The insert was purified on glass beads (Bio101, Vista, CA) and then cloned into a mammalian expression vector pCDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) previously digested with *Not* I and *Xba* I. Plasmid DNA was purified with a Qiagen kit (Qiagen, Chatsworth, CA) and checked for the correct orientation of the insert by restriction mapping; this was then followed by confirmation of the correct sequence (Applied Biosystem, model 373A). All restriction enzymes were from New England Biolabs (Beverly, MA).

## **Transient transfection**

COS-7 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Cells were seeded at  $5 \times 10^5$  cells per 30 mm well and transfected 20-24 hrs later with Lipofectamine (Life Technologies, Grand Island, NY) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were exposed to 1  $\mu$ g of DNA (pCDNA3 or pCDNA3-CD39) and 4  $\mu$ l of Lipofectamine in DMEM without FCS for 5 hrs, followed by addition of equal volume of DMEM containing 20% FCS. Twenty four hrs after transfection, the culture medium was changed (DMEM/10% FCS) and ~70 hrs post-transfection, COS-7 cells were used for analyses. Control COS-7 cells used for transfection were negative for CD39 as analyzed by Western blotting and FACS with anti-CD39 mAb, and ATPDase biochemical activity was negligible.

## **Immunocytochemistry**

COS-7 cells were fixed with 0.05% glutaraldehyde for 15 min. The presence of CD39 antigen was revealed by anti-human CD39 mAb (Accurate, Westbury, NY) using biotinylated goat anti-mouse IgG and streptavidine-horseradish peroxidase (HRP) (Pierce, Rockford, IL) as a detection system. Three-amino-9-ethyl-carbazole (Sigma, St. Louis, MO) was used as the HRP substrate.

## **Cytofluorometric analysis of the expression of CD39**

COS-7 cells after transient transfection were harvested by gentle pipetting with Hanks balanced salt solution (GIBCO-BRL) containing 10 mM EDTA. They were washed with buffer (PBS, 5% FCS, 0.02% sodium azide) and incubated with either anti-human CD39 mAb, BU61 (IgG1) (Accurate, Westbury, NY) or an isotype matched control mAb, anti-CD25/ACT-1 (IgG1) (Dako, Carpinteria, CA)

for 30 min on ice. Cells were washed twice and incubated with anti-mouse IgG conjugated with fluorescein-5-isothiocyanate (Sigma, St. Louis, MO) for 30 min on ice. Finally cells were washed twice and analyzed by flow cytometry on a FACScan bench top model using Cellquest II software (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data were collected from viable cells only, as determined by propidium iodide uptake.

### **Cell lysate and cell membrane preparation**

Cells were washed 3 times with Tris-saline buffer, pH 8.0 at 4°C, harvested by scraping in 20 mM Tris, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, containing Aprotinin (0.02 KIU/ml) and centrifuged 800xg for 15 min at 4°C. Cells were resuspended in the harvesting buffer, then disrupted in Potter homogenizer and centrifuged 800xg for 15 min at 4°C. Supernatants containing cell lysates were used for Western blot analysis. Cell membranes were used for ATPDase activity and platelet aggregation assays. These were prepared by ultracentrifugation of cell lysates 47,000 rpm for 1 hr at 4°C followed by second centrifugation (57,000 rpm for 50 min at 4°C) of the resuspended pellet. Membranes were resuspended in 7.5% glycerol in 5 mM Tris-HCl, pH 8.0. Protein was measured according to the Bradford method (19).

### **Western blotting**

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli (20). Proteins (20 µg per lane) were separated on a 10% gel under denaturing conditions, transferred to PVDF membrane (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA) by semi-dry electroblotting and probed with either a rabbit polyclonal antibody to porcine pancreas ATPDase or monoclonal antibody to CD39 (Accurate, Westbury, NY). Bands were visualized using HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (Pierce, Rockford, IL) and the Enhanced

ChemiLuminescence assay (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL) according to the manufacturer's instructions.

### **Polyclonal antibody to ATPDase**

Polyclonal antibody to ATPDase was generated to a peptide sequence corresponding to the N-terminus of the purified protein from porcine pancreas (KSDTQETYGALDLGGA) (11). This antibody cross-reacted with ATPDase from bovine aorta, lung and trachea, as determined by Western blotting.

### **ATPDase activity measured by hydrolysis of ATP and ADP**

COS-7 cell lysates were incubated with either 200  $\mu$ M ADP or 200  $\mu$ M ATP, and  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  dependent release of free phosphate was determined. Malachite green was added to stop the reaction and absorbance was measured at 610 nm to determine levels of phosphate generation against the standard curve of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (21).

### **ATPDase activity measured by hydrolysis of $^{14}\text{C}$ -ADP to AMP**

Monolayers of transiently transfected COS-7 cells, and appropriate control cells were analyzed for ability to hydrolyze extracellular  $^{14}\text{C}$ -ADP (50  $\mu$ Ci per reaction, New England Nuclear, Boston, MA) carried out on thin layer chromatography plates, (Whatman Laboratory Division, Clifton, NJ). The solvent system comprised of isobutyl alcohol/1-pentanol/ethylene glycol monoethyl ether/ $\text{NH}_4\text{OH}$ / water at ratios 90:60:180:90:120. The separated compounds were scanned for radioactivity with a Phosphor-Imager (Molecular Dynamics, Sun-

nyvale, CA) and degradation of the  $^{14}\text{C}$ -ADP was determined by ImageQuant software according to manufacturer's instructions.

### **Platelet aggregation assays**

Blood was taken after informed consent from apparently healthy human volunteers and anticoagulated with 0.1 vol. 3.2% sodium citrate. Platelet rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation of whole blood at 280xg for 15 min at 22°C. The platelet aggregation assay utilized a 2-sample, 4-channel Whole Blood Lumi-Aggregometer, model 560 (Chronolog Corporation, Havertown, PA). Platelet rich plasma was preincubated with COS-7 cell membrane or cell lysate preparations for 10 minutes at 37°C in a siliconized glass cuvette containing a stirring bar, followed by stimulation with either ADP (5  $\mu\text{M}$ ), collagen (5  $\mu\text{g/ml}$ ) or thrombin (0.1 U/ml) (Chronolog Corporation, Havertown, PA). Platelet aggregation was recorded for at least 10 min. Data were expressed as the percentage of light transmission with platelet poor plasma equal to 100%.

### **Effect of reactive oxygen intermediates on ATPDase activity**

COS-7 cells (control, transfected with pCDNA3 and with pCDNA3-CD39) were exposed for 2 h to either  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ; Sigma, St Louis, MO) or xanthine oxidase (100 mU/mL; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) and xanthine (200  $\mu\text{M}$ ; Sigma, St Louis, MO) to directly generate the oxidative stress observed to abrogate endothelial cell ATPDase function (8; Robson *et al.* manuscript submitted). These experiments were performed in order to determine the direct effect of reactive oxygen intermediates upon enzymatic function and immunoreactivity of the recombinant CD39/ATPDase. Cells were harvested, and the lysates and membrane preparations were then used for biochemical analysis, to determine their effect on stimulated platelet aggregation and were subjected to Western blotting.

## Northern analysis

For tissue mRNA analysis, a Multiple Tissue Northern Blot, a charge-modified nylon membrane to which poly(A)<sup>+</sup> RNA (2 µg per lane) from multiple human tissues had been transferred, was used (Clontech Laboratories; San Diego, CA). For the probe, our pCDNA3-CD39 construct was digested with *Bam* H I and *Xba* I and CD39 cDNA fragment (1714 bp) was purified with the Gene-Clean kit (Bio 101, Vista, CA) and labelled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP using Ready-To-Go labelling kit (Pharmacia, Piscataway, NJ). Prehybridization, hybridization, washes and stripping of the membrane were carried out with the rapid hybridization protocol from Stratagene (La Jolla, CA). Final washes were at 60°C in 0.2-x sodium saline citrate/0.1% SDS. The blots were exposed to Kodak Biomax Mr film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) with intensifying screens at -80°C for 1 day.

## RESULTS

### ATPDase sequence analysis

We purified ATPDase from pig pancreas and bovine aorta according to the method described earlier and sequenced these proteins (11,12). The obtained sequences originated from the N-terminus of the pig pancreas ATPDase and 5 internal fragments of bovine aorta ATPDase and all showed remarkable homology to human CD39 (Figure 1). Figure 1 also presents previously published partial amino acid sequences of ATPDases purified from human placenta (10) and chicken gizzard (13) which confirm previously unrecognized homology with CD39. The molecular mass of both CD39 and vascular ATPDase is 78 kDa and becomes 54 kDa after removal of Asp-linked oligosaccharides by N-glycosidase (12, 15); these data suggest that CD39 and ATPDase may represent the same protein.

**Figure 1. Primary sequence of CD39 (GenBank access No. S73813).** The published sequence of CD39 is aligned with 4 putative ATPDases purified from human placenta, porcine pancreas, bovine aorta, and chicken gizzard. The shaded areas indicate exact matches; putative "apyrase conserved regions" are underlined (17); the black outlined box represents a putative ATP binding domain (31).



Human CD39:	1	MEDTKESNVK	TFCSKNILAI	LGFSIIAVI	ALLAVGLTON	KALPENVKYG
Human placental:						
Porcine pancreas:						
Bovine aorta:						
Chicken gizzard:				ARRAAAVL	LLLLA	
Human CD39:	51	<u>IVLDAGSSHT</u>	SLYIYKWPAE	KENDTGVVHQ	VEECRVKPGG	ISKFVQKVNE
Human placental:						
Porcine pancreas:						
Bovine aorta:						NVNE
Chicken gizzard:						
Human CD39:	101	IGIYLTCME	RAREVIPRSQ	<u>HOETPVYLGA</u>	<u>TAGMRLLRME</u>	SEELADRVLD
Human placental:						
Porcine pancreas:						
Bovine aorta:		CGF		EXPVYLGA	TAG XLLRME	XXE ADKILA
Chicken gizzard:						
Human CD39:	151	VVERSLSNYP	<u>FDFQGARIIT</u>	<u>GOEEGAYGWI</u>	<u>TINYLLGKFS</u>	QKTRWFSIVP
Human placental:			KFQGA		LLGKF	
Porcine pancreas:						
Bovine aorta:		AVASSIXXP	<u>FDFQGARI</u>			
Chicken gizzard:			KILS	GEEGVFGXI	TANYLLGNK	
Human CD39:	201	YETNNQETFG	<u>ALDLGGASTQ</u>	<u>VTEVPQNQTI</u>	ESPDNALQFR	LYGKDYNVYT
Human placental:			G	<u>ALDLGGASTQ</u>	VTE	R
Porcine pancreas:		KSDTQETYG	<u>ALDLGGASTQ</u>			
Bovine aorta:						
Chicken gizzard:						
Human CD39:	251	HSFLCYGKDQ	ALWQKLAKDI	QVASNEILRD	PCFHPGYKKV	VNVSDLYKTP
Human placental:					KKV	VXVSDLY
Porcine pancreas:						
Bovine aorta:						
Chicken gizzard:						
Human CD39:	401	YAGVKEKYL	EYCFSGTYIL	SLLLQGYHFT	ADSWEHIFFI	GKIQGS DAGW
Human placental:						
Porcine pancreas:						
Bovine aorta:						
Chicken gizzard:						
Human CD39:	451	TLGYMLNLTN	MIPAEQPLST	PLSHSTYVFL	MVLFSLVLF	VAIIGLLIFH
Human placental:						
Porcine pancreas:						
Bovine aorta:		LXLTN	VIPAEXPM			
Chicken gizzard:						

## **Isolation of CD39 cDNA and its expression in a mammalian system**

To test the hypothesis that CD39 has ATPDase activity, we isolated CD39 cDNA by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using RNA prepared from human umbilical endothelial cells as a template for the first cDNA strand. Primers homologous to CD39 generated PCR product of the expected size viz. 1714 bp. The PCR product was subjected to restriction mapping and then sequenced (data not shown). This confirmed the identity of the PCR fragment with the published sequence of human CD39 (14). The PCR fragment was subcloned into the pCRII vector, excised with *Not* I and *Spe* I, and subsequently cloned into a mammalian expression vector, pCDNA3. COS-7 cells were then transiently transfected with pCDNA3-CD39 and used for further analyses. In each experiment we used nontransfected COS-7 cells and cells transfected with pCDNA3 alone as the controls.

The expression of CD39 on the surface of COS-7 cells was confirmed by flow cytometry and immunocytochemistry. Cells used for flow cytometry analysis were incubated with either mAb to CD39 or mouse anti-human IgG of the same isotype. Cytofluorometric analysis confirmed the presence of CD39 on the surface of transfected COS-7 cells (Figure 2). Immunocytostaining confirmed that only cell populations transfected with pCDNA3-CD39, and not the control cells, were stained by the mAb to human CD39 (data not shown).

## **Immunological identity between CD39 and ATPDase**

To evaluate the identity of CD39 with ATPDase, cell lysates from control and transfected COS-7 cells were analyzed by Western blotting (Figure 3). Both the mAb to CD39 and a polyclonal antibody to ATPDase recognized a band of the same mobility, with the molecular mass ~80 kDa (Figure 3A and B, respectively), a finding strongly supporting our hypothesis of identity between CD39 and

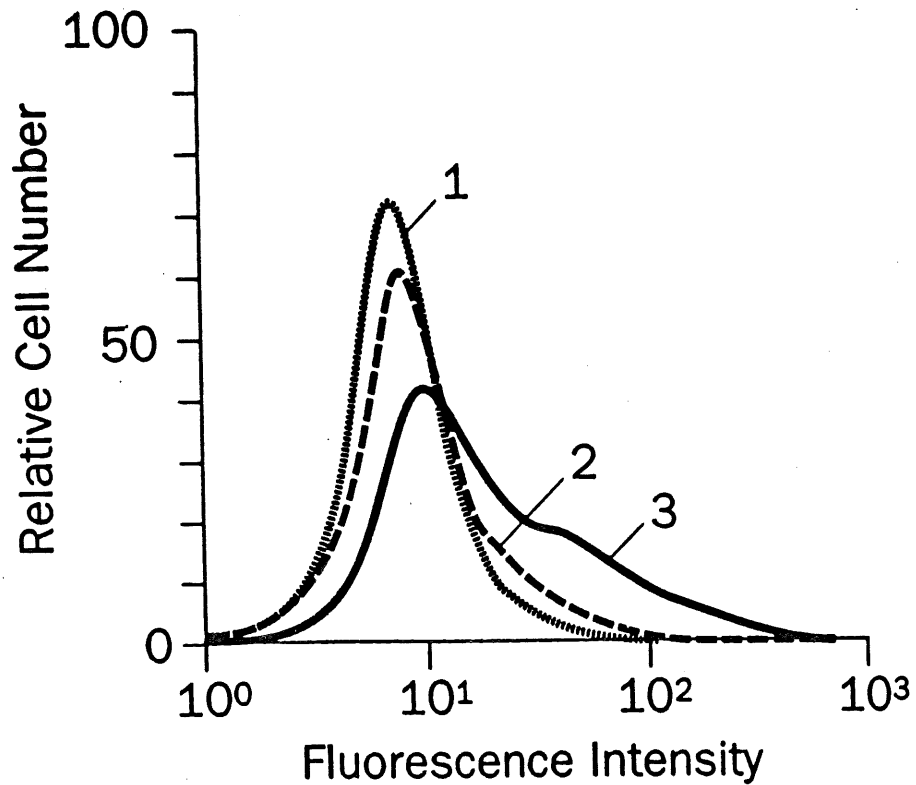


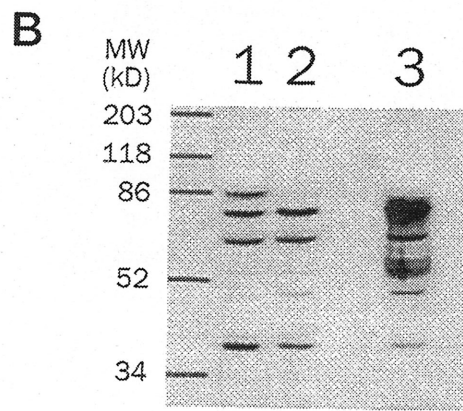
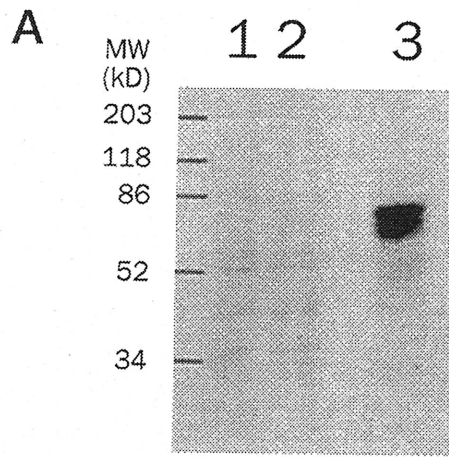
Figure 2. **Cytofluorometric analysis of the expression of CD39.** COS-7 cells after transient transfection were incubated with either anti-human CD39 mAb, BU61 (IgG<sub>1</sub>) or an isotype matched control mAb, anti-CD25/ACT-1 (IgG<sub>1</sub>) and anti-mouse IgG conjugated with fluorescein-5-isothiocyanate.

- 1 - Control, nontransfected cells treated with anti-CD39;
- 2 - pCDNA3-CD39 transfected cells incubated with isotype control antibody;
- 3 - pCDNA3-CD39 transfected cells stained with anti-CD39 mAb.

**Figure 3. Immunological confirmation of CD39/ATPDase expression by Western blotting.** Western blotting of COS-7 cell lysates was performed with: **(A)** Monoclonal antibody to human CD39; **(B)** Polyclonal antibody to porcine pancreas ATPDase N-terminus cross-reactive with vascular ATPDases. The COS-7 cells are represented as follows:

- 1 - Untreated control COS-7 cells;
- 2 - COS-7 cells transiently transfected with pCDNA3;
- 3 - COS-7 cells transiently transfected with pCDNA3-CD39.

The polyclonal antibody to ATPDase cross-reacts nonspecifically with some proteins present in COS-7 cells but specifically with a possible truncated form of the ATPDase (see text).



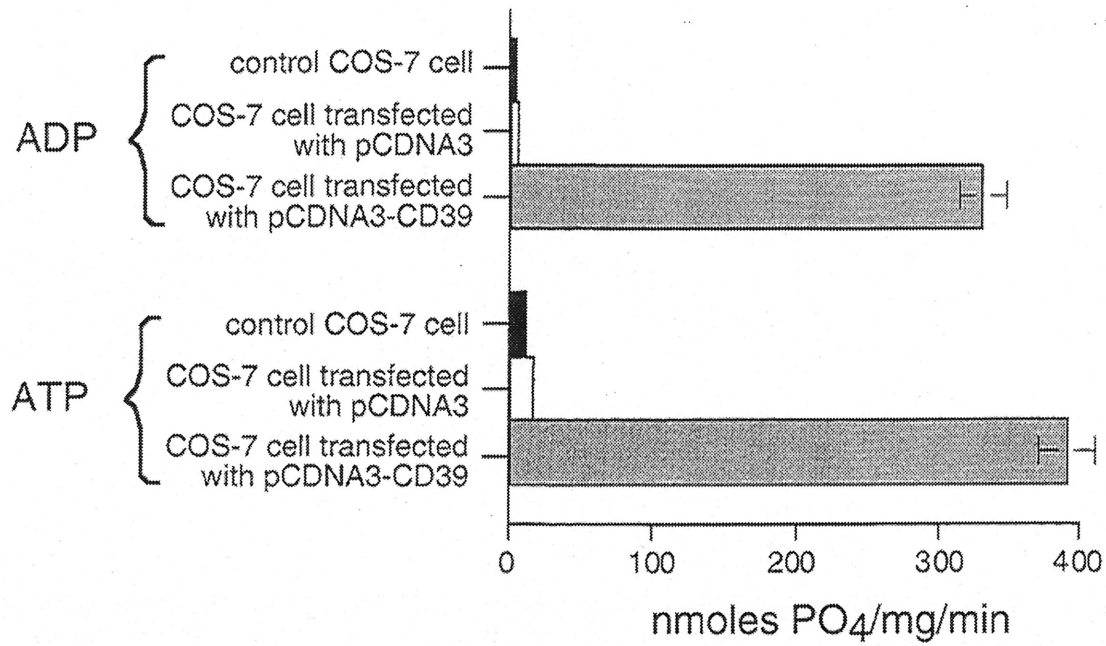
ATPDase. In addition, the polyclonal antibody recognized a second band around 54 kDa which could represent a truncated form of the ATPDase non-reactive with the monoclonal antibody to CD39. Consistently, specific CD39 and ATPDase immunoreactivity was detected only in pCDNA3-CD39 transfected cell populations.

### **ATPDase activity of CD39**

On the basis of apparent molecular and antigenic similarities between CD39 and ATPDase, we next evaluated selected biochemical functional characteristics of CD39. We incubated COS-7 cell membrane preparations with exogenous ADP or ATP and determined ATPDase activity by measuring divalent cation dependent phosphate release by standard biochemical techniques. The control COS-7 cells essentially did not hydrolyze ADP or ATP, while pCDNA3-CD39 transfected cells exhibited very high levels of ATPDase activity for both substrates (Figure 4). The ATPDase expressed by CD39 transfected cells did not act on exogenous AMP. In addition, ADP hydrolysis was totally inhibited by 5 mM EDTA, reduced by 60% with 20 mM sodium azide and unaffected by 3 mM ouabain. These inhibitory data are largely consistent with the classification of the vascular ATPDase as an E-type ATPase (2).

We also investigated the activity of expressed enzyme by studying of the capacity of intact transfected COS-7 cells to hydrolyze radiolabelled ADP, assayed by thin layer chromatography. In a representative experiment, transiently transfected cells converted 68% of the 50  $\mu$ Ci of  $^{14}$ C-ADP to  $^{14}$ C-AMP over 20 minutes, as compared to 11% and 9% for cells transfected with the pCDNA3 only and nontransfected COS-7 cells, respectively, under the identical experimental conditions.

