

Le monde des nucléotides extracellulaires

Les nucléotides extracellulaires proviennent d'un bris cellulaire ou sont libérés du cytoplasme par exocytose ou par des mécanismes encore peu connus. Les plaquettes sanguines, par exemple, entreposent des nucléotides dans des grains de sécrétion et les libèrent par exocytose lors de l'agrégation. Ces nucléotides exercent leurs actions 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, une enzyme de surface qui convertit les triphospho- et diphosphonucléosides en nucléosides monophosphates.

Jean Sévigny
Adrien R. Beaudoin

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 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 substrats de ces récepteurs est importante, 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 monophosphate, l'AMP. Les actions des nucléotides peuvent

donc varier selon le type de récepteurs retrouvés sur les cellules cibles. Au niveau artériel, l'ATP peut causer, soit une vasodilatation, soit 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. Il n'est pas exclu que certains nucléotides puissent exercer leur action directement, sans passer par la liaison à des récepteurs spécifiques. Dans cette brève revue, nous ouvrons une fenêtre sur ce champ de recherche, en mettant l'accent sur le rôle des nucléotides extracellulaires dans le système circulatoire et sur une enzyme encore peu connue dont la fonction cataly-

ADRESSE

J. Sévigny : étudiant en doctorat. A.R. Beaudoin : professeur titulaire. Département de biologie, faculté des sciences, université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1 Canada.

TIRÉS A PART

A. R. Beaudoin.

tique consiste à hydrolyser les nucléotides extracellulaires. 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 les principes généraux concernant l'origine des nucléotides extracellulaires. On sait, cependant, que la concentration cytosolique de l'ATP est de l'ordre du millimolaire. Une rupture de la membrane plasmique entraîne donc une augmentation significative de la concentration des nucléotides au voisinage des cellules éclatées. Les cel-

lules peuvent également libérer des quantités considérables d'ATP sans qu'il y ait bris cellulaire, mais les mécanismes de cette libération 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.

Les sources de nucléotides extracellulaires ont été particulièrement étudiées dans le cas du système circulatoire et du système nerveux (voir pour revue [1, 2]). En conditions normales, la concentration sanguine des nucléotides est inférieure à 0,1 micromolaire, 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 [3]. Parmi les éléments sanguins, les érythrocytes représentent une source importante de nucléotides. Leur libération est causée par les forces de cisaillement du flux sanguin, ou simplement par

l'éclatement des cellules. Les nucléotides peuvent aussi être sécrétés par les vaisseaux sanguins. En effet, les cellules endothéliales et musculaires lisses peuvent libérer jusqu'à 60 % de leur contenu en nucléotides, sans que leur viabilité n'en soit affectée. Chez les cellules endothéliales, ce phénomène peut être induit par la thrombine, la trypsine, la chélation du Ca^{2+} à la surface cellulaire [4], la noradrénaline et les forces de cisaillement du flux sanguin. 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. Un exercice physique prolongé ou des conditions d'hypoxie provoquent une sécrétion de nucléotides des cardiomyocytes et des cellules des muscles squelettiques. La figure 1 illustre quelques-unes de ces sources de nucléotides dans le système circulatoire.

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_3A et Ap_4A . Les concentrations combinées d'ATP et d'ADP y atteignent l'ordre du molaire. Ces nucléotides sont sécrétés par exocytose, comme c'est le cas dans le système nerveux. 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. Les cellules chromaffines de la médullosurrénale possèdent aussi des grains contenant, outre l'adrénaline, de l'ATP ainsi que de plus faibles quantités d'ADP, d'UTP, de GTP et de CTP qui sont déversées par exocytose dans la circulation sanguine. Mentionnons en dernier lieu les mastocytes dont les grains à histamine contiennent de l'ATP. 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.