Figure 4. **Specific ATPDase biochemical activity of CD39.** The biochemical activity of CD39/ATPDase expressed in COS-7 cell membranes was determined by free phosphate release (nmoles P<sub>i</sub>/mg/min) following the hydrolysis of ADP and ATP and compared to control COS-7 cells and those that had undergone transfection with the vector alone in a representative experiment (data expressed as mean ± SD). (see Methods for further details).





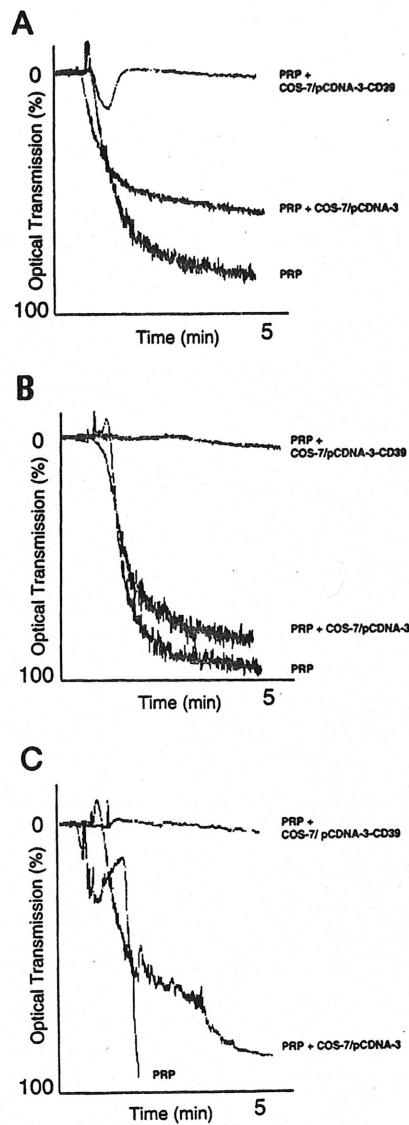
Additionally, protein from crude preparations of human umbilical cord vein immunoprecipitated with anti-CD39 also had all the required characteristics of E-type ATPase. These included specific substrate specificity for ATP and ADP,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  dependence, insensitivity to 5 mM tetrazole, an inhibitor of alkaline phosphatase, and inhibition by 20 mM sodium azide by 57% and 47% for ADP and ATP as substrates, respectively.

### **Effect of CD39/ATPDase on platelet aggregation**

Because our interest in the vascular ATPDase has concerned the regulation of platelet activation by adenosine nucleotides in the setting of vascular inflammatory disorders, we next investigated the effect of COS-7 cell transfected with pCDNA3-CD39 on platelet aggregation *in vitro*. Membrane preparations from cells expressing CD39 consistently inhibited platelet aggregation in response to exogenous ADP, whereas membranes from the control cells transfected with pCDNA3 only, had no significant effect (Figure 5A). Comparable specific inhibitory effects were observed when platelets were stimulated by collagen (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or by low levels of thrombin (0.1 U/ml) in the presence of the transfected COS-7 membranes. Thus platelet aggregation in response to agonists other than ADP was inhibited only by COS-7 cells expressing CD39 (Figure 5B and C). These latter observations also confirm the established dependence of platelet aggregation following collagen and thrombin stimulation upon platelet released ADP *in vitro*.

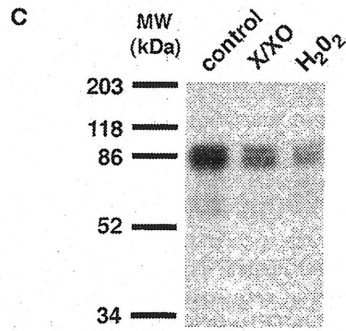
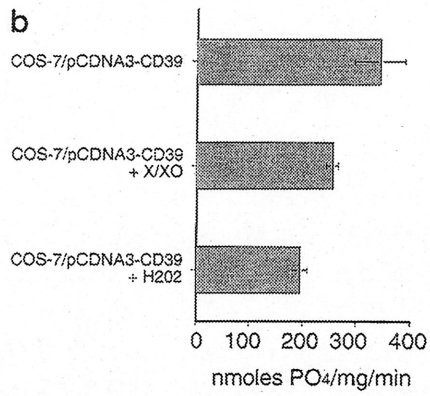
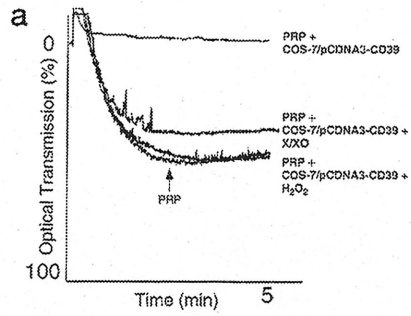
### **Effect of oxidative stress on ATPDases activity**

To generate oxidative stress and to evaluate the effect of reactive oxygen intermediates upon the ATPDase function of CD39, COS-7 cells transfected with pCDNA3-CD39 were exposed for 2 h to either  $\text{H}_2\text{O}_2$  or xanthine oxidase and xanthine. Cells were harvested, and cell lysates used for analysis of their effect on platelet aggregation (Figure 6A). A striking effect of oxidation was observed



**Figure 5. Anti-platelet aggregatory function of CD39.** The activity of newly-expressed CD39/ATPDase was determined by analysis of the effect of CD39 transfected and control COS-7 cell membrane preparations (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on platelet aggregation *in vitro*. Platelets were activated with (A) 5  $\mu\text{M}$  ADP, (B) 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  collagen, (C) and 0.1 U/ml thrombin. Control non-transfected COS-7 cell membrane preparations had no effect on aggregation (data not shown).

**Figure 6. Effect of oxidants on the expressed CD39/ATPDase.** COS-7 cells transfected with pCDNA3-CD39 and the appropriate controls were treated for 2 h with either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) or xanthine oxidase (100 mU/mL) and xanthine (200 μM). **(A)** COS-7 cell lysates were then analyzed for their inhibitory effects on platelet aggregation following stimulation with 2.5 μM ADP. Xanthine and xanthine oxidase (X/XO) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre-treatment abrogated the inhibitory effects of CD39 on platelet aggregation. **(B)** ATPDase biochemical activity was also inhibited following exposure to these oxidative reactions in this representative experiment (data expressed as mean ± SD). **(C)** Immunoreactivity of the CD39 transfected COS-7 cell lysates to anti-CD39 was reduced in keeping with loss of ATPDase activities following exposure to X/XO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



for the interaction of transfected cells with platelets. After incubation with the xanthine oxidase/xanthine combinations, pCDNA3-CD39-transfected cells almost completely lost their ability to inhibit platelet aggregation whereas the prior incubations with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> completely abolished antiaggregatory effect of ATPDase expressed by the transfected COS-7 cells. These results were concordant with the observed loss of ATPDase biochemical activity following oxidative interaction (Figure 6B) and the reduced immunoreactivity with anti-CD39 monoclonal antibodies (Figure 6C).

### **Determination of a potentially important motif in CD39/ATPDase**

Once we had determined identity between CD39 and the ATPDases, the subsequent analysis of available amino acid sequences of the ATPDases purified from different mammalian sources led us to the conclusion that there was only one shared sequence that was common to human placental and the porcine pancreatic ATPDase and also present within human CD39 viz. DLGGASTQ contained within the N-terminal sequence of the porcine pancreatic ATPDase (Figure 1).

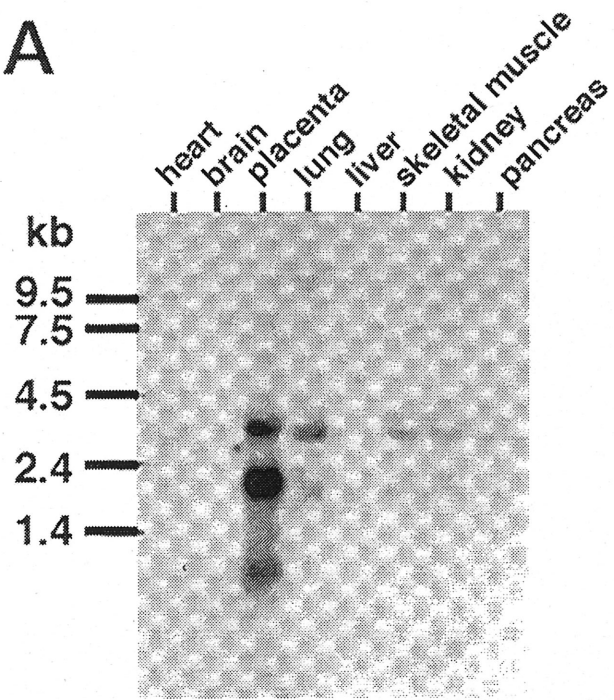
This sequence was also identified as the putative apyrase conserved region (ACR) 4 by Handa and Guidotti (16). However, there are some modifications of this sequence for other ATPDases, so this motif may also be presented as (D/E)(L/M/V)GG(A/G)S(T/A/V)Q.

### **Northern analysis**

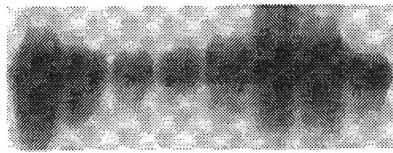
To determine tissue specific CD39/ATPDase mRNA distribution, we analyzed RNA purified from various human tissues by hybridization with the CD39 cDNA (1714 bp fragment). We found high levels of CD39 mRNA in human placenta, lung, skeletal muscle, kidney and heart but no detectable signal in brain and very

**Figure 7. Tissue specific expression of CD39 mRNA.** Identification of mRNA for CD39 in human tissues was undertaken by Northern analysis. Poly(A)<sup>+</sup> RNA (2 µg/ml) from various human tissues was hybridized with **(A)** CD39 cDNA and **(B)** GAPDH as an internal control (see Materials and methods for additional details).

**A**



**B**



little in liver (Figure 7). We were able to detect as many as five different mobility mRNA transcripts reacting with the same probe, from two up to four of them in the individual tissues. To confirm that these bands were specific for CD39 we hybridized the same blot with 5' and 3' fragments of CD39 cDNA, 427 and 342 bp, respectively. The resulting patterns of hybridization were identical with that one with full-length probe (data not shown).

## DISCUSSION

Our data demonstrate in a persuasive manner that CD39 encodes the vascular ATPDase. This conclusion was originally based on the discovery of sequence homologies between CD39 and human placental ATPDase and bovine aortic ATPDase (Figure 1). Our hypothesis was further substantiated by other recognized sequence homologies that we noted in mammalian and avian non-vascular ectoenzymes and the report that the potato soluble apyrase contains certain "apyrase conserved regions" also found in garden pea nucleoside triphosphatase (NTPase), *S. cerevisiae* golgi guanosine diphosphatase (GDPase), *T. gondii* isoforms of an NTPase, NTP1 and NTP3, a yeast hypothetical 71.9 kDa protein, a *C. elegans* 61.3 kDa protein, and human and murine CD39 (16). The following observations also strengthen our conclusion. Both ATPDases and CD39 are known to be membrane glycoproteins with the same molecular weight range. Both proteins have a comparable cellular distribution, are postulated to be involved in cell adhesion, and may undergo up-regulation after viral transformation of certain cells (2,14,15,22).

We were able to generate CD39 cDNA from human umbilical endothelial cell RNA by RT-PCR. This PCR product which was of expected size and was then subjected to restriction mapping and sequencing, which confirmed that this product represented true CD39 cDNA (data not shown). The CD39 cDNA was then cloned into the pCDNA3 vector and expressed in COS-7 cells. Using cell membranes or whole cell lysates, we established that CD39 protein expressed by



these transiently transfected cells reacted with both monoclonal antibodies to CD39 and to polyclonal antibodies directed at ATPDase. By FACS analysis using mAb to CD39 we clearly demonstrated that ATPDase was expressed at the surface of COS-7 cells (Figure 2). Both polyclonal antibody generated by us to the porcine ATPDase N-terminal peptide fragment and cross-reactive with the bovine vascular ATPDase and monoclonal antibody to CD39 detected the appropriate and same mobility band on Western blotting (Figure 3).

Our functional data show for the first time that the ATPDase activity associated with CD39 expressed by COS-7 cells can hydrolyze the substrate ADP. This specific ADPase enzyme activity can be induced over one hundred fold by the COS-7 transfection with CD39. Likewise, we were able to show enzymatic activity of CD39 for the substrate ATP to be induced over thirty fold by COS-7 transfection (394 nmoles/mg protein/min in representative experiments). We also have demonstrated that intact transfected COS-7 cells were able to hydrolyze radiolabelled ADP. This latter result obtained by thin layer chromatography clearly indicated that the active site of ATPDase faces the extracellular milieu. Wang and Guidotti have also established that EBV transformed B cells express both CD39 and potentially  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  apyrase activity (17). They were able to show by the DEAE-dextran method that COS-7 cells developed 5.4 fold increased ecto-ATPase activity following transfection with CD39 cDNA prepared from B cells, when compared to vector alone (17).

Of potential significance was our observation that preparations of cell membranes from COS-7 cells transfected with pCDNA3-CD39 could inhibit platelet aggregation in response to ADP, collagen and thrombin (Figure 5A,B,C). ADP release from platelet granules is a vital part of the feedback process that amplifies and propagates platelet activation induced by ADP itself or other more potent agonists (3). Hence, ADP may be an important mediator of vascular thrombosis in inflammatory states. It has been suggested that a major role for the ATPDase may be to inhibit ADP or ATP-induced signal transduction in platelets, leukocytes and vascular endothelium mediated through the purinergic receptors  $\text{P}_{2\text{T}}$  and  $\text{P}_{2\text{Y}}$

(2,23,24). The hydrolysis of ATP and ADP by ATPDase would remove these purinergic mediators from the extracellular environment and ultimately favor the generation of adenosine (3,4) with the associated anti-inflammatory sequelae related to the interaction with P<sub>1</sub> receptors (2,4).

CD39 has been shown to play a role in B cell adhesion, in part related to cellular integrins (14,15). It is further possible that the interaction of adenosine nucleotides with CD39 may also influence cell signaling and integrin affinity for their respective ligands. The identification of CD39 as the vascular ATPDase and the documentation of the significant role in modulating platelet reactivity *in vitro* will further help to test this hypothesis in several experimental models.

Our observation that exposure of COS-7 CD39 transfectants to reactive oxygen intermediates results in loss of platelet antiaggregatory properties coupled to inhibition of biochemical ATPDase function and immunoreactivity is in keeping with the oxidant dependent loss of ATPDase function noted in association with endothelial cell activation *in vitro* and following vascular injury *in vivo* (8, 9; Robson *et al.* manuscript submitted). ATPDase activity has been shown to be lost *in vivo* with reperfusion injury and that this process may be ameliorated by the administration of antioxidants (25). We speculate that this loss, and the resultant decreased capacity to degrade ADP, could play a significant role in the extensive platelet activation and vascular inflammation seen in graft rejection and other forms of vascular injury. Certainly, the intravenous administration of apyrases to experimental animals has been shown to prolong xenograft survival and abrogate the platelet activation and deposition seen in this setting (26).

Because of the variable sensitivity of organs to vascular injury and thrombosis, the tissue specific distribution for CD39/ATPDase was studied. Northern analysis of RNA extracted from different tissues was therefore performed with a full length CD39 probe (Figure 7). Among the tissues examined, the strongest signals were observed in certain highly vascularized organs namely placenta, lung, skeletal

muscle and kidney. Heart and liver had lower levels of mRNA transcripts. Two dominant CD39 mRNA transcripts are noted in most tissues akin to the pattern observed when mRNA preparations from cultures of human endothelial cells are studied (data not shown). However, we were also able to detect as many as five different mRNA transcripts reacting with the entire CD39 cDNA probe (Figure 7) and both the 3' and 5' probes. These data suggest that these multiple RNA transcripts probably are most likely alternative splicing variants. The pathophysiological significance of this observation is presently undetermined. Interestingly, there was no convincing evidence for the presence of CD39 transcripts in RNA isolated from human brain. This last observation suggests that the specialized vascular tissues of the brain may not express CD39 at levels comparable to the other organs tested and does not explain the previously published data showing the presence of ATPDase activity in nerve tissues and on the external surface of intact synaptosomes (27-29). Possibly other E-type ATPases or ATPDases unrelated to CD39 are expressed in brain and hepatobiliary tissues as would be suggested by the finding that ATPase activity may be demonstrated in immunoprecipitated N-CAM from rat brain (reviewed in 2) and that ecto-ATPase activity has been noted with C-CAM from rat liver by certain groups (30).

Further investigation and determination of the CD39/ATPDase ecto-enzymatic active site, putative ATP binding sites (31) and regions sensitive to oxidative reactions by sequential mutagenesis experiments will help elucidate the reason(s) for the potential post-translational modification or other modulation of ATPDase activity with endothelial cell activation. This knowledge should permit us to express CD39/ATPDase in an active form despite endothelial cell activation, as we have done for thrombomodulin (32), and to explore the consequences of this intervention in transplantation models associated with vascular inflammation (33).

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Sandoz Pharma, Quebec Heart and Stroke Foundation, and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. J. Sévigny is a recipient of a studentship award from "Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec" and from the Heart and Stroke Foundation of Canada. We thank MRC UCT Liver Center for support of SCR, Dr. H. Winkler for expert advice, Dr. J.K. Blusztajn for discussion, and Dr. S. Grey for assistance with FACS analysis.

## REFERENCES

1. Preissner, K. T. (1988) *Haemostasis* **18**, 271-306
2. Plesner, L. (1995) *Int. Rev. Cytol.* **158**, 141-214
3. Luthje, J. (1989) *J. Klin. Wochenschr.* **67**, 317-327
4. Zimmermann, H. (1992) *Biochem. J.* **285**, 345-365
5. Niewiarowski, S., and Thomas, D. P. (1969) *Nature* **222**, 1269-1270
6. Pearson, J. D., and Gordon, J. L. (1979) *Nature* **281**, 384-386
7. Gordon, E. L., Pearson, J. D., and Slakey, L. L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 15496-15504
8. Robson S. C., Candinas, D., Hancock, W. W., Siegel, J., Millan, M., and Bach, F. H. (1996) *Transplant. Proc.* **28**, 536
9. Bach, F. H., Robson, S. C., Winkler, H., Ferran, C., Stuhlmeier, K., Wrighton, C., and Hancock, W. W. (1995) *Nat. Med.* **1**, 869-873

10. Christoforidis, S., Papamarcaki, T., Galaris, D., Kellner, R., and Tsolas, O. (1995) *Eur. J. Biochem.* **234**, 66-74
11. Sévigny, J., Côté, Y. P., and Beaudoin, A. R. (1995) *Biochem. J.* **312**, 351-356
12. Sévigny, J., Levesque, F. P., Grondin, G., and Beaudoin, A. R. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, in press
13. Stout, J. G., and Kirley, T. L. (1994) *J. Biochem. Biophys. Methods* **29**, 61-75
14. Maliszewski, C. R., Delespesse, G. L., Schoenborn, M. A., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Nakajima T., Baker, E., Sutherland, G. R., Poindexter, K., Birks, C., Alpert, A., Friend, D., Gimpel, S. D., and Gayle III, R. B. (1994) *J. Immunol.* **153**, 3574-3583
15. Kansas, G. S., Wood, G. S., and Tedder, T. F. (1991) *J. Immunol.* **146**, 2235-2244
16. Handa, M., and Guidotti, G. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **218**, 916-923
17. Wang, T.-F., and Guidotti, G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9898-9901
18. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156-159
19. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
20. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
21. Geladopoulos, T. P., Sotioudis, T. G., and Evangelopoulos, A. E. (1991) *Anal. Biochem.* **192**, 112-116
22. Karasaki, S., Simard, A., and de Lamirande, G. (1977) *Cancer Res.* **37**, 3516-3525
23. Welford, L. A., Cusack, N. J., and Hourani, S. M. O. (1987) *Eur. J. Pharmacol.* **141**, 123-130

24. El-Moatassim, C., Dornand, J., and Mani, J.-C. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1134**, 31-45
25. Candinas, D., Koyamada, N., Miyatake, T., Siegel, J., Hancock, W. W., Bach, F. H., and Robson, S. C. (1996) *Thromb. Haemostasis* **76**, 807-812
26. Koyamada, N., Miyatake, T., Candinas, D., Hechenleitner, P., Siegel, J., Hancock, W. W., Bach, F. H., and Robson, S. C. (1996) *Transplantation* **62**, 1739-1743
27. Trams, E. G., and Lauter, C. J. (1978) *Comp. Biochem. Physiol.* **59B**, 191-194
28. Cummins, J., and Hyden, H. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 271-283
29. Nagy, A. K., Shuster, T. A., and Delgado-Escueta, A. V. (1986) *J. Neurochem.* **47**, 976-986
30. Lin, S.-H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14403-14407
31. Asai, T., Miura, S., Sibley, L. D., Okabayashi, H., and Takeuchi, T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11391-11397
32. Wrighton, C.J., Kopp, C. W., McShea, A., Vetr, H., and Bach, F. H. (1995) *Transplant. Proc.* **27**, 288-289
33. Bach, F.H., Winkler, H., Ferran, C., Hancock, W.W., and Robson, S.C. (1996) *Immunol. Today* **17**, 379-384

## CHAPITRE 6

### DISTRIBUTION DES ATP DIPHOSPHOHYDROLASES DANS LES TISSUS DE PORC

#### INTRODUCTION

Même si les ATPDases sont des enzymes encore peu connues, on leur revendique déjà des fonctions importantes. On a proposé des rôles précis dans les divers systèmes des mammifères (Beaudoin *et al.*, 1996). Avant de définir ces rôles, il y a des éléments importants à considérer, tels que la localisation cellulaire de ces enzymes, la modulation de leurs activités, et le contrôle de l'expression du gène. Depuis que l'on a démontré l'existence d'une ATPDase chez les mammifères, dans le pancréas de porc (LeBel *et al.*, 1980), on a rapporté de nombreuses données éparses sur leur distribution. L'enzyme a été trouvée dans le foie et le cerveau de souris. On l'a isolée de la glande salivaire, de la glande mammaire, de l'utérus, du placenta, du rein, de la fraction synaptosomale du cerveau et des plaquettes sanguines chez le rat. On a trouvé des activités ATPDasiques dans le rein de chien et dans plusieurs lignées de cellules tumorales. On a aussi isolé l'enzyme de la rate, du poumon, de l'endothélium et du muscle lisse de l'aorte ainsi que du muscle lisse de la trachée chez le boeuf. Finalement, l'ATPDase a été identifiée dans le placenta et le cordon ombilical humains (voir Tableau 6 de l'introduction).

Il est difficile de comparer ces diverses données puisqu'elles ont été obtenues chez différentes espèces et selon différents protocoles d'isolement de l'enzyme. Dans ce chapitre, nous décrivons la distribution des ATPDases chez le porc en nous intéressant particulièrement aux nucléotidases présentes dans la fraction enrichie en membrane plasmique. Nous avons également produit plusieurs antiséras, dirigés contre diverses parties de l'enzyme. Avec ces outils, nous avons examiné la distribution des ATPDases par immunobuvardage et immunocytochimie.

## PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE

### Production des anticorps polyclonaux

#### *Préparation des antigènes*

Les antigènes suivants ont été utilisés: l'ATPDase purifiée de l'aorte de boeuf, et des polypeptides synthétisés selon différentes portions de la séquence primaire de CD39 humaine et selon la séquence N-terminale de l'ATPDase du pancréas de porc. L'ATPDase de l'aorte de boeuf a été purifiée selon la technique décrite précédemment (Sévigny *et al.*, 1997a). Pour une immunisation, 2 mg de protéines de la fraction purifiée sur colonne Con A-sépharose étaient fractionnées par SDS-PAGE. La protéine de 78 kDa, correspondant à l'ATPDase type II, était visualisée par coloration négative au dichlorure de cuivre (Lee *et al.*, 1987), puis extraite du gel en une large bande. Le dichlorure de cuivre était retiré de cette bande d'acrylamide par cinq lavages de 2 min. dans 0,25 M EDTA. La large bande d'acrylamide était ensuite rincée cinq fois pendant 2 min. dans de l'eau distillée stérile, additionnée à un volume égal de PBS puis brisée en petits morceaux par passages successifs dans une seringue. Les autres antigènes utilisés pour l'immunisation consistaient en des multipolypeptides synthétisés sur une matrice de résidus lysines comportant quatre branches du polypeptide (Tam, 1988). Quatre tétramères ont été synthétisés par le Service de Séquence de Peptides de l'Est du Québec au Centre de Recherche du CHUL à Québec. La séquence du premier antigène était "KSDTQETYGALDLGGA" correspondant au N-terminal de l'ATPDase du pancréas de porc. Les trois autres antigènes correspondaient aux acides aminés 38-67, 102-130 et 410-439 de CD39 humaine. Chacun des multipolypeptides a été resuspendu dans du PBS stérilisé par filtration.



### *Injections et prélèvements sanguins*

De jeunes lapins albinos mâles d'environ deux kg ont été injectés avec les divers antigènes. De façon générale, trois lapins étaient injectés pour chacun des antigènes. Quelques jours avant de procéder à l'immunisation, 5-10 ml de sang furent prélevés de l'artère de l'oreille pour isoler le sérum préimmun. L'injection primaire consistait en une émulsion préparée en mélangeant 0,5 ml d'adjuvant de Freund complet avec 0,5 ml de PBS contenant 250-500  $\mu$ g d'antigène. L'émulsion était distribuée en trois parties égales: dans le muscle de la cuisse et dans deux sites sous-cutanés. Le premier rappel, constitué de 150-350  $\mu$ g d'antigène resuspendu dans 1 ml de PBS, et le deuxième rappel, constitué de 80-250  $\mu$ g d'antigène, étaient administrés à six semaines d'intervalle en distribuant l'échantillon en cinq parties égales: 1 site intramusculaire et 4 sites sous-cutanés. Pour suivre la progression de la production des anticorps, 0,1-0,5 ml de sang était prélevé de la veine de l'oreille tous les deux jours, à partir du quatrième jour après chacune des injections de rappel. Lorsque le titre avait atteint 1:25,000 ou plus, généralement entre la sixième et la huitième journée, un échantillon de 50 ml de sang était prélevé de l'artère de l'oreille. Au dernier prélèvement, les lapins étaient anesthésiés avec 0,5-1 ml de somnotol/5 livres de poids corporel et le sang était récolté par ponction cardiaque. Le sérum était recueilli, puis conservé en aliquotes à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Préparation des fractions particulières et essais enzymatiques**

De jeunes porcs ont été sacrifiés afin d'en prélever des morceaux d'organes qui ont été congelés instantanément dans l'azote liquide, puis conservés à  $-70^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour de l'extraction. Les fractions particulières, enrichies en membrane plasmique, ont été purifiées selon la technique décrite pour l'aorte de boeuf (Sévigny *et al.*, 1997a). Les activités ATPasique et ADPasique des homogénats et des fractions particulières ont été dosées la journée même à  $37^{\circ}\text{C}$  dans 1 ml de: 8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 200  $\mu$ M du substrat (ATP ou ADP), 5 mM Tétramisole, 50 mM imidazole, 50 mM Tris, pH 7.5. Le Tétramisole est un inhibiteur de la phosphatase alcaline. L'azide de sodium, utilisé comme inhibiteur des ATPDases, était fraîchement préparé

et additionné au tampon à une concentration finale de 10 mM. La réaction enzymatique était initiée par l'addition du substrat et arrêtée par l'addition de 0,25 ml du réactif de vert de malachite. Le  $P_i$  produit était quantifié selon la méthode de Baykov *et al.* (1988). Une unité d'activité enzymatique correspond à la libération de 1  $\mu$ mole  $P_i$ /min à 37°C. Les protéines ont été dosées par la technique de Bradford (1976) en utilisant le BSA comme standard de référence.

### **Gels d'électrophorèse, immunobuvardages et immunohistochimie**

La migration en gel SDS-PAGE et l'immunobuvardage ont été effectués selon les techniques décrites précédemment (Sévigny *et al.*, 1997a). Le titre des anticorps a été déterminé par une technique d'immunobuvardage. Les échantillons d'antigènes étaient des fractions particulières d'aorte ou de rate de boeuf, de rate ou de grains de zymogènes de pancréas de porc, ou de cordons ombilicaux humains, tous préparés selon des protocoles déjà établis (Sévigny *et al.*, 1995, 1997a). L'immunohistochimie a été effectuée selon la procédure de Miller et Estran (1995) (voir Sévigny *et al.*, 1997b). Le fractionnement des échantillons par électrophorèse en gel d'acrylamide dans des conditions non-dénaturantes ainsi que la détection des activités enzymatiques ont été effectués selon la procédure décrite par Côté *et al.* (1992a).

## **RÉSULTATS**

### **Production d'anticorps polyclonaux**

Des anticorps ont été produits contre différentes portions de la séquence primaire de CD39 humaine, contre la séquence N-terminale de l'ATPDase du pancréas de porc et contre la protéine entière dénaturée de l'aorte de boeuf. La spécificité des anticorps a été déterminée par immunobuvardage en utilisant comme source

antigénique des fractions particulières riches en activité ATPDasique provenant du boeuf, du porc, de l'humain et du rat; les tissus utilisés et leur activité spécifique sont donnés au Tableau 1. Les antiséra les plus intéressants sont décrits au Tableau 2. Même si la fraction particulière de l'aorte de rat possédait une activité spécifique élevée, soit 3 unités/mg de protéine avec l'ADP comme substrat, nous n'avons pas pu détecter les formes attendues de l'enzyme (54 et 78 kDa) avec aucun des antiséra utilisés. Nous avons obtenu de bons antiséra avec tous les antigènes à l'exception du multipolypeptide synthétisé selon les acides aminés 410-439 de CD39 humaine qui n'est vraisemblablement pas antigénique.

Tableau 1. **Activité ATPDasique des fractions particulières utilisées pour vérifier la spécificité des anticorps**

Tissu	Activité (nanomoles P <sub>i</sub> /min/mg de protéines			
			% d'inhibition par le NaN <sub>3</sub>	
	ATP	ADP	ATP	ADP
<b>Boeuf</b>				
rate (1:1)†	4990	3890	46	61
aorte (5:3-5)	1350	900	32	55
<b>Humain</b>				
cordons ombilicaux (2:7)	1560	1150	48	59
<b>Porc</b>				
MGZ (3:3-4)	3000	2310	ND	51
rate (3:1)	390	300	48	67
<b>Rat</b>				
aorte (1:40)	3580	3040	21	26

Les résultats exprimés sont la moyenne. Chaque mesure a été effectuée en triplicata. La variation entre les mesures était inférieure à 5%.

ND: non déterminé.

† Le premier chiffre en parenthèses réfère au nombre d'expériences et le deuxième au nombre d'individus par expérience.

Tableau 2. Anticorps et spécificité

Sérum (nom)	Dilution	Antigène (ATPDase/CD39)	Spécificité des antiséra					
			ATPDase type I (54-56 kDa), type II (78 kDa)					
			Porc		Boeuf		Humain	
			type I	type II	type I	type II	type I	type II
Lennon	8000	ATPDase II bovine, purifiée de l'aorte	++	++	+++	+++	-	-
Ringo	6000	ATPDase I porcine, 16 a.a. N-terminaux †	+++	+++	+++	+++	++	++
Ritchie	8000	ATPDase I porcine, 16 a.a. N-terminaux †	+++	+++	++	++	++	++
Elvis	10000	ATPDase I porcine, 16 a.a. N-terminaux †	+++	+	+	+	-	-
Raly ‡	10000	CD39 humaine, a.a. 38-67	-	-	-	-	-	+
Kaly ‡	15000	CD39 humaine, a.a. 102-130	-	++	-	+	-	+++
Lutin ‡	10000	CD39 humaine, a.a. 102-130	-	++	-	+	-	+++

La spécificité des antiséra a été testée par immunobuvardage en utilisant comme source antigénique la fraction particulière des tissus suivants. Chez le porc, la source d'ATPDases type I et II provenait respectivement de la membrane des grains de zymogène et d'une fraction particulière de la rate. Chez le boeuf, les fractions particulières de la rate et de l'aorte ont été utilisées comme source d'ATPDases alors que chez l'humain elles provenaient d'une fraction particulière de cordons ombilicaux. À noter que ces trois derniers tissus possédaient les deux isoformes d'ATPDase.

† Ce polypeptide correspond aux acides aminés (a.a.) 202-217 de CD39 humaine (voir Chapitre 4, Figure 2).

‡ Ces antiséra ne peuvent pas reconnaître l'ATPDase type I puisque la séquence utilisée pour les produire est absente de cette isoforme.

## Distribution des ATP diphosphohydrolases

Nous avons mesuré l'activité spécifique de l'homogénat et de la fraction particulaire d'une variété de tissus porcins, avec les substrats ATP et ADP. Ces résultats sont décrits au Tableau 3. On remarque de façon générale que pour un même tissu, les activités ATPasique et ADPasique sont comparables, à l'exception du coeur et du muscle squelettique qui possèdent une activité ATPasique environ dix fois supérieure à l'activité ADPasique, et cela, autant pour leur homogénat que pour leur fraction particulaire. Pour un même tissu, l'inhibition des activités ATPasique et ADPasique par l'azidure de sodium était généralement comparable et se situait entre 40 et 70% pour l'ensemble des tissus. Par contre, l'inhibition des activités enzymatiques pour trois de ces tissus ne suivaient pas cette tendance. Les activités ATPasique et ADPasique de la fraction particulaire du coeur étaient très fortement inhibées par l'azidure de sodium, alors que dans le foie et le muscle squelettique, ces activités étaient faiblement inhibées par ce composé, autant pour leur homogénat que pour leur fraction particulaire. Ces résultats suggèrent que d'autres enzymes soient impliquées dans l'hydrolyse de l'ATP et de l'ADP dans ces tissus. Notons que la parotide se distingue aussi de l'ensemble des autres tissus. En effet, l'azidure de sodium inhibait faiblement l'activité enzymatique (~30%) et l'activité ADPasique était environ trois fois inférieure à l'activité ATPasique.

Les fractions particulières obtenues ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions non-dénaturantes. Les nucléotidases ont été localisées en incubant le gel d'acrylamide dans le tampon de dosage avec les substrats ATP, ADP et AMP, pris séparément. Un dépôt de phosphate de calcium apparaissait à l'endroit même où le substrat était hydrolysé. Les enzymogrammes montrent des précipités blanchâtres aux mêmes endroits avec les substrats ATP et ADP (Figure 1). Aucune bande d'activité n'a pu être détectée avec l'AMP (non montré). Il faut cependant noter que les conditions utilisées étaient optimales pour les ATPDases et non pour d'autres nucléotidases comme la 5'-nucléotidase. D'un tissu à l'autre, les dépôts blanchâtres n'apparaissent pas tous à la même hauteur. On constate aussi un doublet de bandes dans le foie, l'aorte, les cellules endo

Tableau 3. Distribution de l'activité ATPasique et ADPasique dans les tissus de porc

Tissu  (nombre d'expériences)	Activité (nanomoles P <sub>i</sub> /min/mg de protéines)							
	Homogénat				Fraction Particulaire			
			% d'inhibition par le NaN <sub>3</sub>				% d'inhibition par le NaN <sub>3</sub>	
	ATP	ADP	ATP	ADP	ATP	ADP	ATP	ADP
<b>Système circulatoire</b>								
cellules endothéliales de l'aorte (2)*	106	102	55	69	1962	1553	54	70
aorte (3)	41	13,5	41	45	295 ± 79	182 ± 43	31 ± 4	40 ± 9
veine cave (2)	26	18	46	64	73	60	50	60
coeur (4)	96 ± 18	12,0 ± 1,6	24 ± 16	28 ± 8	180 ± 42	14 ± 4	91 ± 2	70 ± 3
globules rouges	-	-	-	-	3,3	3,0	56	53
<b>Système respiratoire</b>								
muscle lisses de la trachée (2)*	75	51	54	63	621	454	49	61
poumon (3)	46 ± 6	31 ± 5	54 ± 3	59 ± 9	245 ± 64	192 ± 53	46 ± 1	62 ± 2
<b>Système digestif</b>								
foie (3)	87 ± 4	61 ± 4	24 ± 4	15 ± 2	506 ± 65	405 ± 68	13 ± 5	4,6 ± 0,5
estomac (3)	63 ± 7	32 ± 1	55 ± 3	53 ± 6	301 ± 4	173 ± 23	49 ± 2	64 ± 3
duodénum (3)	38 ± 1	15,5 ± 0,7	59 ± 2	28 ± 6	164 ± 26	114 ± 9	41 ± 3	49 ± 3
parotides (3)	32 ± 7	11,4 ± 1,6	47 ± 4	29 ± 1	135 ± 20	63 ± 10	27 ± 1	29 ± 2
pancréas (3)	19,4 ± 0,8	8,4 ± 0,4	61 ± 2	42 ± 12	67 ± 8	44 ± 5	48 ± 1	52 ± 4

**Tableau 3. Distribution de l'activité ATPasique et ADPasique dans les tissus de porc (suite)**

Tissu  (nombre d'expériences)	Activité (nanomoles P <sub>i</sub> /min/mg de protéines)							
	Homogénat				Fraction Particulaire			
			% d'inhibition par le NaN <sub>3</sub>				% d'inhibition par le NaN <sub>3</sub>	
	ATP	ADP	ATP	ADP	ATP	ADP	ATP	ADP
<b>Autres</b>								
rate (2)	59	46	51	68	387	301	48	67
rein (4)	56 ± 12	28 ± 5	55 ± 4	43 ± 6	205 ± 65	142 ± 46	46 ± 2	45 ± 3
ganglions lymphatiques (1)	34	21	47	45	103	74	45	58
cerveau (1)	17	6,1	59	21	44	29	52	52
muscle squelettique (2)	81	8,8	0	20	105	15,9	49	22

Les résultats exprimés sont la moyenne ± l'erreur standard. Chaque mesure a été effectuée en triplicate.

La variation entre les mesures était inférieure à 5%.

\* Expérience faite avec les tissus frais de 10 individus.

Figure 1. **Enzymogrammes des fractions particulières en gel de polyacrylamide dans des conditions non-dénaturantes.** Des échantillons de 75  $\mu\text{g}$  ont été fractionnés par électrophorèse dans un gradient de gel de 4-7.5% acrylamide. Pour l'aorte et les ZGM, des échantillons de 25 et 13  $\mu\text{g}$  ont respectivement été utilisés. L'activité enzymatique a été localisée par une incubation de 4 hres à 37°C dans: 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM Tris-imidazole, pH 7,5, et 4 mM du nucléotide ATP ou ADP. Le  $\text{P}_i$  libéré forme un précipité blanc avec le calcium au site de réaction.



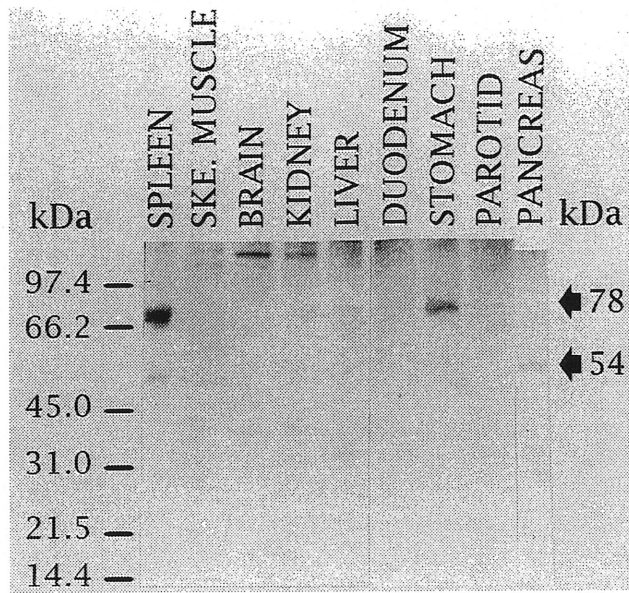
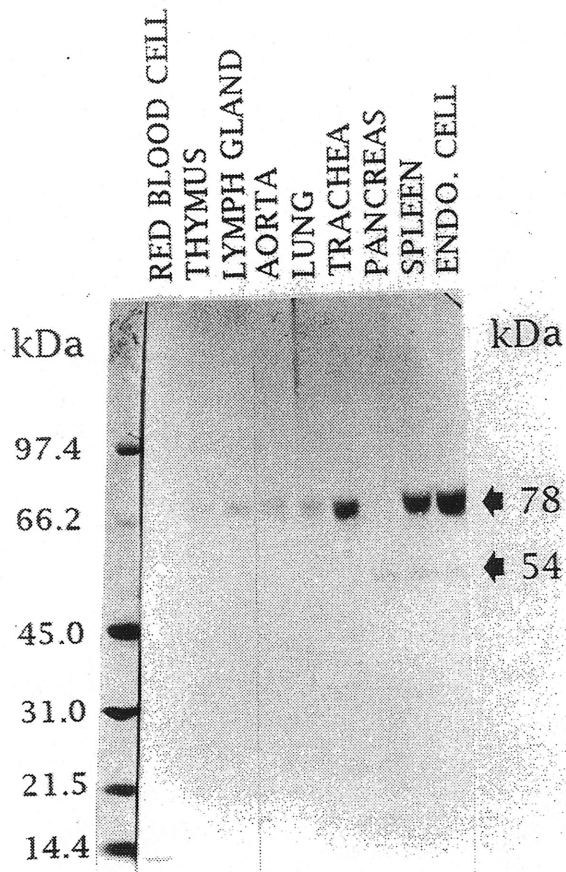
ATP



ADP



**Figure 2. Détection par immunobuvardage des ATPDases des fractions particulières.**  
Des échantillons de 75 µg ont été fractionnés par SDS-PAGE dans un gradient de gel de 8-13,5% acrylamide, transférés sur membrane d'Immobilon-P, puis incubés avec l'anticorps "Ringo" (1:6,000) tel que nous l'avons décrit dans la section Procédure expérimentale.



thénciales et la rate. L'apparence des bandes est généralement diffuse, à l'exception du foie qui montre un doublet de bandes très bien définies.

L'anticorps "Ringo" a été utilisé pour distinguer les différentes isoformes de l'ATPDase, et pour vérifier si l'activité ATPDasique mesurée dans les diverses fractions particulières correspondait à la quantité de protéine détectée avec l'anticorps. Les résultats sont illustrés à la Figure 2. On constate que l'activité ADPasique reflétait généralement bien la présence des ATPDases, à l'exception du foie. En effet, bien que ce tissu présente une forte activité ADPasique et ATPasique, il ne montre, après immunobuvardage et détection avec l'anti-ATPDase, qu'une bande de faible intensité à 78 kDa qui ne peut expliquer la totalité de l'activité mesurée. L'anticorps a également indiqué que l'isoforme de 78 kDa est la plus abondante dans les tissus de porc. L'isoforme de 54 kDa apparaît dans le pancréas, la rate et les cellules endothénciales. Cependant, dans ces deux derniers cas elle ne représente qu'une faible proportion des ATPDases totales (Figure 2). Une bande de haut poids moléculaire, que l'on ne peut expliquer actuellement, a été détectée dans le cerveau et le rein (Figure 2). Les seuls tissus où l'on n'a pu déceler la présence d'une bande à 78 ou à 54 kDa provenaient de la membrane des globules rouges, du muscle squelettique et du cerveau.

Nous avons également localisé l'ATPDase par immunocytochimie au niveau de quelques organes lymphoïdes: la rate, les amygdales et les plaques de Peyer. Dans la rate, on retrouve l'ATPDase dans les fibres nerveuses (Figure 3), les muscles lisses des trabécules (non montré) et dans la majorité des cellules de la pulpe blanche et rouge (Figures 4 et 5). À noter que les globules rouges n'étaient pas marqués. Au niveau des amygdales, l'anti-ATPDase a réagi avec les cellules du tissu lymphoïde ainsi qu'avec les cellules des nodules, avec une intensité variable d'un nodule à l'autre (Figure 6). Finalement, l'ATPDase est présente dans presque toutes les cellules des plaques de Peyer, qui sont constituées essentiellement de lymphocytes (Figure 7). Les plaques de Peyer se retrouvent étalées en grappes tout le long de l'intestin. Dans cette dernière figure, on remarque également une forte réaction sur les cellules épithénciales de l'iléon.

Figure 3. **Localisation immunohistologique des ATPDases dans la rate (fibres nerveuses).** (A) Coloration hématoxyline-éosine, fibres nerveuses (flèche). (B) Antisérum anti-ATPDase. Un signal intense est observé sur les cellules des fibres nerveuses (flèche). Les cellules du muscle lisse d'un vaisseau sanguin sont également fortement marquées (côté droit). (C) Antisérum. Différents plans de section de fibres nerveuses: longitudinale (tête de flèche) et tangentielle (flèche). (D) Contrôle préimmun. Absence de réaction d'une fibre nerveuse (flèche). A-D (200 X); barre = 50  $\mu$ m.

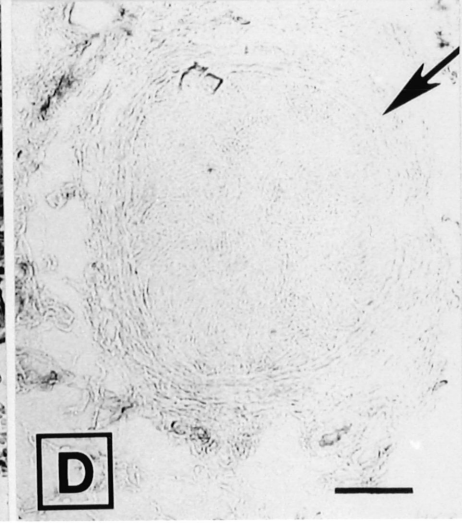
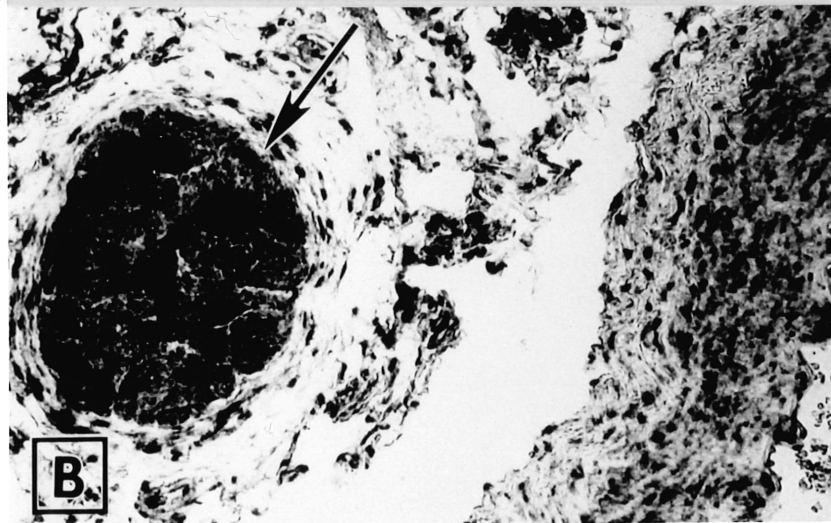
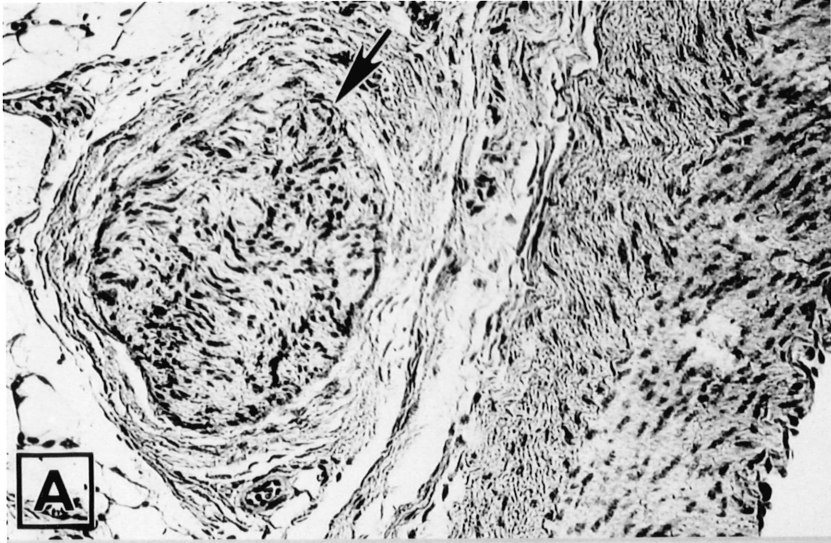


Figure 4. **Localisation immunohistologique des ATPDases dans la rate (pulpes blanche et rouge).** (A) Coloration hématoxyline-éosine. La pulpe blanche est délimitée par les têtes de flèche entourée de pulpe rouge. (B) Antisérum anti-ATPDase. La plupart des cellules des pulpes blanche et rouge sont positives. (C) Contrôle préimmun. A-C (200 X); barre = 50  $\mu$ m.

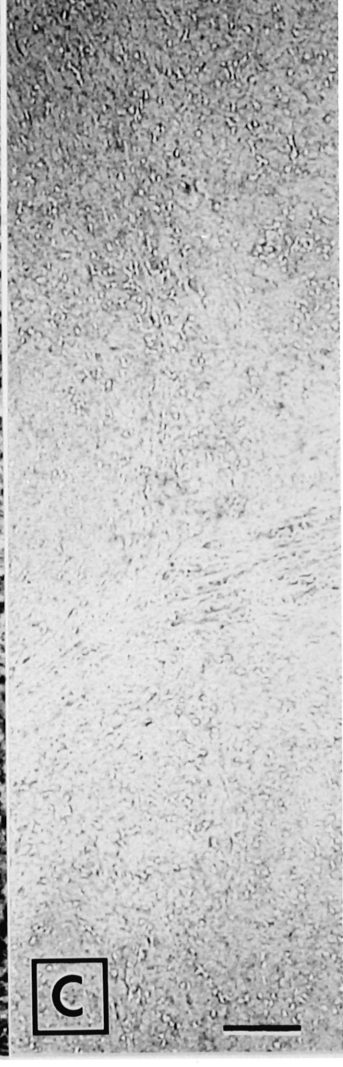
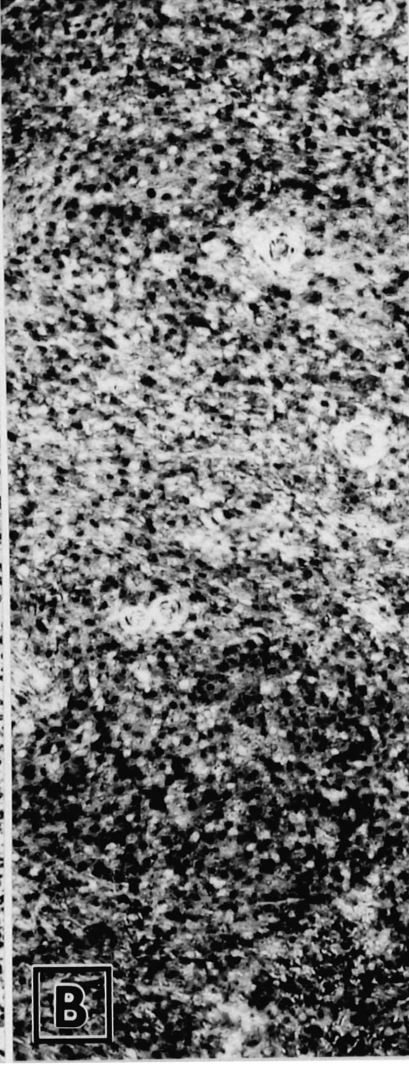
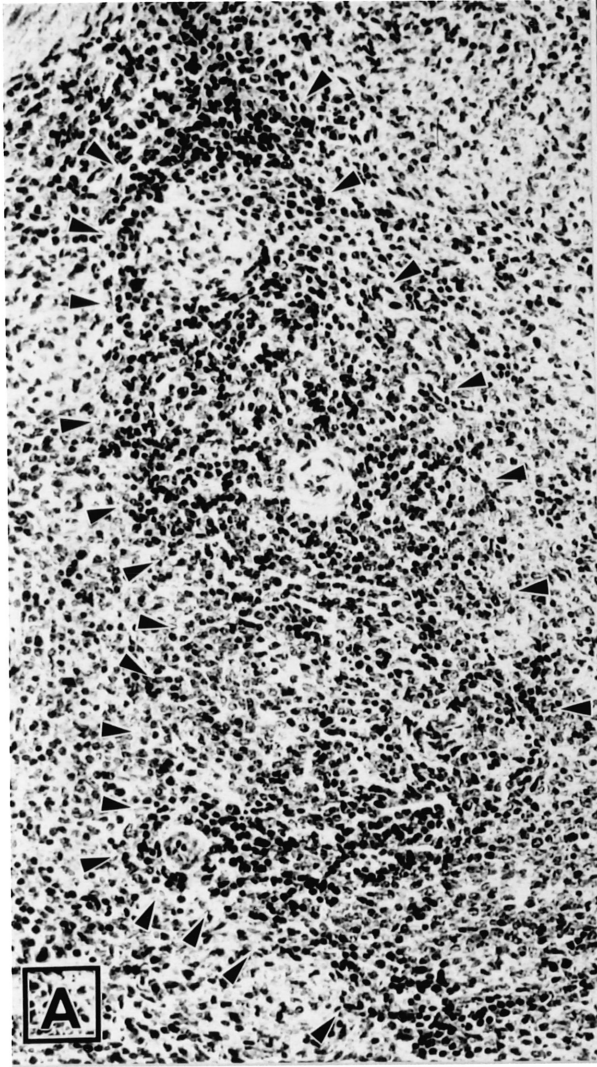
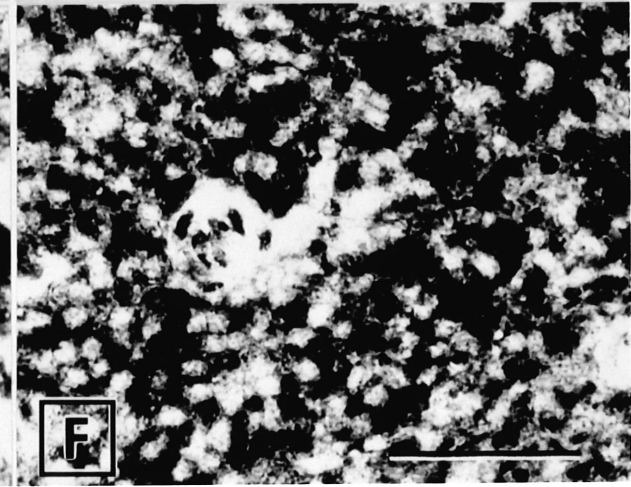
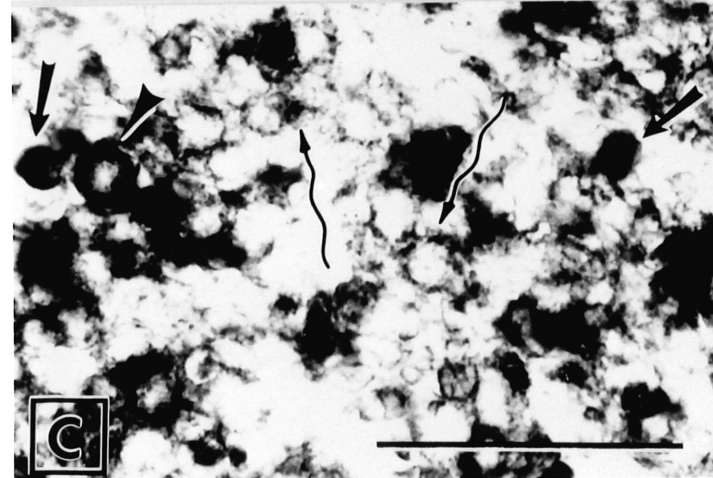
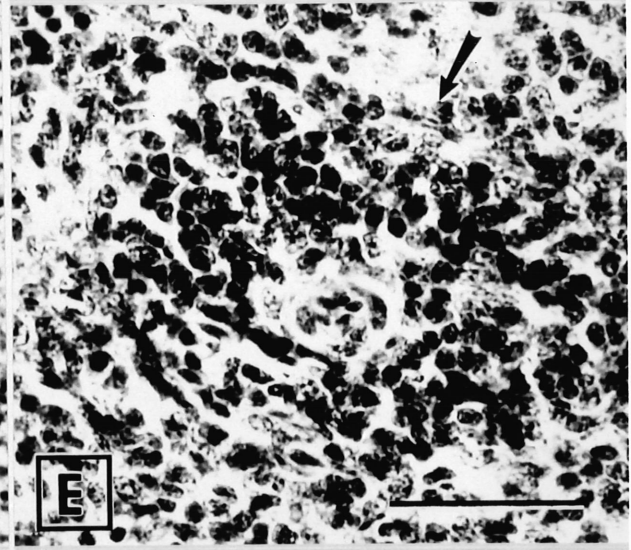
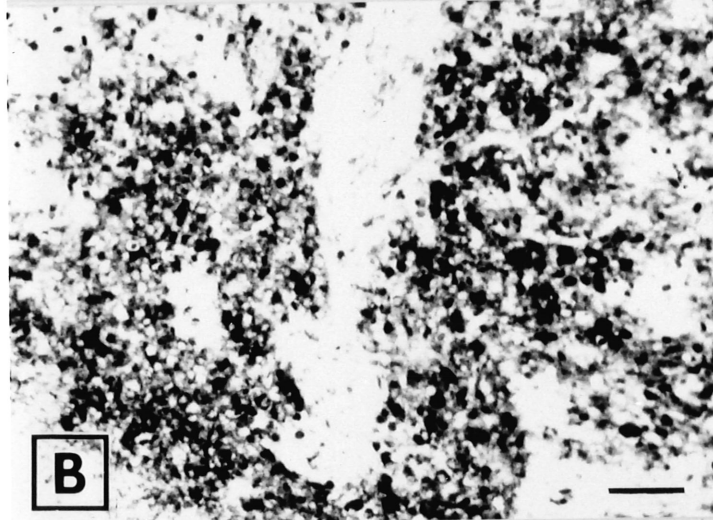
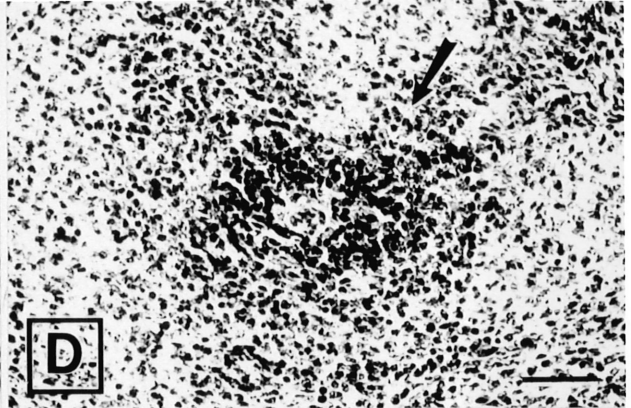
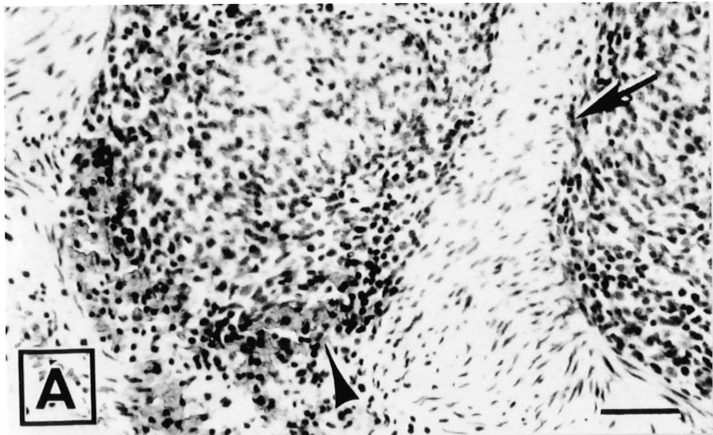
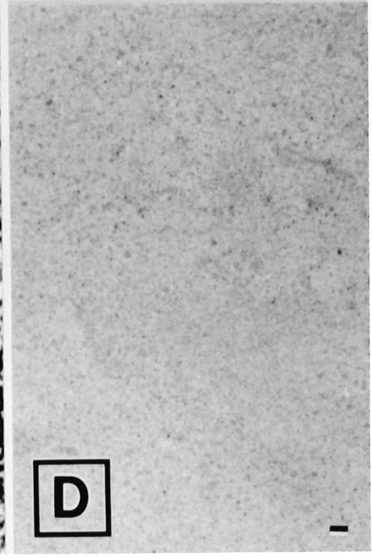
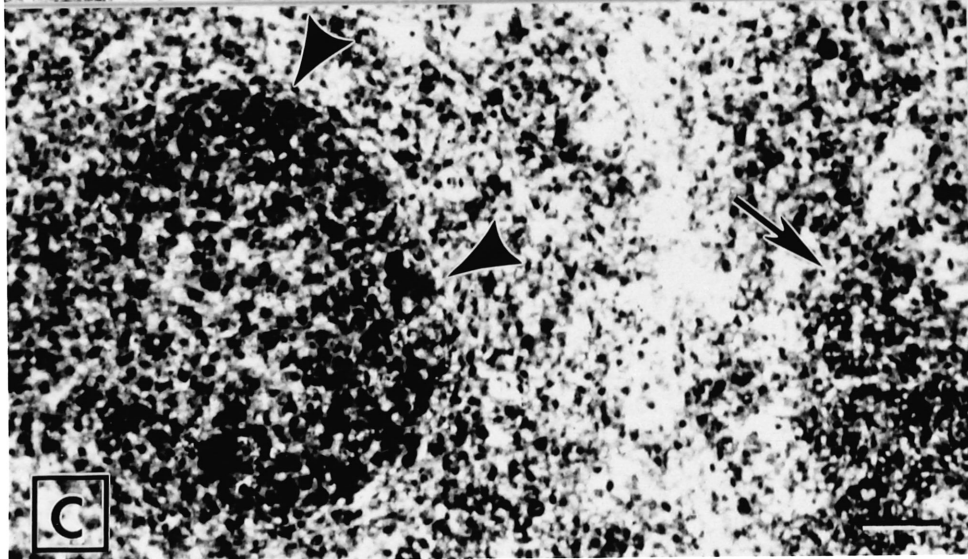
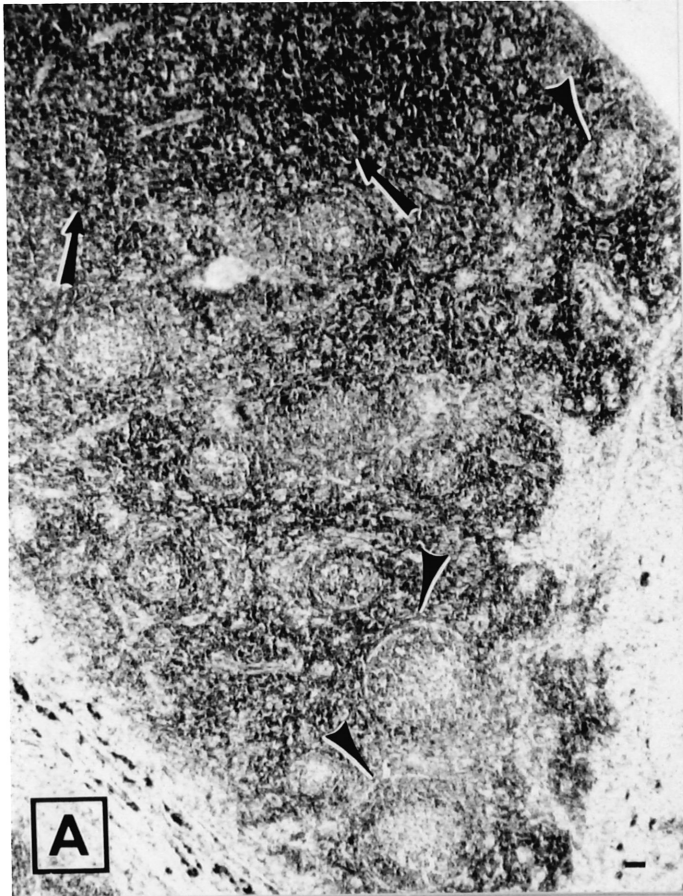




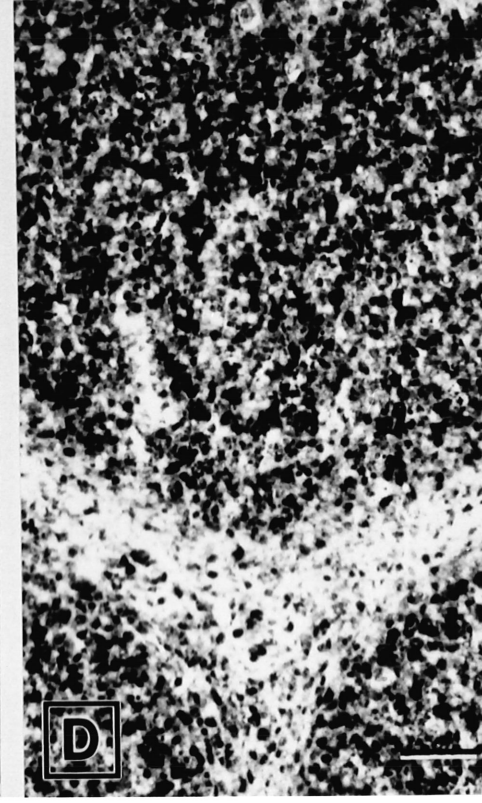
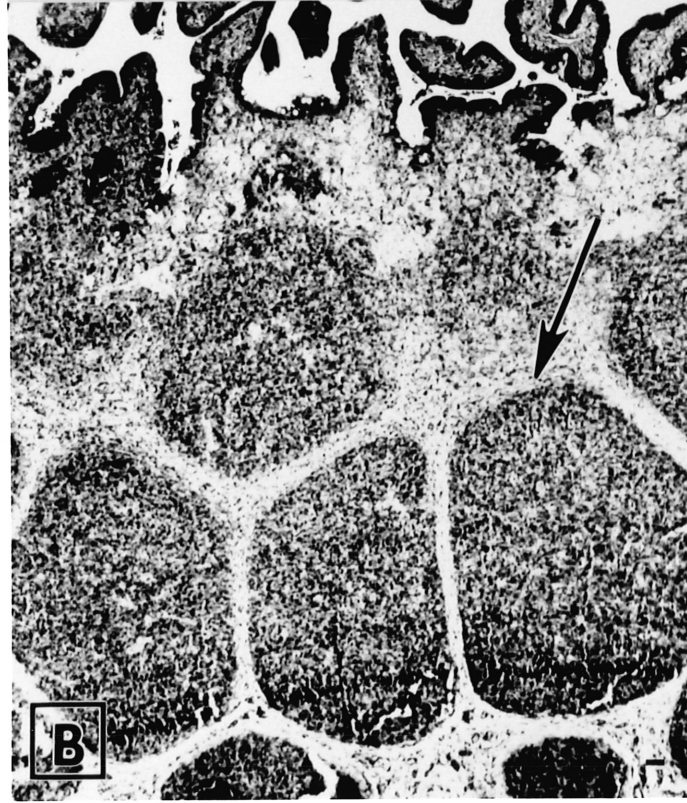
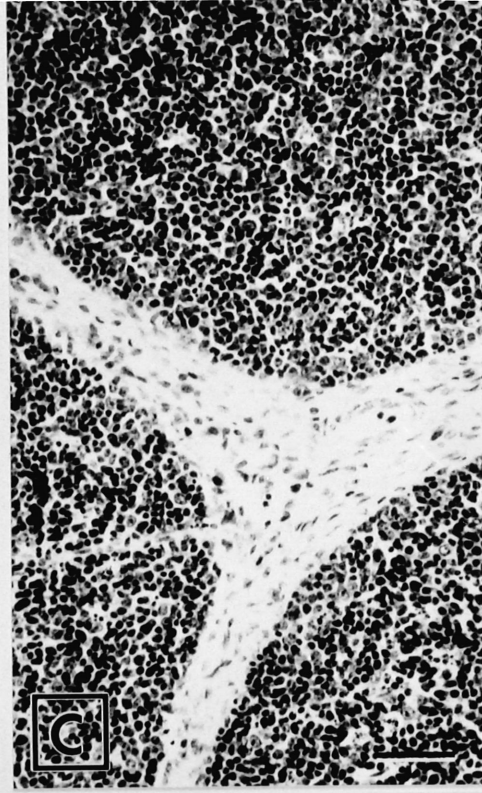
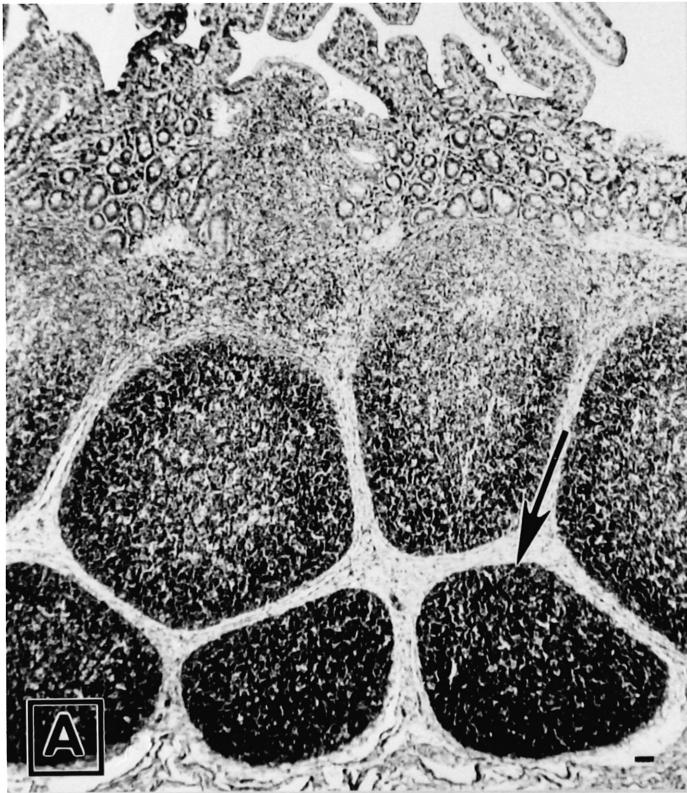
Figure 5. **Localisation immunohistologique des ATPDases dans la rate (fort grossissement).** (A) Coloration hématoxyline-éosine, trabécule (flèche), pulpe rouge (tête de flèche). (B) Antisérum anti-ATPDase. La majorité des cellules de la pulpe rouge sont positives. (C) Fort grossissement de la pulpe rouge. L'anticorps a réagi avec les lymphocytes (flèches), les plasmocytes (tête de flèche), et les cellules réticulaires (flèches en serpent). (D) Coloration hématoxyline-éosine de la pulpe blanche (flèche). (E) Hématoxyline-éosine, fort grossissement de la pulpe blanche (flèche). (F) Antisérum. La majorité des cellules de la pulpe blanche sont fortement marquées. A, B, D (200 X); E, F (500 X); C (800 X); barre = 50  $\mu$ m.



**Figure 6. Localisation immunohistologique des ATPDases dans les amygdales.**  
**(A)** Coloration hématoxyline-éosine, nodules (têtes de flèche), tissu lymphoïde (flèches).  
**(B)** Antisérum anti-ATPDase. Un signal est observé sur la majorité des cellules du tissu lymphoïde et les nodules réagissent avec une grande variation de l'intensité du signal (flèche à deux têtes). **(C)** Antisérum, fort grossissement. La majorité des cellules d'un nodule positif (têtes de flèche) sont intensément marquées. Les cellules du tissu lymphoïde (flèche) sont aussi positives. **(D)** Contrôle préimmun. **A, B, D** (50 X); **C** (200 X); barre = 50  $\mu$ m.



**Figure 7. Localisation immunohistologique des ATPDases dans les plaques de Peyer de l'iléon. (A) Coloration hématoxyline-éosine, plaques de Peyer (flèche). (B) Antisérum anti-ATPDase. La plupart des cellules des plaques de Peyer ont réagi avec l'anticorps (flèche). Notons également le signal intense des cellules épithéliales de l'iléon au haut de la figure. (C) Hématoxyline-éosine, fort grossissement. (D) Fort grossissement, la majorité des cellules ont réagi avec l'anticorps. A, B (50 X); C, D (200 X); barre = 50 µm.**



## DISCUSSION

Dans cette étude, la distribution des ATPDases a été évaluée dans une variété de tissus par la mesure de l'activité ATPasique et ADPasique, par la localisation de ces activités en gel de polyacrylamide dans des conditions non-dénaturantes et par la détection de ces protéines avec un antisérum spécifique après immunobuvardage. Nous avons également localisé l'ATPDase par immunohistologie dans quelques tissus. Pour démontrer la présence d'une ATPDase, il est nécessaire d'évaluer les activités ATPasique et ADPasique, mais cela ne constitue pas une information suffisante puisque de nombreuses autres enzymes exercent l'une ou l'autre de ces activités, telles: les phosphatases, la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (pompe à  $\text{Ca}^{2+}$ ), la nucléoside diphosphatase et les protéines kinases (Sarkis *et al.*, 1995; Beaudoin *et al.*, 1996). Pour évaluer les activités ATPasique et ADPasique, nous avons utilisé des conditions optimales pour les ATPDases. Ainsi, certaines nucléotidases ne pouvaient pas fonctionner dans ces conditions puisqu'il y avait du Tétramisole, un inhibiteur de la phosphatase alcaline, le chlorure de calcium comme seule source d'ions, dans un tampon Tris/imidazole pH 7,5. En effet, pour être actives, certaines nucléotidases nécessitent la présence d'autres ions comme le magnésium et le potassium, ou encore un pH acide ou basique, selon le cas. Les résultats montrent que la mesure de l'activité ADPasique donne une bonne indication de la présence des ATPDases. Seul le foie faisait exception à cette règle. Ainsi, l'ADP, utilisé dans ces conditions, semble être un substrat relativement spécifique pour les ATPDases, alors que l'ATP apparaît moins spécifique pour ces enzymes. Les ATPDases de mammifères, démontrées jusqu'à présent, hydrolysent l'ATP et l'ADP à des vitesses comparables. Ainsi, d'autres nucléotidases auraient hydrolysé une quantité plus ou moins importante d'ATP selon les tissus. Les deux exemples les plus évidents proviennent de la fraction particulaire du coeur et du muscle squelettique. Tous deux possédaient une activité ATPasique environ dix fois supérieure à leur activité ADPasique, qui était d'ailleurs relativement faible. L'immunobuvardage de ces fractions particulières, suivi de la détection avec l'antisérum "Ringo", a permis de visualiser une bande de très faible intensité à 78 kDa dans le cas du coeur. Selon quelques récentes études, il est maintenant clair que le coeur de rat et de boeuf

possèdent une ATPDase (Meghji *et al.*, 1992, 1995; Espinosa *et al.*, 1996; Beaudoin *et al.*, 1997a,b).

Pour appuyer la démonstration de la présence des ATPDases dans les divers tissus, nous avons mesuré l'inhibition des activités ATPasique et ADPasique causée par l'azidure de sodium. Bien qu'aucun inhibiteur spécifique des ATPDases soit connu, nous avons choisi l'azidure de sodium parce qu'il est couramment utilisé pour caractériser ces enzymes. Malheureusement, d'autres enzymes sont également inhibées par ce composé, comme par exemple l'ATPase mitochondriale. L'azidure de sodium inhibait de façon comparable les activités ATPasique et ADPasique d'un même tissu. Outre le foie, le coeur et le muscle squelettique, l'inhibition se situait autour de 30 à 70%, ce qui est comparable aux résultats obtenus pour d'autres ATPDases (Beaudoin *et al.*, 1996). La migration en gel d'acrylamide dans des conditions non-dénaturantes et l'apparition de bandes d'activités à la même hauteur avec l'ATP et l'ADP mais pas avec l'AMP corrobore également la présence des ATPDases dans la majorité des tissus étudiés.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre montre que les ATPDases sont présentes dans plusieurs tissus. Il découle aussi que d'autres enzymes peuvent être importantes dans l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire, notamment au niveau du coeur et du muscle squelettique. D'ailleurs, Zhao et Dhalla (1991) ont décrit une ATPase dans le coeur de rat. Nous avons aussi mis en évidence une nucléotidase qui possède une haute activité enzymatique dans le foie. Il pourrait s'agir d'une ATPDase différente de celles connues. En effet, ce tissu montre une forte activité ATPasique et ADPasique qui est faiblement inhibée par l'azidure de sodium. Après migration en gel d'acrylamide dans des conditions non-dénaturantes, un doublet de bandes hydrolysait l'ATP et l'ADP mais pas l'AMP. La localisation de cette bande dans le gel ainsi que son aspect étaient différents de ceux des ATPDases des autres tissus. Après immunobuvardage et détection avec un sérum anti-ATPDase qui reconnaît les isoformes I et II de l'enzyme, on a observé une bande à 78 kDa de faible intensité. Ainsi, l'ATPDase type II est présente dans la fraction particulière du foie, mais en quantité telle qu'elle peut difficilement



expliquer toute l'activité mesurée dans ce tissu. On ne peut cependant pas exclure l'existence d'un facteur, spécifique au foie, capable de moduler l'activité de l'enzyme. Valenzuela et collaborateurs ont d'ailleurs mis en évidence une protéine capable d'activer l'activité enzymatique des ATPDases de plantes et de mammifères (Mancilla *et al.*, 1987; Valenzuela *et al.*, 1989).

Les expériences d'immunobuvardage et de la détection des ATPDases avec l'un des antiséras que nous avons produits, ont montré que c'est la forme de 78 kDa (ATPDase II) qui est la plus répandue chez le porc. Cette isoforme se retrouve dans la majorité des tissus testés. La forme de 54 kDa (ATPDase I) n'a été trouvée que dans le pancréas et les tissus produisant une forte quantité de l'isoforme II. Outre la purification de l'ATPDase de l'aorte et du poumon de boeuf (Sévigny *et al.*, 1997a,b), trois autres études, chez les vertébrés, ont rapportés la purification d'une ATPDase d'une masse moléculaire près de 78 kDa: une protéine de 75 kDa dans les vaisseaux du cordon ombilical humain (Yagi *et al.*, 1992), une protéine de 82 kDa dans le placenta humain (Christoforidis *et al.*, 1995) et une protéine de 80 kDa dans l'oviducte de poulet (Strobel *et al.*, 1996). Quant à l'isoforme de 54 kDa, elle n'a été clairement démontrée que dans le pancréas de porc (Chapitre 1, Sévigny *et al.*, 1995). Cette petite isoforme de l'enzyme a aussi été observée dans l'aorte bovine. En effet, en plus de l'isoforme de 78 kDa, une protéine d'environ 56 kDa a été montrée par immunobuvardage et détection avec un anticorps anti-ATPDase. Cependant, cette dernière était en proportion inférieure à la protéine de 78 kDa (Chapitre 2, Sévigny *et al.*, 1997a).

Au chapitre 5, nous avons identifié l'ATPDase à CD39, connue comme un marqueur des lymphocytes B matures et des lymphocytes T activés (Kansas *et al.*, 1991; Maliszewski *et al.*, 1994). Cette protéine est un marqueur de l'activation immunitaire *in vivo* (Duensing *et al.*, 1994). On pouvait ainsi anticiper la présence des ATPDases dans les lymphocytes que l'on retrouve par exemple dans la rate, les plaques de Peyer et les amygdales. Le fait que les nodules de la rate (non montré) et des amygdales aient été marqués avec une intensité variable peut s'expliquer par la présence de lymphocytes B à différents stades d'activation. En

effet, un nodule est constitué essentiellement de lymphocytes B, au même stade d'activation. La localisation de l'enzyme dans ces cellules suppose un rôle dans l'activation immunitaire qui a déjà été proposé pour l'activité ecto-ATPase de divers lymphocytes (Filippini *et al.*, 1990a,b; Dombrowski *et al.*, 1993, 1995).

Nous avons aussi localisé l'ATPDase par immunohistochimie dans plusieurs autres tissus du porc et du boeuf (Beaudoin *et al.*, 1997a). Chez le porc nous avons montré la présence de l'ATPDase dans le système digestif (Sévigny *et al.*)<sup>1</sup> et dans le système lymphoïde (Benrezzak *et al.*)<sup>2</sup>. Chez le boeuf nous avons localisé l'enzyme au niveau du système respiratoire (Chapitre 3, Sévigny *et al.*, 1997b) et au niveau du système vasculaire, dans l'aorte (Chapitre 2, Sévigny *et al.*, 1997a) et le coeur (Beaudoin *et al.*, 1997b, sous presse). L'enzyme est présente dans tous les systèmes de l'organisme. De façon générale, on a détecté la présence des ATPDases dans les cellules épithéliales, musculaires lisses et endothéliales, dans les chondrocytes, les globules blancs ainsi que dans les cellules nerveuses du coeur et la rate. Une distribution aussi large de l'enzyme suppose l'importance de moduler les concentrations de nucléotides extracellulaires dans tous les systèmes de l'organisme.

En résumé, nous avons examiné la distribution des ATPDases par des méthodes biochimiques et immunologiques. Parmi les tissus et les cellules que nous avons étudiés, ce sont les cellules endothéliales qui arboraient la plus grande quantité d'ATPDase, tel qu'évaluée par l'activité enzymatique, par l'intensité des précipités sur enzymogrammes et par les réactions après immunobuvardage et détection avec un anticorps spécifique à ces enzymes. Cette localisation de l'ATPDase cadre bien avec le rôle qu'on lui a attribué dans le contrôle de l'agrégation plaquettaire.

---

1 Sévigny, J., G. Grondin, J. Roy, J. Proulx et A.R. Beaudoin. Distribution of ATP diphosphohydrolases in the pig digestive system. soumis.

2 Benrezzak, O., G. Grondin, J. Sévigny, F.P. Gendron, É. Rousseau, P. D'Orléans-Juste et A.R. Beaudoin. Identification and distribution of an ATP diphosphohydrolase (CD39) in pig lymphoid organs and cells. soumis.

Par sa fonction catalytique et sa localisation à la surface des cellules des vaisseaux sanguins, on envisage également la possibilité que l'ATPDase exerce un contrôle du tonus vasculaire et de l'inflammation (Sévigny et Beaudoin, 1994; Sévigny *et al.*, 1997a).

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier la collaboration précieuse de mesdames J. Roy, H. Roberge et J. Proulx qui ont effectué les purifications des fractions particulières et qui ont participé aux dosages enzymatiques, ainsi que de monsieur G. Grondin qui a effectué la localisation immunocytochimique.

## DISCUSSION GÉNÉRALE

Le développement prodigieux des moyens de communication représente probablement ce que notre siècle aura apporté de plus remarquable. Nous en sommes aujourd'hui à l'autoroute électronique. Les cellules ont compris depuis longtemps l'importance de développer des moyens de communication rapides et efficaces, et ont acquis au cours des millénaires un système complexe de messagerie moléculaire. Les nucléotides extracellulaires constituent l'un de ces modes de communication. En effet, une foule de récepteurs  $P_1$  et  $P_2$  ont déjà été mis en évidence. C'est en étudiant les façons dont les cellules communiquent entre elles, que l'on a pu découvrir comment les concentrations de ces messagers intercellulaires pouvaient être régulées. Depuis plusieurs années déjà, on connaît l'existence d'enzymes capables d'hydrolyser les nucléotides extracellulaires. On croyait que deux enzymes distinctes étaient impliquées dans la déphosphorylation de l'ATP et de l'ADP. Quelques équipes de recherche ont tenté d'identifier ces enzymes sans succès.

En 1996, les travaux de quelques équipes de recherche aboutissaient enfin à l'identification de la protéine. D'abord, Christoforidis *et al.*, en 1995, ont purifié l'ATPDase humaine et en ont obtenu six séquences partielles qui ne montraient alors aucune homologie avec les protéines connues. On sait maintenant que ces séquences appartenaient à CD39 humaine. Puis en 1996, trois équipes ont identifié le gène correspondant à l'ATPDase. Handa et Guidotti ont purifié l'ATPDase du tubercule de la pomme de terre, *Solanum tuberosum*, puis cloné son gène. Une forte homologie avait été notée avec CD39. Dans une étude suivante, ils ont cloné l'ADNc du gène de CD39, à partir de l'ARNm des lymphocytes B humains transformés par le virus de Epstein Barr, puis ils ont montré que la protéine produite par ce gène possédait des activités ATPasique et ADPasique (Wang et Guidotti, 1996). Ils concluaient que CD39 pouvait être une ecto-apyrase (ecto-ATPDase). Durant la même période, Vasconcelos *et al.* (1996), avaient aussi purifié l'ATPDase de la pomme de terre et obtenu trois séquences partielles de la protéine. Ils avaient également remarqué que ces séquences montraient une

similarité avec CD39. Enfin, notre étude, effectuée en collaboration avec l'équipe du docteur S.C. Robson à Boston, a démontré hors de tout doute que CD39 est une ATPDase (Chapitre 5, Kaczmarek *et al.*, 1996). Cette identification constituait l'événement majeur lors du premier congrès international sur les ecto-ATPases tenu en août 1996 à Mar del Plata en Argentine. Conjointement, d'autres groupes de chercheurs pouvaient également appuyer la démonstration que CD39 est une ATPDase. D'abord le docteur A.J. Marcus de New York a présenté des résultats préliminaires de son équipe sur le clonage et l'expression de l'ADNc de CD39 (Marcus *et al.*, 1997), et le docteur T.L. Kirley nous a entretenu sur le clonage de l'ADNc de l'ecto-ATPase du gésier de poulet, qui possède une forte similarité avec CD39 (Kirley *et al.*, 1997).

L'originalité de cette thèse réside dans l'identification de l'enzyme responsable de la majeure partie des activités ecto-ATPasique et ecto-ADPasique présentes dans plusieurs systèmes, notamment dans le système vasculaire. Nous avons purifié deux isoformes d'ATPDase de mammifères, ce qui nous a permis de cloner l'ADNc du gène et de produire des anticorps contre ces protéines. Ces outils nous permettront d'approfondir l'étude de ces enzymes et d'en définir les rôles physiologiques. D'ailleurs, les anticorps nous ont déjà permis de localiser l'ATPDase par immunohistochimie dans plusieurs systèmes et l'expression du gène a permis de vérifier un rôle de l'enzyme dans l'agrégation plaquettaire.

Nous pouvons donc anticiper que d'ici quelques années de nouvelles informations seront connues sur les ATPDases. Par exemple, la localisation cellulaire de ces protéines sera bientôt connue dans les grands systèmes. Le promoteur du gène sera cloné et nous pourrons étudier les modes de régulation de la transcription du gène. Dans le cadre de ces études, nous avons montré que les ATPDases pouvaient être associées à d'autres protéines à l'état natif, ce qui représente un autre sujet d'étude. Dans un autre ordre d'idée, puisque l'ATPDase peut inhiber l'agrégation plaquettaire, on peut envisager l'utilisation de l'enzyme dans le traitement de certaines maladies cardiovasculaires. Les méthodes actuelles pour empêcher la formation de caillots sanguins lors de chirurgies et/ou lors de traitements post-

thrombolytiques, par exemple, ne sont pas suffisamment efficaces. La plupart des inhibiteurs de la coagulation sanguine disponibles bloquent la voie d'activation par la thrombine ou inhibent l'agrégation interplaquettaire en empêchant l'interaction GPIIb-IIIa de se produire (Topol et Plow, 1993). Aucun inhibiteur n'est utilisé pour contrer l'agrégation plaquettaire qui s'effectue par la voie de l'ADP, et pourtant, elle constitue le moyen le plus important pour recruter les plaquettes et initier la cascade menant à une agrégation massive. C'est pourquoi nous avons déjà breveté quelques-unes des applications cliniques possibles de l'enzyme (voir Annexes, page 237). De plus, une licence d'utilisation de l'ATPDase pour les xénotransplantations a déjà été vendue à Deaconess Hospital/Sandoz. L'un des problèmes majeurs du rejet des greffons est l'activation des cellules endothéliales de l'organe donneur et des plaquettes sanguines, ce qui a pour effet d'initier la formation d'agrégats plaquettaires dans toute la vascularisation de l'organe donneur (Platt et Bach, 1991; Bach *et al.*, 1995). On a observé que l'activité ADPasique des cellules endothéliales de l'organe donneur était fortement inhibée lors de la xénotransplantation (Candinas *et al.*, 1996). Cette perte d'activité constituerait une cause majeure du rejet de la greffe. L'activation de l'ATPDase des cellules endothéliales du greffon pourrait ainsi augmenter les chances de succès des transplantations, en diminuant la thrombogénicité et l'inflammation. D'ailleurs, on a récemment démontré que l'addition d'un extrait d'ATPDase dans la circulation sanguine, lors de xénotransplantations, prolongeait significativement la survie des greffons (Kaczmarek *et al.*, 1997). Ce projet s'inscrit dans la préparation d'un cochon multitransgénique, dont le but des transgènes est de rendre acceptables les greffes d'organes de porcs à des humains. On prévoit donc sur-exprimer le gène de l'ATPDase humaine dans une lignée de porcs transgéniques.

C'est dans le but de mieux comprendre le langage des nucléotides extracellulaires que nous avons mené ces études. Les nucléotides extracellulaires constituent un champ de recherche fascinant en pleine expansion, à l'intérieur duquel les ATPDases participent, à leur façon, à la communication des cellules entre elles. L'intérêt envers ces enzymes est donc autant d'ordre fondamental que thérapeutique.

## ANNEXES

### ARTICLES PRODUITS AU COURS DE CES ÉTUDES

1. Sévigny, J. et A.R. Beaudoin. 1994. Le monde des nucléotides extracellulaires. *Med. Sci.* **10**: 836-844.
2. 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.
3. Picher, M., J. Sévigny, P. D'Orléans-Juste et A.R. Beaudoin. 1996. Hydrolysis of P<sub>2</sub>-purinoceptor agonists by a purified ectonucleotidase from the bovine aorta, the ATP-diphosphohydrolase. *Biochem. Pharmacol.* **51**: 1453-1460.
4. 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.
5. Beaudoin, A.R., J. Sévigny et M. Picher. 1996. ATP-diphosphohydrolases, Apyrases, and Nucleotide Phosphohydrolases: biochemical properties and functions. Pp. 369-401 dans *Biomembranes*. Vol. 5. Éditeur: A.G. Lee. Greenwich, JAI Press Inc., 428 p.
6. Sévigny, J., F.P. Levesque, G. Grondin et A.R. Beaudoin. 1997. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochim. Biophys. Acta* **1334**: 73-88.
7. Beaudoin, A.R., G. Grondin et J. Sévigny. 1997. Distribution of different ATP diphosphohydrolase isoforms in mammalian organs. Pp. 33-40 dans *Ecto-ATPases: recent progress on structure and function*. Éditeurs: L. Plesner, T.L. Kirley et A.F. Knowles. Plenum Publishing Corporation. New York.

8. Kaczmarek, E., J.B. Siegel, **J. Sévigny**, K. Koziak, W.W. Hancock, A.R. Beaudoin, F.H. Bach et S.C. Robson. 1997. Vascular ATP diphosphohydrolase (CD39/ATPDase). Pp. 171-185 dans *Ecto-ATPases: recent progress on structure and function*. Éditeurs: L. Plesner, T.L. Kirley et A.F. Knowles. Plenum Publishing Corporation. New York.
9. **Sévigny, J.**, F. Dumas et A.R. Beaudoin. 1997. Purification and identification by immunological techniques of different isoforms of mammalian ATP diphosphohydrolases. Pp. 143-151 dans *Ecto-ATPases: recent progress on structure and function*. Éditeurs: L. Plesner, T.L. Kirley et A.F. Knowles. Plenum Publishing Corporation. New York.
10. **Sévigny, J.**, M. Picher, G. Grondin et A.R. Beaudoin. 1997. Purification and immunohistochemical localization of the ATP diphosphohydrolase in bovine lungs. *Am. J. Physiol.* sous presse.
11. Beaudoin, A.R., **J. Sévigny**, G. Grondin, S. Daoud et F.P. Levesque. 1997. Purification, characterization and localization of two ATP diphosphohydrolase isoforms in the bovine heart. *Am. J. Physiol.* sous presse.
12. Benrezzak, O., G. Grondin, **J. Sévigny**, F.P. Gendron, É. Rousseau, P. D'Orléans-Juste et A.R. Beaudoin. Identification and distribution of an ATP diphosphohydrolase (CD39) in pig lymphoid organs and cells. soumis.
13. **Sévigny, J.**, G. Grondin, J. Roy, J. Proulx et A.R. Beaudoin. Distribution of ATP diphosphohydrolases in the pig digestive system. soumis.



## COMMUNICATIONS PRÉSENTÉES AU COURS DE CES ÉTUDES

Communications par affiches et par présentations orales (\*)

1. \* **Sévigny, J.**, Y.P. Côté et A.R. Beaudoin. 1993. Purification de l'ATP-diphosphohydrolase de l'aorte de boeuf. 61<sup>e</sup> Congrès de l'ACFAS (Association Canadienne-Française pour l'Avancement des Sciences), Rimouski, Qué., Canada. Recueil des résumés de communications, p. 32.
2. **Sévigny, J.**, Y.P. Côté et A.R. Beaudoin. 1993. Identification and purification of the catalytic subunit of the ATP-diphosphohydrolase type II. 36<sup>th</sup> Annual Meeting CFBS (Canadian Federation of Biological Societies), Windsor, Ont., Canada. Program Proceedings, Abstract #500, p. 131.
3. **Sévigny, J.** et A.R. Beaudoin. 1994. Identification of the catalytic subunit of the bovine aorta ATP-diphosphohydrolase. 5<sup>th</sup> Int. Symp. on Adenosine and Adenine Nucleotides, Philadelphia, PA, USA. *Drug Dev. Res.* **31**: 320.
4. **Sévigny, J.**, M. Picher et A.R. Beaudoin. 1994. Thromboregulation and ATP-diphosphohydrolase: Purification of the ectonucleotidase. 5<sup>th</sup> IBC Int. Symp. Advances in Anticoagulant, Antithrombotic & Thrombolytic Therapeutics, Cambridge, MA, USA. Abstract #31.
5. Picher, M., **J. Sévigny**, P. D'Orléans-Juste et A.R. Beaudoin. 1994. Hydrolysis of P<sub>2</sub>-purinoceptor agonists by the bovine aorta ATP-diphosphohydrolase. 5<sup>th</sup> IBC Int. Symp. Advances in Anticoagulant, Antithrombotic & Thrombolytic Therapeutics, Cambridge, MA, USA. Abstract #2.
6. **Sévigny, J.**, C. Dunn et A.R. Beaudoin. 1994. Réduire la thrombogénicité de matériaux artificiels en les recouvrant d'ATP-diphosphohydrolase. 3<sup>e</sup> congrès de l'AQFIM (Association Québécoise des Fabricants de l'Industrie Médicale), Montréal, Qué., Canada. Cahier du participant, Abstract #85.

7. **Sévigny, J.**, M. Picher et A.R. Beaudoin. 1995. Identification of the catalytic subunit of the bovine lung ATP-diphosphohydrolase. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Cell Biology, Washington, DC, USA.
8. Picher, M., **J. Sévigny**, F. Levesque, L.B. Ruest et A.R. Beaudoin. 1995. The bovine aorta ATP-diphosphohydrolase, an ectoenzyme involved in the hydrolysis of P<sub>2</sub>-purinoceptor agonists. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Cell Biology, Washington, DC, USA.
9. \* **Sévigny, J.**, G. Grondin et A.R. Beaudoin. 1996. Characterization and distribution of ATP diphosphohydrolases in mammalian organs. Purines 96: Molecular, Pharmacological and Therapeutic Advances, Milan, Italy. *Drug Dev. Res.* **37**: 137.
10. Levesque, F.P., **J. Sévigny** et A.R. Beaudoin. 1996. Purification and characterization of an ATP diphosphohydrolase (ATPDase) from the bovine heart. Purines 96: Molecular, Pharmacological and Therapeutic Advances, Milan, Italy. *Drug Dev. Res.* **37**: 149.
11. Benrezzak, O., **J. Sévigny**, G. Grondin et A.R. Beaudoin. 1996. Identification and distribution of an ATP-diphosphohydrolase (ecto-ADPase and ecto-ATPase) in lymphoid tissues. Purines 96: Molecular, Pharmacological and Therapeutic Advances, Milan, Italy. *Drug Dev. Res.* **37**: 183.
12. Levesque, F.P., **J. Sévigny** et A.R. Beaudoin. 1996. An Ecto-ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) is responsible for the ADPase activity in bovine cardiomyocytes. American Heart Association, Conference on Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Salt Lake City, UT, USA. P33.
13. **Sévigny, J.**, J. Roy et A.R. Beaudoin. 1996. Ecto-ATP diphosphohydrolase and control of blood nucleotide concentrations. American Heart Association, Conference on Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Salt Lake City, UT, USA. P34.

- 14.\* Beaudoin, A.R., **J. Sévigny** et G. Grondin. 1996. Distribution of the different ATP diphosphohydrolases in pig tissues. 1<sup>st</sup> Int. Workshop on Ecto-ATPases, Mar del Plata, Argentina. Abstract #11.
- 15.\* Kaczmarek, E., K. Koziak, **J. Sévigny**, J.B. Siegel, J. Anrather, A.R. Beaudoin, F.H. Bach et S.C. Robson. 1996. Identification of CD39 as vascular ATP diphosphohydrolase (ATPDase). 1<sup>st</sup> Int. Workshop on Ecto-ATPases, Mar del Plata, Argentina. Abstract #31.
- 16.\* Sévigny, J. et A.R. Beaudoin. 1996. Purification and identification by immunological techniques of three types of mammalian ATP diphosphohydrolases. 1<sup>st</sup> Int. Workshop on Ecto-ATPases, Mar del Plata, Argentina. Abstract #32.
17. **Sévigny, J.**, J. Roy, G. Grondin et A.R. Beaudoin. 1996. Distribution of ATP diphosphohydrolase in pig tissues. 1<sup>st</sup> Int. Workshop on Ecto-ATPases, Mar del Plata, Argentina. Abstract #17.
18. Picher, M., **J. Sévigny**, G. Grondin et A.R. Beaudoin. 1997. Extracellular nucleotides hydrolysis in bovine lungs: Purification and immunolocalisation of the ATP diphosphohydrolase. 40<sup>th</sup> Annual Meeting CFBS (Canadian Federation of Biological Societies), Québec, Qué., Canada.

## **BREVETS DÉPOSÉS AU COURS DE CES ÉTUDES**

\* Titre de l'invention: "ATP Diphosphohydrolases, Process of Purification Thereof".

Inventeurs et détenteurs: Adrien R. Beaudoin et Jean Sévigny.

- Demande de brevet numéro 08/419,204 déposée aux États-Unis le 10 avril 1995; acceptée, en instance de délivrance.
- Demande de brevet numéro 2,148,851 déposée au Canada le 8 mai 1995; en instance de délivrance.

\* Titre de l'invention: "ATP Diphosphohydrolases, Process of Purification Thereof and Process of Producing Thereof by Recombinant Technology".

Inventeurs et détenteurs: Adrien R. Beaudoin et Jean Sévigny.

- Demande de brevet international numéro PCT/CA96/00223 déposée le 10 avril 1996.

\* Titre de l'invention: "Identification of the Amino Acids Involved in the Catalytic Site of the ATP Diphosphohydrolase".

Inventeurs et détenteurs: Adrien R. Beaudoin et Jean Sévigny.

- Demande de brevet provisoire numéro 60/024,854 déposée aux États-Unis au mois d'août 1996.

## BIBLIOGRAPHIE

ABBRACCHIO, M.P., F. CATTABENI, B.B. FREDHOLM et M. WILLIAMS. 1993. Purinoceptor nomenclature: a status report. *Drug Dev. Res.* 28: 207-213.

ABRAHAM, E.H., A.G. PRAT, L. GERWECK, T. SENEVERATNE, R.J. ARCECI, R. KRAMER, G. GUIDOTTI et H.F. CANTIELLO. 1993. The multi-drug resistance (*mdr 1*) gene product functions as an ATP channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 312-316.

AKISAKA, T. et C.V. GAY. 1985. Ultrastructural localization of calcium-activated adenosine triphosphate ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) in growth-plate cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 925-932.

ALLISON, W.S., D.A. BULLOUGH et W.W. ANDREWS. 1986. Identification of essential residues in the F1-ATPases by chemical modification. *Methods Enzymol.* 126: 741-761.

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.

ANDO, T., H. MAYAHARA, K. FUJIMOTO, H. MIYAJIMA et K. OGAWA. 1982. Ultracytochemical localization of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity on the epithelial cells of rat trachea. *Acta Histochem. Cytochem.* 15: 812-826.

ANICH, M., N. FANTA, M. MANCILLA, A.M. KETTLUN, M.A. VALENZUELA et A. TRAVERSO-CORI. 1990. Apyrase activity and changes in metabolites during germination and tuberization of *Solanum Tuberosum*. *Phytochemistry* 29: 1411-1415.

ANOSTARIO, M. Jr., M.L. HARRISON et R.L. GEAHLEN. 1990. Immunochemical detection of adenine nucleotide-binding proteins with antibodies to 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl-adenosine. *Anal. Biochem.* 190: 60-65.

ASAI, T., S. MIURA, L.D. SIBLEY, H. OKABAYASHI et T. TAKEUCHI. 1995. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 270: 11391-11397.

BACH, F.H., S.C. ROBSON, H. WINKLER, C. FERRAN, K.M. STUHLMEIER, C.J. WRIGHTON et W.W. HANCOCK. 1995. Barriers to xenotransplantation. Nat. Med. 1: 869-873.

BACH, F.H., H. WINKLER, C. FERRAN, W.W. HANCOCK et S.C. ROBSON. 1996. Delayed xenograft rejection. Immunol. Today 17: 379-384.

BAER, H.P. et G.I. DRUMMOND. 1968. Catabolism of adenine nucleotides by the isolated perfused rat heart. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127: 33-36.

BAKHLE, Y.S. et R. CHELLIAH. 1983. Effect of streptozotocin-induced diabetes on the metabolism of ADP, AMP and adenosine in the pulmonary circulation of rat isolated lung. Diabetologia 24: 455-459.

BAKKER, W.W., E.J. WILLINK, J. DONGA, C.E. HULSTAERT et M.J. HARDONK. 1987. Antithrombotic activity of glomerular adenosine diphosphatase in the glomerular basement membrane of the rat kidney. J. Lab. Clin. Med. 109: 171-177.

BAKKER, W.W., K. POELSTRA, et M.J. HARDONK. 1993. Relevance of adenine nucleotidases in the glomerular filtration barrier. Nephron 64: 338-342.

BAKKER, W.W., K. POELSTRA, M.A. BARRADAS et D.P. MIKHAILIDIS. 1994. Platelets and ectonucleotidases. Platelets 5: 121-129.

BARTLES, J.R., L.T. BRAITERMAN et A.L. HUBBARD. 1985. Biochemical characterization of domain-specific glycoproteins of the rat hepatocyte plasma membrane. J. Biol. Chem. 260: 12792-12802.

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 (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. Neurochem. Res. 16: 1303-1310.

BAYKOV, A.A., O.A. EVTUSHENKO et S.M. AVAEVA. 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* 171: 266-270.

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. Pp. 273-280 dans *Biology of Normal and Cancerous Exocrine Pancreatic Cells*. Éditeurs: A. Ribet, L. Pradayrol et C. Susini. INSERM Symposium No. 15, North Holland Biomedical Press. Elsevier.

BEAUDOIN, A.R., G. GRONDIN, A. LORD, M. ROBERGE et P. ST-JEAN. 1983. The origin of the zymogen granule membrane of the pancreatic acinar cell as examined by ultrastructural cytochemistry of acid phosphatase, thiamine pyrophosphatase, and ATP-diphosphohydrolase activities. *Eur. J. Cell Biol.* 29: 218-225.

BEAUDOIN, A.R., J. SÉVIGNY et M. PICHER. 1996. ATP-diphosphohydrolases, Apyrases, and Nucleotide Phosphohydrolases: biochemical properties and functions. Pp. 369-401 dans *Biomembranes*. Vol. 5. Éditeur: A.G. Lee. JAI Press Inc. Greenwich, 428 p.

BEAUDOIN, A.R., G. GRONDIN et J. SÉVIGNY. 1997a. Distribution of different ATP diphosphohydrolase isoforms in mammalian organs. Pp. 33-40 dans *Ecto-ATPases: recent progress on structure and function*. Éditeurs: L. Plesner, T.L. Kirley et A.F. Knowles. Plenum Publishing Corporation. New York.

BEAUDOIN, A.R., J. SÉVIGNY, G. GRONDIN, S. DAOUD et F.P. LEVESQUE. 1997b. Purification, characterization and localization of two ATP diphosphohydrolase isoforms in the bovine heart. *Am. J. Physiol.* sous presse.

BELARDINELLI, L., J. LINDEN et R.M. BERNE. 1989. The cardiac effects of adenosine, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 32: 73-97.

- BELARDINELLI, L., J.C. SHRYOCK, Y. SONG, D. WANG et M. SRINIOAS. 1995. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J.* 9: 359-365.
- BENNETT, D.W. et A.N. DRURY. 1931. Further observations relating to the physiological activity of adenine compounds. *J. Physiol.* 72: 288-320.
- BERGFELD, G.R. et T. FORRESTER. 1992. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc. Res.* 26: 40-47.
- BERNE, R.M. 1963. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.* 204: 317-322.
- BERNE, R.M. 1980. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ. Res.* 47: 807-813.
- BEUKERS, M.W., I.M. PIROVANO, A.V. WEERT, C.J.M. KERKHOF, A.P. IJZERMAN et W. SOUDIJN. 1993. Characterization of ecto-ATPase on human blood cells. *Biochem. Pharmacol.* 46: 1959-1956.
- BHARGAVA, T., S. DATTA, V. RAMACHANDRAN, R. RAMAKRISHNAN, R.K. ROY, K. SANKARAN et Y.V.B.K. SUBRAHMANYAM. 1995. Virulent *Shigella* codes for a soluble apyrase: Identification, characterization and cloning of the gene. *Curr. Sci. India* 68: 293-300.
- BINET, L. et M. BURSTEIN. 1950. Poumon et action vasculaire de l'adénosine-triphosphate. (A.T.P.) *Presse Méd.* 58: 1201-1203.
- BOEHM, S., S. HUCK et P. ILLES. 1995. UTP- and ATP-triggered transmitter release from rat sympathetic neurones via separate receptors. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2341-2343.
- BOEYNAEMS, J.-M. et J.D. PEARSON. 1990. P<sub>2</sub> purinoceptors on vascular endothelial cells: physiological significance and transduction mechanisms. *TiPS.* 11: 34-37.



BORN, G.V.R. 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194: 927-929.

BORN, G.V.R. et P.D. RICHARDSON. 1980. Activation time of blood platelets. *J. Membrane Biol.* 57: 87-90.

BORST, M.M. et J. SCHRADER. 1991. Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circ. Res.* 68: 797-806.

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: 248-254.

BRASHEAR, R.E. et J.C. ROSS. 1968. Disappearance of adenosine diphosphate in vivo. *J. Lab. Clin. Med.* 73: 54-59.

BREEZE, R.G. et E.B. WHEELDON. 1977. The cells of the pulmonary airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 116: 705-777.

BUHROW, S.A. et J.V. STAROS. 1985. 5'-*p*-Fluorosulfonylbenzoyl adenosine as a probe of ATP-binding sites in hormone receptor-associated kinases. *Methods Enzymol.* 109: 816-827.

BURGOYNE, R.D. 1984. Mechanisms of secretion from adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta* 779: 201-216.

BURNSTOCK, G. 1971. Neural nomenclature. *Nature* 229: 282-283.

BURNSTOCK, G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24: 510-569.

BURNSTOCK, G. 1990a. Purinergic mechanisms. *Ann. NY Acad. Sci.* 603: 1-18.

BURNSTOCK, G. 1990b. Noradrenaline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves. *Neurochem. Int.* 17: 357-368.

BURNSTOCK, G. 1993. Physiological and pathological roles of purines: an update. *Drug Dev. Res.* 28: 195-206.

BURNSTOCK, G., G. CAMPBELL et M.J. RAND. 1966. The inhibitory innervation of the taenia of the guinea-pig caecum. *J. Physiol. (London)* 182: 504-526.

BURNSTOCK, G., G. CAMPBELL, D.J. SATCHELL et A. SMYTHE. 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.* 40: 668-688.

CANDINAS, D., N. KOYAMADA, T. MIYATAKE, J. SIEGEL, W.W. HANCOCK, F.H. BACH et S.C. ROBSON. 1996. Loss of rat glomerular ATP diphosphohydrolase activity during reperfusion injury is associated with oxidative stress reactions. *Thromb. Haemostasis* 76: 807-812.

CARLETON, J.S., J.L. GORDON, A. HUTCHINGS et J.D. PEARSON. 1979. Secretion and extracellular metabolism of adenine nucleotides by endothelial cells in culture. *J. Physiol.* 291: 40P.

CASTRO, E., J. PINTOR et M.T. MIRAS-PORTUGAL. 1992.  $Ca^{2+}$ -stores mobilization by diadenosine tetraphosphate,  $Ap_4A$ , through a putative  $P_{2Y}$  purinoceptor in adrenal chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* 106: 833-837.

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

CHAMPAGNE, D.E., C.T. SMARTT, J.M.C. RIBEIRO et A.A. JAMES. 1995. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 694-698.

CHELLIAH, R. et Y.S. BAKHLE. 1983. The fate of adenine nucleotides in the pulmonary circulation of isolated lung. *Q. J. Exp. Physiol.* 68: 289-300.

CHOMCZYNSKI, P. et N. SACCHI. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

CHRISTIE, J. et D.G. SATCHELL. 1980. Purine receptors in the trachea: is there a receptor for ATP? *Br. J. Pharmacol.* 70: 512-514.

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.

CLEMENS, M.G. et T. FORRESTER. 1981. Appearance of adenosine triphosphate in the coronary sinus effluent from isolated working rat heart in response to hypoxia. *J. Physiol.* 312: 143-158.

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

COLMAN, R.F. 1983. Affinity labeling of purine nucleotide sites in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 67-91.

COLMAN, R.W. 1990. Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation. *FASEB J.* 4: 1425-1435.

COMMUNI, D., S. PIROTON, M. PARMENTIER et J.M. BOEYNAEMS. 1995. Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 30849-30852.

COMMUNI, D., M. PARMENTIER et J.M. BOEYNAEMS. 1996. Les récepteurs P<sub>2</sub>: une famille en pleine expansion. *Med. Sci.* 12: 614-619.

CONIGRAVE, A.D. et L. JIANG. 1995. Review: Ca<sup>2+</sup>-mobilizing receptors for ATP and UTP. *Cell Calcium* 17: 111-119.

COOPER, D.R., G.P. LEWIS, G.E. LIEBERMAN, H. WEBB et J. WESTWICK. 1979. ADP metabolism in vascular tissue, a possible thrombo-regulatory mechanism. *Thromb. Res.* 14: 901-914.

CÔTÉ, Y.P. 1993. Caractérisation de l'ATP diphosphohydrolase de l'aorte de boeuf. Thèse de doctorat. Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 215 p.

CÔTÉ, Y.P., M. PICHER, P. ST-JEAN, R. BÉLIVEAU, M. POTIER 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.

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

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

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

CRUTCHLEY, D.J., T.E. ELING et M.W. ANDERSON. 1978. ADPase activity of isolated perfused rat lung. *Life Sci.* 22: 1413-1420.

CRUTCHLEY, D.J., U.S. RYAN et J.W. RYAN. 1980. Effects of aspirin and dipyridamole on the degradation of adenosine diphosphate by cultured cells derived from bovine pulmonary artery. *J. Clin. Invest.* 66: 29-35.

CUPP, M.S., E.W. CUPP et F.B. RAMBERG. 1993. Salivary gland apyrase in black flies (*Simulium vittatum*). *J. Insect Physiol.* 39: 817-821.

CUPP, M.S., E.W. CUPP, J.O. OCHOA-A et J.K. MOULTON. 1995. Salivary apyrase in New World blackflies (Diptera: Simuliidae) and its relationship to onchocerciasis vector status. *Med. Vet. Entomol.* 9: 325-330.

CURDOVA, E., V. JECHOVA et Z. HOSTALEK. 1982. Properties of apyrase and inorganic pyrophosphatase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol.* 27: 159-166.

CUSAK, N.J., J.D. PEARSON et J.L. GORDON. 1983. Stereoselectivity of ecto-nucleotidases on vascular endothelial cells. *Biochem. J.* 214: 975-981.

D'SOUZA, L. et H.I. GLUECK. 1977. Measurement of nucleotide pools in platelets using high pressure liquid chromatography. *Thromb. Haemostasis* 38: 990-1001.

DAVIS, C.W., M.L. DOWELL, M. LETHEM et M. VAN HOUTTE. 1992. Goblet cell degranulation in isolated canine tracheal epithelium: response to exogenous ATP, ADP and adenosine. *Am. J. Physiol.* 262: C1313-C1323.

DEL CAMPO, G., J. PUENTE, M.A. VALENZUELA, A. TRAVERSO-CORI et O. CORI. 1977. Hydrolysis of synthetic pyrophosphoric esters by an isoenzyme of apyrase from *Solanum Tuberosum*. *Biochem. J.* 167: 525-529.

DEMEY, J.G. et P.M. VANHOUTTE. 1981. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J. Physiol.* 316: 347-355.

DE-PIERRE, J.W. et M.L. KARNOVSKY. 1973. Plasma membranes of mammalian cells: a review of methods for their characterization and isolation. *J. Cell Biol.* 56: 275-303.

DOMBROWSKI, K.E., Y. KE, L.F. THOMPSON et J.A. KAPP. 1995. Antigen recognition by CTL is dependant upon ectoATPase activity. *J. Immunol.* 154: 6227-6237.

DOMBROWSKI, K.E., J.M. TREVILLYAN, J.C. CONE, Y. LU et C.A. PHILLIPS. 1993. Identification and partial characterization of an ectoATPase expressed by human natural killer cells. *Biochemistry* 32: 6515-6522.

DOSNE, A.M., C. LEGRAND, E. BAUVOIS, E. BODEVIN et J.P. CAEN. 1978. Comparative degradation of adenylnucleotides by cultured endothelial cells and fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85: 183-189.

DUBYAK, G.R. et J.S. FEDAN (Éditeurs). 1990. Biological actions of extracellular ATP. *Ann. NY Acad. Sci.* 603, 542 p.

DUBYAK, G.R. et C. EL-MOATASSIM. 1993. Signal transduction via P<sub>2</sub>-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* 265: C577-C606.

DUENSING, S., H. KIRSHNER et J. ATZPODIEN. 1994. CD39 as a novel marker of in vivo immune activation. *Blood* 83: 3826-3827.

DRURY, A.N. et A. SZENT-GYÖRGYI. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol. (London)* 68: 213-237.

EDWARDS, F.A., A.J. GIBB et D. COLQUHOUN. 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359: 144-147.

ELLSWORTH, M.L., T. FORRESTER, C.G. ELLIS et H.H. DIETRICH. 1995. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am. J. Physiol.* 269: H2155-H2161.

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

EMMS, H. et G.P. LEWIS. 1982. The anatomical distribution of ADPase activity in the rabbit aorta. *Artery* 10: 150-158.

ENGLEHARDT, W. 1957. Enzymes as structural elements of physiological mechanism. *Proc. Int. Symp. Enzym. Chem.* 2: 163-166.

ESPINOSA, V., M. GALLEGUILLOS, M. MANCILLA, J. GARRIDO, A.M. KETTLUN, L. COLLADOS, L. CHAYET, L. GARCIA, A. TRAVERSO-CORI et M.A. VALENZUELA. 1996. ATP diphosphohydrolase activity in rat heart tissue. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39: 905-915.

EVANS, R.J., V. DERKACH et A. SURPRENANT. 1992. ATP mediated fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357: 503-505.

FANTA, N., M. ANICH, M. MANCILLA, A.M. KETTLUN, M.A. VALENZUELA et A. TRAVERSO-CORI. 1988. Starch, adenine nucleotides and apyrase changes during potato tuber development. *Arch. Biol. Med. Exp.* 21: 129-133.

FARMER, J.B. et D.G. FARRAR. 1976. Pharmacological studies with adenine, adenosine and some phosphorylated derivatives on guinea-pig tracheal muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 28: 748-752.

FEDAN, J.S., J.J. BELT, L.-X. YUAN et D.G. FRAZER. 1992. Relaxant effects of nucleotides in guinea pig isolated, perfused trachea: lack of involvement of prostanoids, Cl<sup>-</sup> channels and adenosine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 217-220.

FERREIRA, S.T., E.G. VASCONCELOS et S. VERJOVSKI-ALMEIDA. 1995. The ecto-ATPases of endoparasites and of blood cells and vessels. *Ciência e Cultura (J. Braz. Asso. Adv. Sci.)* 47: 151-166.

FILIPPINI, A., R.E. TAFFS, T. AGUI et M.V. SITKOVSKY. 1990a. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 265: 334-340.

FILIPPINI, A., R.E. TAFFS et M.V. SITKOVSKY. 1990b. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: Possible role in effector functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8267-8271.

FLODGAARD, H. et H. KLENOW. 1982. Abundant amounts of diadenosine 5',5'''-P<sub>1</sub>P<sub>4</sub>-tetrphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets. *Biochem. J.* 208: 737-742.

FORRESTER, T. et A.R. LIND. 1969. Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before during and after sustained contractions. *J. Physiol.* 204: 347-364.

FORRESTER, T. et C.A. WILLIAMS. 1977. Release of adenosine triphosphate from isolated adult heart cells in response to hypoxia. *J. Physiol.* 268: 371-390.

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

FREDHOLM, B.B. et P. HEDQUIST. 1980. Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. *Biochem. Pharmacol.* 29: 1635-1643.

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

GACHET, C. et J.P. CAZENAVE. 1991. ADP induced blood platelet activation: a review. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 33: 347-358.

GARFIN, D.E. 1990. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 182: 425-441.

GAUTHIER, B. 1987. Phosphohydrolases du pancréas, production d'anticorps monoclonaux de l'ATP-diphosphohydrolase. Mémoire de maîtrise. Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 175 p.

GELADOPOULOS, T.P., T.G. SOTIROUDIS et A.E. EVANGELOPOULOS. 1991. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal. Biochem.* 192: 112-116.

GILFILLAN, A.M. et S.A. ROONEY. 1988. Functional evidence for involvement of P<sub>2</sub> purinoceptors in the ATP stimulation of phosphatidylcholine secretion in type II alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 959: 31-37.

GLASGOW, J.G., R. SCHADE et F.A. PITLICK. 1978. Evidence that ADP hydrolysis by human cells is related to thrombogenic potential. *Thromb. Res.* 13: 255-266.

GORDON, E.L., J.D. PEARSON et L.L. SLAKEY. 1986. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by cultured endothelial cells from pig aorta. *J. Biol. Chem.* 261: 15496-15504.

GORDON, E.L., J.D. PEARSON, E.S. DICKINSON, D. MOREAU et L.L. SLAKEY. 1989. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 264: 18986-18995.



GORDON, J.L. 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233: 309-319.

GORDON, J.L. 1990. The effects of ATP on endothelium. *Ann. NY Acad. Sci.* 603: 46-51.

GRIESE, M., L.I. GOBRAN, J.S. DOUGLAS et S.A. ROONEY. 1991. Adenosine A<sub>2</sub>-receptor-mediated phosphatidylcholine secretion in type II pneumocytes. *Am. J. Physiol.* 260: L52-L60.

GURANOWSKI, A., E. STARZYNSKA, M. RATAJ-GURANOWSKA et M.A. GÜNTHER SILLERO. 1991. Purification of apyrase from yellow Lupin cotyledons after extraction with perchloric acid. *Protein Expres. Purif.* 2: 235-239.

HANDA, M. et G. GUIDOTTI. 1996. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 916-923.

HARLOW, E. et D. LANE. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Éditeur: E. Harlow. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 726 p.

HARRISON, D.G. 1992. The endothelial cell. *Heart Dis. Stroke* 1: 95-99.

HAYES, L.W., C.A. GOGUEN, A.L. STEVENS, W.W. MAGARGAL et L.L. SLAKEY. 1979. Enzyme activities in endothelial cells and smooth muscle cells from swine aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2532-2535.

HILDERMAN, R.H., M. MARTIN, J.K. ZIMMERMAN et E.B. PIVORUN. 1991. Identification of a unique membrane receptor for adenosine 5',5'''-P<sub>1</sub>,P<sub>4</sub>-tetraphosphate. *J. Biol. Chem.* 266: 6915-6918.

HILLARP, N.A. 1958. The release of catechol amines from the amine containing granules of adrenal medulla. *Acta Physiol. Scand.* 43: 292-302.

HOCHSTRASSER, D.F., A. PATCHORNIK et C.R. MERRIL. 1988. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Anal. Biochem.* 173: 412-423.

HOLGATE, S.T., J.P. FINNERTY et R. POLOSA. 1990. Mechanisms of purine-induced bronchoconstriction in asthma. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 303: 122-131.

HOLMSEN, H. et H.J. WEISS. 1979. Secretable storage pools in platelets. *Ann. Rev. Med.* 30: 119-134.

ISHIKAWA, H., T. TAMIYA, T. TSUCHIYA et J.J. MATSUMOTO. 1984. A novel ATP-ADPase from *Mimosa pulvinius*. *Comp. Bioch. Physiol.* 78B: 59-61.

JONES, T.R., N.M. LEFCOE et J.T.R. HAMILTON. 1980. Pharmacological study of adenosine and related compounds on isolated guinea pig trachea: evidence for more than one type of purine receptor. *Can. J. Physiol. Pharm.* 58: 1356-1365.

JORGENSEN, S. 1956. Breakdown of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleotides in human plasma. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 12: 294-303.

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.

KACZMAREK, E., J.B. SIEGEL, J. SÉVIGNY, K. KOZIAK, W.W. HANCOCK, A.R. BEAUDOIN, F.H. BACH et S.C. ROBSON. 1997. Vascular ATP diphosphohydrolase (CD39/ATPDase). Pp. 171-185 dans *Ecto-ATPases: recent progress on structure and function*. Éditeurs: L. Plesner, T.L. Kirley et A.F. Knowles. Plenum Publishing Corporation. New York.

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

KANSAS, G.S., G.S. WOOD et T.F. TEDDER. 1991. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39: Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J. Immunol.* 146: 2235-2244.

KARASAKI, S., A. SIMARD et G. DE LAMIRANDE. 1977. Surface morphology and nucleoside phosphatase activity of rat liver epithelial cells during oncogenic transformation in vitro. *Cancer Res.* 37: 3516-3525.

- KATSURAGI, T., T. TOKUNAGA, S. OGAWA, O. SOEJIMA, C. SATO et T. FURUKAWA. 1991. Existence of ATP-evoked ATP release system in smooth muscles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 513-518.
- KAUL, S., R.C. PADGETT et D.D. HEISTAD. 1994. Role of platelets and leukocytes in modulation of vascular tone. *Ann. NY Acad. Sci.* 714: 122-135.
- KENNEDY, C. et A. IJZERMAN. 1994. Adenosine and ATP - From receptor structure to clinical applications. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 311-312.
- KENNEDY, C., D. DELBRO et G. BURNSTOCK. 1985. P<sub>2</sub>-purinoceptors mediate both vasodilation (via the endothelium) and vasoconstriction of the isolated rat femoral artery. *Eur. J. Pharmacol.* 107: 161-168.
- KETTLUN, A.M., L. URIBE, V. CALVO, S. SILVA, J. RIVERA, M. MANCILLA, M.A. VALENZUELA et A. TRAVERSO-CORI. 1982. Properties of two apyrases from *Solanum Tuberosum*. *Phytochemistry* 21: 551-558.
- 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.
- KIM, K.C. et B.C. LEE. 1991. P<sub>2</sub>-purinoceptor regulation of mucin release by airway goblet cells in primary culture. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1053-1056.
- KINZEL, V., D. KÜBLER, E. BUROW et W. PYERIN. 1986. Detection and biochemistry of cell surface protein kinase. Pp. 179-204 dans *Cellular biology of ectoenzymes*. Éditeurs: G.W. Kreutzberg, M. Reddington et H. Zimmermann. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 330 p.
- KIRLEY, T.L. 1997. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase: homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J. Biol. Chem.* 272: 1076-1081.

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. Commun.* 207: 529-535.

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

KNOWLES, M.R., L.L. CLARKE et R.C. BOUCHER. 1991. Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 325: 533-538.

KOYAMADA, N., T. MIYATAKE, D. CANDINAS, P. HECHENLEITNER, J. SIEGEL, W.W. HANCOCK, F.H. BACH et S.C. ROBSON. 1996. *Transplantation* 62: 1739-1743.

KÜBLER, D., W. PYERIN et V. KINZEL. 1982. Protein kinase activity and substrates at the surface of intact HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 257: 322-329.

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

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

LAW, J.H., J.M.C. RIBEIRO et M.A. WELLS. 1992. Biochemical insights derived from insect diversity. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 87-111.

LEAKE, D.S., G.E. LIEBERMAN et T.J. PETERS. 1983. Properties and subcellular localization of adenosine diphosphatase in arterial smooth muscle cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 762: 52-57.

LEBEL, D. et M. BEATTIE. 1986. Identification of the catalytic subunit of the ATP diphosphohydrolase by photoaffinity labeling of high-affinity ATP-binding sites of pancreatic zymogen granule membrane with 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . *Biochem. Cell Biol.* 64: 13-20.

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 pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 255: 1227-1233.

LEE, C., A. LEVIN et D. BRANTON. 1987. Copper staining: A five-minutes stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 166: 308-312.

LEMMENS, R., L. VANDUFFEL, H. TEUCHY et O. CULIC. 1996. Regulation of proliferation of LLC-MK2 cells by nucleosides and nucleotides: the role of ecto-enzymes. *Biochem. J.* 316: 551-557.

LIEBERMAN, G.E., G.P. LEWIS et T.J. PETERS. 1977. A membrane-bound enzyme in rabbit aorta capable of inhibiting adenosine-diphosphate-induced platelet aggregation. *Lancet* ii: 330-332.

LIEBERMAN, G.E., D.S. LEAKE et T.J. PETERS. 1982. Subcellular localization of adenosine diphosphatase in cultured pig arterial endothelial cells. *Thromb. Haemostasis* 47: 249-253.

LIN, S.-H. et J.N. FAIN. 1984. Purification of  $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$  from rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259: 3016-3020.

LIN, S.-H. et W.E. RUSSELL. 1988. Two  $\text{Ca}^{2+}$ -dependant ATPases in rat liver plasma membrane. The previously purified  $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$  is not a  $\text{Ca}^{2+}$ -pump but an ecto-ATPase. *J. Biol. Chem.* 263: 12253-12258.

LIN, S.-H. et G. GUIDOTTI. 1989. Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. *J. Biol. Chem.* 264: 14408-14414.

LLOYD, H.G.E. et T.W. STONE. 1983. A different time course of purine release from rat brain slices and synaptosomes. *Proc. Physiol. Soc.* 57 p.

LOLLAR, P. et W.G. OWEN. 1981. Active-site-dependent, thrombin-induced release of adenine nucleotides from cultured human endothelial cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 370: 51-56.

LOW, E.S., R.B. LOW et G.M. GREEN. 1977. Correlated effects of cigarette smoke components on alveolar macrophage adenosine triphosphatase activity and phagocytosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115: 963-970.

LUNDBLAD, K.A.L., J.-A. KARLSSON et C.G.A. PERSSON. 1984. Effects of nucleosides and nucleotides on tracheal tone. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 55: 260-262.

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

LÜTHJE, J. et A. OGILVIE. 1983. The presence of diadenosine 5',5'''-P<sub>1</sub>,P<sub>3</sub>-triphosphate (Ap<sub>3</sub>A) in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 253-260.

LÜTHJE, J. et A. OGILVIE. 1988. Catabolism of Ap<sub>4</sub>A and Ap<sub>3</sub>A in whole blood: The dinucleotides are long-lived signal molecules in the blood ending up as intracellular ATP in the erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 173: 241-245.

LUZIO, J.P., E.M. BAILYES, M. BARON, K. SIDDLE, B.M. MULLOCK, H.J. GEUZE et K.K. STANLEY. 1986. The properties, structure, function, intracellular localisation and movement of hepatic 5'-nucleotidase. Pp. 89-116 dans *Cellular biology of ectoenzymes*. Éditeurs: G.W. Kreutzberg, M. Reddington et H. Zimmermann. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 330 p.

MALISZEWSKI, C.R., G.J.T. DELESPESE, M.A. SCHOENBORN, R.J. ARMITAGE, W.C. FANSLOW, T. NAKAJIMA, E. BAKER, G.R. SUTHERLAND, K. POINDEXTER, C. BIRKS, A. ALPERT, D. FRIEND, S.D. GIMPEL et R.B. GAYLE III. 1994. The CD39 lymphoid cell activation antigen: Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* 153: 3574-3583.

MANCILLA, M., M.A. VALENZUELA, M. ANICH, A.M. KETTLUN, O. JARA et A. TRAVERSO-CORI. 1987. Identification of an apyrase activating protein and of calmodulin in *Solanum Tuberosum*. *Phytochemistry* 26: 2471-2474.

MARCUS, A.J. 1996. Platelets and their disorders. Pp. 79-137 dans *Disorders of Hemostasis*. Éditeurs: O.D. Ratnoff et C.D. Forbes. W.B. Saunders, Philadelphia.

MARCUS, A.J. et L.B. SAFIER. 1993. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J.* 7: 516-522.

MARCUS, A.J., M.J. BROEKMAN, J.H.F. DROSOPOULOS, N. ISLAM, T.N. ALYONYCHEVA, L.B. SAFIER, K.A. HAJJAR, D.N. POSNETT, M.A. SCHOENBORN, K.A. SCHOOLEY, R.B. GAYLE et C.R. MALISZEWSKI. 1997. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J. Clin. Invest.* 99: 1351-1360.

MARQUARDT, D.L., H.E. GRUBER et S.I. WASSERMAN. 1984. Adenosine release from stimulated mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6192-6196.

MASON, S.J., A.M. PARADISO et R.C. BOUCHER. 1991. Regulation of trans-epithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1649-1656.

MAZELIS, M. 1959. Enzymatic degradation of adenosine triphosphate to adenine by cabbage leaf preparations. *Plant Physiol.* 34: 153-158.

MEGHJI, P., J.D. PEARSON et L.L. SLAKEY. 1992. Regulation of extracellular adenosine production by ectonucleotidases of adult rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 263: H40-H47.

MEGHJI, P., J.D. PEARSON et L.L. SLAKEY. 1995. Kinetics of extracellular ATP hydrolysis by microvascular endothelial cells from rat heart. *Biochem. J.* 308: 725-731.

MERRIL, C.R. 1990. Gel-staining techniques. *Methods Enzymol.* 182: 477-488.

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

MILLER, R.T. et C. ESTRAN. 1995. Heat-induced epitope retrieval with a pressure cooker. *Appl. Immunohistochemistry* 3: 190-193.

MILNER, P., P. BODIN, A. LOESCH et G. BURNSTOCK. 1990a. Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 170: 649-656.

MILNER, P., P. BODIN, A. LOESCH et G. BURNSTOCK. 1990b. Increased shear stress leads to differential release of endothelin and ATP from isolated endothelial cells from 4- and 12-month-old male rabbit aorta. *J. Vasc. Res.* 29: 420-425.

MILNOR, W.R. 1990. Pulmonary circulation. Pp. 357-386 dans *Cardiovascular Physiology*. University Press. Oxford.

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

MONCADA, S., R.M.J. PALMER et A. HIGGS. 1988. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12: 365-372.

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

MOTTE, S., D. COMMUNI, S. PIROTON et J.-M. BOEYNAEMS. 1995. Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 1-7.

MYERS, L.K. et E. KANG. 1990. Modulation of natural killer cell activity by surface phosphorylation reactions. *Exp. Cell Res.* 187: 270-276.



NAGY, A.K., T.A. SHUSTER et A.V. DELGADO-ESCUETA. 1986. Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: identification and enzymatic characterization. *J. Neurochem.* 47: 976-986.

NEEDHAM, L., N.J. CUSACK, J.D. PEARSON et J.L. GORDON. 1987. Characteristics of the P purinoceptor that mediates endothelial prostacyclin production by pig aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 134: 199-209.

NGUYEN, T., L. ERB, G.A. WEISMAN, A. MARCHESE, H.H.Q. HENG, R.C. GARRAD, S.R. GEORGE, J.T. TURNER et B.F. O'DOWD. 1996. Cloning, expression and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene. *J. Biol. Chem.* 270: 30845-30848.

NIEWIAROWSKI, S. et D.P. THOMAS. 1969. Platelet factor 4 and adenosine diphosphate release during human platelet aggregation. *Nature* 222: 1269-70.

O'BRIEN, W.F., R.A. KNUPPEL, H.I. SABA, J.L. ANGEL, R. BENOIT et A. BRUCE. 1987. Platelet inhibitory activity in placentas from normal and abnormal pregnancies. *Obstet. Gynecol.* 70: 597-600.

O'CONNOR, S.E. 1992. Recent developments in the classification and functional significance of receptors for ATP and UTP, evidence for nucleotide receptors. *Life Sci.* 50: 1657-1664.

OCHS, D. 1983. Protein contaminants of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 135: 470-474.

OLSSON, R.A. et J.D. PEARSON. 1990. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol. Rev.* 70: 761-845.

PADDLE, B.M. et G. BURNSTOCK. 1974. Release of ATP from perfused heart during coronary vasodilation. *Blood Vessels* 11: 110-119.

PALMER, R.M.J., A.G. FERRIGE et S. MONCADA. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.

PALMER, R.M.J., D.S. ASTON et S. MONCADA. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.

PAPAMARCAKI, T. et O. TSOLAS. 1990. Identification of ATP diphosphohydrolase activity in human term placenta using a novel assay for AMP. *Mol. Cell. Biochem.* 97: 1-8.

PÂQUET, M.R., P. ST-JEAN, M. ROBERGE et A.R. BEAUDOIN. 1982. Isolation of zymogen granules from rat pancreas and characterization of their membrane proteins. *Eur. J. Cell. Biol.* 28: 20-26.

PEARSON, J.D. 1985. Ectonucleotidases: Measurement of activities and use of inhibitors. *Methods Pharmacol.* 6: 83-107.

PEARSON, J.D. 1988. Purine nucleotides as regulators of vessel tone. *Biochem. Soc. Trans.* 16: 480-482.

PEARSON, J.D. et J.L. GORDON. 1979. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature* 281: 384-386.

PEARSON, J.D. et J.L. GORDON. 1985. Nucleotide metabolism by endothelium. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 617-627.

PEARSON, J.D., J.S. 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.

PEARSON, J.D., S.B. COADE et N.J. CUSACK. 1985. Characterization of ectonucleotidases on vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* 230: 503-507.

PÉREZ de LEÓN, A.A. et W.J. TABACHNICK. 1996. Apyrase activity and adenosine diphosphate induced platelet aggregation inhibition by the salivary gland proteins of *Culicoides variipennis*, the North American vector of bluetongue viruses. *Vet. Parasitol.* 61: 327-338.

PHILLIPS, J.H. et J.G. PRYDE. 1987. The chromaffin granule: A model system for the study of hormones and neurotransmitters. *Ann. NY Acad. Sci.* 493: 27-40.

PICHER, M. 1995. Caractérisation des ATP-diphosphohydrolases du système respiratoire des mammifères. Thèse de doctorat. Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 190 p.

PICHER, M., Y.P. CÔTÉ, R. BÉLIVEAU, M. POTIER et A.R. BEAUDOIN. 1993. Demonstration of a novel type of ATP-diphosphohydrolase (E.C.3.6.1.5) in the bovine lung. *J. Biol. Chem.* 268: 4699-4703.

PICHER, M., R. BÉLIVEAU, M. POTIER, D. SAVARIA, É. ROUSSEAU et A.R. BEAUDOIN. 1994. Demonstration of an ectoATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in non-vascular smooth muscles of the bovine trachea. *Biochim. Biophys. Acta* 1200: 167-174.

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. ARANDA, L. COLLADOS et A. TRAVERSO-CORI. 1991. ATPase-ADPase activities of rat placental tissue. *Comp. Biochem. Biophys.* 100B: 281-285.

PIROTTON, S., O. FALSON-BOUTHERIN, B. ROBAYE et J.-M. BOEYNAEMS. 1992. Ecto-phosphorylation on aortic endothelial cells. Exquisite sensitivity to staurosporine. *Biochem. J.* 285: 585-591.

PLATT, J.L. et F.H. BACH. 1991. The barrier to xenotransplantation. *Transplantation* 52: 937-947.

PLESNER, L. 1995. Ecto-ATPases: Identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158: 141-214.

POELSTRA, K., J.F.W. BALLER, M.J. HARDONK et W.W. BAKKER. 1991. Demonstration of antithrombotic activity of glomerular adenosine diphosphatase. *Blood* 78: 141-148.

POELSTRA, K., E.R. HEYNEN, J.F.W. BALLER, M.J. HARDONK et W.W. BAKKER. 1992. Modulation of anti-Thy1 nephritis in the rat by adenine

- nucleotides: Evidence for an anti-inflammatory role for nucleotidases. *Lab. Invest.* 66: 555-563.
- PRATT, A.D., G. CLANCY et M.J. WELSH. 1986. Mucosal adenosine stimulates chloride secretion in canine tracheal epithelium. *Am. J. Physiol.* 251: C167-C174.
- PREISSNER, K.T. 1988. Anticoagulant potential of endothelial cell membrane components. *Haemostasis* 18: 271-300.
- RALEVIC, V., P. MILNER, K.A. KIRKPATRICK et G. BURNSTOCK. 1992. Flow-induced release of adenosine 5'-triphosphate from endothelial cells of the rat mesenteric arterial bed. *Experientia* 48: 31-34.
- RIBEIRO, J.M.C. 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 463-478.
- RIBEIRO, J.M.C. et E.S. GARCIA. 1980. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 26: 303-307.
- RIBEIRO, J.M.C. et E.S. GARCIA. 1981. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia* 37: 384-386.
- RIBEIRO, J.M.C., J.J.F. SARKIS, P.A. ROSSIGNOL et A. SPIELMAN. 1984a. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 81-86.
- RIBEIRO, J.M.C., P.A. ROSSIGNOL et A. SPIELMAN. 1984b. Role of mosquito saliva in blood vessel location. *J. Exp. Biol.* 108: 1-7.
- RIBEIRO, J.M.C., P.A. ROSSIGNOL et A. SPIELMAN. 1985a. Salivary gland apyrase determines probing time in anopheline mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 31: 689-692.
- RIBEIRO, J.M.C., G.T. MAKOUL, J. LEVINE, D.R. ROBINSON et A. SPIELMAN. 1985b. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the salivary of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* 161: 332-344.

RIBEIRO, J.M.C., P.A. ROSSIGNOL et A. SPIELMAN. 1986. Blood-finding strategy of a capillary feeding sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83A: 683-686.

RIBEIRO, J.M.C., G.B. MODI et R.B. TESH. 1989. Salivary apyrase activity of some Old World phlebotomine sand flies. *Insect Biochem.* 19: 409-412.

RIBEIRO, J.M.C., J.A. VAUGHAN et A.F. AZAD. 1990. Characterization of the salivary apyrase activity of three rodent flea species. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 215-219.

RIBEIRO, J.M.C., T.M. ENDRIS et R. ENDRIS. 1991. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A: 109-112.

RICE, W.R. 1990. Effect of extracellular ATP on surfactant secretion. *Ann. NY Acad. Sci.* 603: 64-75.

RICE, W.R. et F.M. SINGLETON. 1986. P<sub>2</sub>-purinoceptors regulate surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells. *Br. J. Pharmacol.* 89: 485-491.

RIGBI, M., H. LEVY, F. IRAQUI, M. TEITELBAUM, M. OREVI, A. ALAJOUTSIJÄRVI, A. HOROWITZ et R. GALUN. 1987. The saliva of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. I. Biochemical characterization of the high molecular weight fraction. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 567-573.

ROBSON, S.C., D. CANDINAS, J.B. SIEGEL, C. KOPP, M. MILLAN, W.W. HANCOCK et F.H. BACH. 1996. Potential mechanism of abnormal thromboregulation in xenograft rejection: loss of ecto-ATPases upon endothelial cell activation. *Transplant. Proc.* 28: 536.

RONZIO, R.A., K.E. KRONQUIST, D.S. LEWIS, R.J. MACDONALD, S.H. MOHRLOK et J.J. O'DONNELL Jr. 1978. Glycoprotein synthesis in the adult rat pancreas. IV. Subcellular distribution of membrane glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 508: 65-84.

ROONEY, S.A. 1989. Type II cell purinoceptors and surfactant secretion. *Prog. Resp. Res.* 25: 127-135.

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

SAAVEDRA, S. et R. RENAUD. 1975. Studies on reactivated cilia. I. The utilization of various nucleoside triphosphates during ciliary movement. *Exp. Cell Res.* 90: 439-443.

SABOLIC, I., C.M. HERAKKRAMBERGER, D. BROWN et G. BURCKHARDT. 1996. Ecto-ATPase activity and labeling with the anti-ecto-ATPase antibody in renal brush border do not coincide. *Am. J. Physiol.* 40: F1100-F1101.

SADLER, J.E., T.A. BEYER, C.L. OPPENHEIMER, J.C. PAULSON, J.P. PRIEELS, J.I. REARICK et R.L. HILL. 1982. Purification of mammalian glycosyltransferases. *Methods Enzymol.* 83: 458-514.

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

SARKIS, J.J.F., J.A. GUIMARAES et J.M.C. RIBEIRO. 1986. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*: Kinetics and purification. *Biochem. J.* 233: 885-891.

SARKIS, J.J.F. et C. SALTO. 1991. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26: 871-876.

SARKIS, J.J.F., A.M.O. BATTASTINI, E.M. OLIVEIRA, S.S. FRASSETTO et R.D. DIAS. 1995. ATP diphosphohydrolase: an overview. *Ciência e Cultura (J. Braz. Asso. Adv. Sci.)* 47: 131-136.

SAUVÉ, R., R.L. PARENT, C. SIMONEAU et G. ROY. 1988. External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent  $K^+$  channel in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pfluegers Arch.* 412: 469-481.

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

SCHAFFNER, W. et C. WEISSMAN. 1973. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* 56: 502-514.

SCHMID-SCHËNBEIN, H., R. WELLS et J. GOLDSTONE. 1969. Influence of deformability of human red cells upon blood viscosity. *Circ. Res.* 25: 131-143.

SCHOLZ, K.P. et R.J. MILLER. 1991. Analysis of adenosine actions on  $Ca^{2+}$  currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *J. Physiol. (London)* 435: 373-393.

SEDAA, K.O., R.A. BJUR, K. SHINOZUKA et D.P. WESTFALL. 1990. Nerve and drug-induced release of adenine nucleosides and nucleotides from rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252: 1060-1067.

SEIFERT, R. et G. SCHULTZ. 1989. Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracyl nucleotides. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 365-369.

SÉVIGNY, J. et A.R. BEAUDOIN. 1994. Le monde des nucléotides extracellulaires. *Med. Sci.* 10: 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., J. ROY, G. GRONDIN et A.R. BEAUDOIN. 1996. Distribution of ATP diphosphohydrolase in pig tissues. 1<sup>st</sup> Int. Workshop on Ecto-ATPases, Mar del Plata, Argentina. Abstract #17.

SÉVIGNY, J., F.P. LEVESQUE, G. GRONDIN et A.R. BEAUDOIN. 1997a. Purification of the 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 the ATP diphosphohydrolase in bovine lungs. *Am. J. Physiol.* sous presse.

SÉVIGNY, J., F. DUMAS et A.R. BEAUDOIN. 1997c. Purification and identification by immunological techniques of different isoforms of mammalian ATP diphosphohydrolases. Pp. 143-151 dans *Ecto-ATPases: recent progress on structure and function*. Éditeurs: L. Plesner, T.L. Kirley et A.F. Knowles. Plenum Publishing Corporation. New York.

SLAKEY, L.L., J.D. EARLS, D. GUZEK et E.L. GORDON. 1986. Regulation of the hydrolysis of adenine nucleotides at the surface of cultured vascular cells. Pp. 27-34 dans *Cellular biology of ectoenzymes*. Éditeurs: G.W. Kreutzberg, M. Reddington et H. Zimmermann. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 330 p.

SMITH, J.J.B., R.A. CORNISH et J. WILKES. 1980. Properties of a calcium-dependent apyrase in the saliva of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Experientia* 36: 898-899.

SMITH, U. et J.W. RYAN. 1972. Pulmonary endothelial cells and the metabolism of adenine. Nucleotides, kinins and angiotensin I. *Adv. Exp. Med. Biol.* 21: 267-276.

SNEDDON, P. et G. BURNSTOCK. 1984. Inhibition of excitatory junction potentials in guinea pig vas deferens by  $\alpha$ - $\beta$ -methylene-ATP: Further evidence for ATP and noradrenaline as cotransmitters. *Eur. J. Pharmacol.* 100: 85-90.

STEINBERG, T.H. et S.C. SILVERSTEIN. 1987. Extracellular ATP<sup>4-</sup> promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 262: 3118-3122.

STILES, G.L. 1992. Adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 267: 6451-6454.

STONE, T.W. 1991. Receptors for adenosine and adenine nucleotides. *Gen. Pharmac.* 22: 25-31.



STOUT, J.G. et T.L. KIRLEY. 1994. Purification and characterization of the ecto-Mg-ATPase of chicken gizzard smooth muscle. *J. Biochem. Biophys. Methods* 29: 61-75.

STROBEL, R. 1992. Purification and immunochemical characterization of ecto-ATP diphosphohydrolase from chicken oviduct and liver. Thèse de doctorat. Université du Minnesota. Minnesota, 180 p.

STROBEL, R. et M. ROSENBERG. 1992. Immunoaffinity chromatographic purification of chicken ectoATP diphosphohydrolase. *Ann. NY Acad. Sci.* 671: 487-489.

STROBEL, R.S., A.K. NAGY, A.F. KNOWLES, J. BUEGEL et M.D. ROSENBERG. 1996. Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase: Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 271: 16323-16331.

STUTTS, M.J., T.C. CHINET, S.J. MASON, J.M. FULLTON, L.L. CLARKE et R.C. BOUCHER. 1992. Regulation of Cl<sup>-</sup> channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by extracellular ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1621-1625.

TAM, J.P. 1988. Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5409-5413.

TAMAOKI, J., M. KONDO et T. TAKIZAWA. 1989. Adenosine-mediated cyclic AMP-dependent inhibition of ciliary activity in rabbit tracheal epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 441-445.

THOMAS, T.C. et M.G. MCNAMEE. 1990. Purification of membrane proteins. *Methods Enzymol.* 182: 499-520.

TIO, T., L. COSICO, A. TAYAG et D. WARBURTON. 1990. Inhibitory regulation of surfactant by an A<sub>1</sub> adenisnergic pathway in rat type II pneumocytes. *Pediatr. Res.* 27: 65A.

TOGNOLI, L. et E. MARRÈ. 1981. Purification and characterization of a divalent cation-activated ATP-ADPase from pea stem microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 642: 1-14.

TOPOL, E.J. et E.F. PLOW. 1993. Clinical trials of platelet receptor inhibitors. *Thromb. Haemostasis* 70: 94-98.

TOWBIN, H., T. STAHELIN et J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.

TRAMS, E.G. et C.J. LAUTER. 1978. A comparative study of brain  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. *Comp. Biochem. Physiol.* 59B: 191-194.

TRAMS, E.G., H. KAUFMANN et G. BURNSTOCK. 1980. A proposal for the role of ecto-enzymes and adenylates in traumatic shock. *J. Theor. Biol.* 87: 609-621.

TRAVERSO-CORI, A., S. TRAVERSO et H. REYES. 1970. Different molecular forms of potato apyrase. *Arch. Biochem. Biophys.* 137: 133-142.

TRILISENKO, L.V., J. NOVOTNA, V. ERBAN, V. BEHAL et Z. HOSTALEK. 1987. Subcellular localization of enzymes in *Streptomyces aureofaciens* and its alteration by benzyl thiocyanate. I. Phosphatases and ATP-glucokinase. *Folia Microbiol.* 32: 402-410.

VACHEREAU, A. 1986. Immunodétection de l'ATP diphosphohydrolase dans les cellules eucaryotiques. Thèse de doctorat. Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 156 p.

VALENZUELA, J.G., O.M. CHUFFE et J.M.C. RIBEIRO. 1996a. Apyrase and anti-platelet activities from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*. *Insect Biochem. Molec.* 26: 557-562.

VALENZUELA, M.A., J. LÓPEZ, M. DEPIX, M. MANCILLA, A.M. KETTLUN, L. CATALÁN, 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 the lactogenic cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 113-118.

VALENZUELA, M.A., 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. 1996b. Comparison of the biochemical properties, regulation and function of ATP-diphosphohydrolase from human placenta and rat kidney. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 29: 589-597.

Van WAEG, G. et G. Van der BERGHE. 1991. Purine catabolism in polymorphonuclear neutrophils. Phorbol myristate acetate-induced accumulation of adenosine owing to inactivation of extracellular released adenosine deaminase. *J. Clin. Invest.* 87: 305-312.

VARA, F. et R. SERRANO. 1981. Purification and characterization of a membrane-bound ATP diphosphohydrolase from *Cicer arietinum* (chick-pea) roots. *Biochem. J.* 197: 637-643.

VASSORT, G., F. SCAMPS, M. PUCÉAT, O. CLÉMENT-CHOMIENNE et J. ALVAREZ. 1993. Multiple effects of extracellular ATP in cardiac tissues. *Drug Dev. Res.* 28: 306-308.

VASCONCELOS, E.G., P.S. NASCIMENTO, M.N.L. MEIRELLES, S. VERJOVSKI-ALMEIDA et S.T. FERREIRA. 1993. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58: 205-214.

VASCONCELOS, E.G., S.T. FERREIRA, T.M.U. de CARVALHO, W. de SOUZA, A.M. KETTLUN, M. MANCILLA, M.A. VALENZUELA et S. VERJOVSKI-ALMEIDA. 1996. Partial purification and immunohistochemical

localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*: Immunological cross-reactivity with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleotide triphosphatase hydrolase. J. Biol. Chem. 271: 22139-22145.

VIZI, E.S., B. SPERLÁGH et M. BARANYI. 1992. Evidence that ATP, released from the postsynaptic site by noradrenaline, is involved in mechanical responses of guinea-pig vas deferens: cascade transmission. Neuroscience 50: 455-465.

WANG, T.F. et G. GUIDOTTI. 1996. CD39 is an ecto-(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)-apyrase. J. Biol. Chem. 271: 9898-9901.

WARD, P.A., T.W. CUNNINGHAM, K.K. MCCULLOCH, S.H. PHAN, J. POWELL et K.J. JOHNSON. 1988. Platelet enhancement of O<sup>2-</sup> responses in stimulated human neutrophils. Identification of platelet factor as adenine nucleotide. Lab. Invest. 58: 37-47.

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

WEIL-MALHERBE, H. et A.D. BONE. 1958. The association of adrenaline and noradrenaline with blood platelets. Biochem. J. 70: 14-22.

WELFORD, L.A., N.J. CUSACK et S.M. HOURANI. 1987. The structure-activity relationships of ectonucleotidases and of excitatory P<sub>2</sub>-purinoceptors: evidence that dephosphorylation of ATP analogues reduces pharmacological potency. Eur. J. Pharmacol. 141: 123-130.

WHITE, T.D. 1985. The demonstration and measurement of adenosine triphosphate release from nerves. Methods Pharmacol. 6: 43-46.

WILLIAMS, M. 1990. Purine nucleosides and nucleotides as central nervous system modulators. Ann. NY Acad. Sci. 603: 93-107.

WILLIAMSON, J.R. et D.L. DIPIETRO. 1965. Evidence for extracellular enzymic activity of the isolated perfused rat heart. Biochem. J. 95: 226-232.

WILSON, P.D., G.E. LIEBERMAN et T.J. PETERS. 1982. Ultrastructural localization of adenosine diphosphatase activity in cultured aortic endothelial cells. *Histochem. J.* 14: 215-219.

WISHART, M.J., P.C. ANDREWS, R. NICHOLS, G.T. BLEVINS JR., C.D. LOGSDON et J.A. WILLIAMS. 1993. Identification and cloning of GP-3 from rat pancreatic acinar zymogen granules as a glycosylated membrane-associated lipase. *J. Biol. Chem.* 268: 10303-10311.

WONG, L.B. et D.B. YATES. 1992. Luminal purinergic mechanisms of tracheal ciliary beat frequency. *Am. J. Resp. Cell Mol.* 7: 447-454.

WRIGHTON, C.J., C.W. KOPP, A. MCSHEA, H. VETR et F.H. BACH. 1995. High-level expression of functional human thrombomodulin in cultured porcine aortic endothelial cells. *Transplant. Proc.* 27: 288-289.

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 and ecto-ADPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 1200-1206.

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

YUNG, S.G. et J. PREISS. 1982. Biosynthesis of bacterial glycogen: purification and structural and immunological properties of *Rhodopseudomonas sphaeroides* ADP glucose synthetase. *J. Bacteriol.* 151: 742-749.

ZHAO, D. et N.S. DHALLA. 1991. Purification and composition of  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  ATPase from rat heart plasma membrane. *Mol. Cell. Biochem.* 107: 135-149.

ZIMMERMANN, H. 1992. 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285: 345-365.

ZIMMERMANN, H. 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49: 589-618.