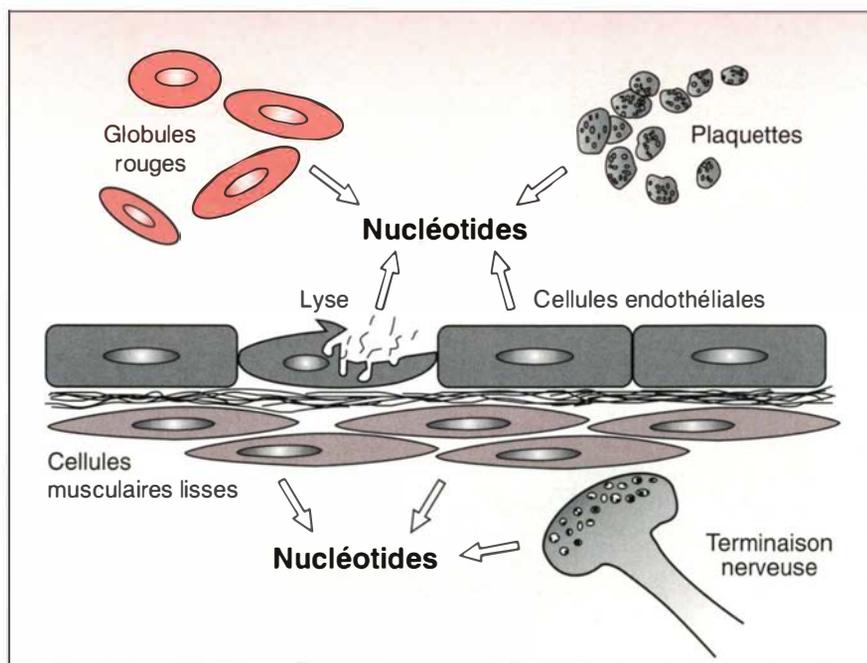


Figure 1. Sources des nucléotides extracellulaires dans le système vasculaire. Les globules rouges, les plaquettes, les cellules endothéliales et musculaires des vaisseaux, de même que les terminaisons nerveuses sont des sources importantes de nucléotides extracellulaires.

Les récepteurs à nucléotides et à nucléosides

Parmi les récepteurs de nucléotides et de nucléosides, les purinorécepteurs sont les mieux connus (voir pour revue [2, 5-8]). Comme leur nom l'indique, ils répondent aux purines. La nomenclature originale de ces récepteurs les regroupait en deux catégories : P_1 et P_2 . Les purinorécepteurs P_1 répondent à l'adénosine alors que les purinorécepteurs P_2 sont activés par l'ATP et l'ADP. On retrouve les purinorécepteurs P_1 dans les grands systèmes de l'organisme où ils sont responsables de multiples actions, notamment sur le rythme cardiaque, la contractilité du cœur, le tonus vasculaire, la sédation, la libération de neurotransmetteurs, l'agrégation plaquettaire, l'adipolyse, les fonctions rénales, les fonctions des leucocytes (Tableau I). Les récepteurs P_1 ont été identifiés, A_1 et A_2 , selon l'affinité d'analogues de l'adénosine et le mode de transduction du signal suivant la liaison de l'agoniste (Tableau II). Ainsi, par l'intermédiaire de purinorécepteurs A_1 , l'adénosine inhibe l'adénylylcyclase, alors qu'elle la stimule par les récepteurs A_2 . Notons cependant que les récepteurs A_1 n'exercent pas tous une action sur l'adénylylcyclase et que certains d'entre eux agissent par l'intermédiaire d'autres effecteurs. La concentration de l'adénosine est aussi un paramètre important puisque celle-ci 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 pour les récepteurs A_2 . Des subdivisions additionnelles ont été proposées : A_{1a} , A_{1b} , A_{2a} , A_{2b} , A_3 et A_4 . Ces subdivisions montrent la complexité de l'interprétation des modes d'action de l'adénosine. Quant aux récepteurs P_2 , on les a subdivisés en quatre sous-types: P_{2x} , P_{2y} , P_{2z} et P_{2u} . À l'origine, on ne distinguait que les sous-types P_{2x} et P_{2y} par leurs actions sur le tonus vasculaire ; activés par l'ATP, les P_{2x} causaient une vasoconstriction, alors que les P_{2y} causaient une vasodilatation. On les distingue maintenant plus clairement depuis que l'on a comparé le poten-

tiel pharmacologique d'une série d'analogues de l'ATP (Tableau II). L'activation des purinorécepteurs P_{2y} de différentes sources tissulaires déclenche aussi une variété d'autres effets physiologiques (Tableau I). 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. Le quatrième sous-type, le purinorécepteur P_{2u} , est localisé exclusivement sur les plaquettes sanguines et activé par l'ADP et non par l'ATP. Il représente donc une exception à la règle voulant que les purinorécepteurs P_2 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 non encore classé peut lier le dinucléotide Ap_4A . Il serait impliqué dans la libération de neurotransmetteurs. Un dernier type de récepteur de nucléotides cause quelques problèmes quant à sa classification. Ce récepteur nommé P_{2u} lie la pyrimidine UTP ainsi que l'ATP [7-9]. Il peut donc difficilement être classé dans les purinorécepteurs et pas davantage dans des pyrimidinorécepteurs. C'est pourquoi certains préfèrent le nommer récepteur de nucléotides. Ce récepteur se retrouve au niveau du système vasculaire, sur les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Son activation provoque une vasodilatation relayée par la libération de prostacycline (PGI_2). On le distingue des purinorécepteurs P_{2x} et P_{2y} 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 II). L'analyse des données de la littérature montre bien que les récepteurs de nucléotides et de nucléosides demeurent encore mal définis et on peut anticiper que leur liste continuera de s'allonger au cours des prochaines années. On peut aussi prévoir beaucoup d'autres informations au fur et à mesure que le clonage de l'ADNc de ces récepteurs progressera. À ce propos, signalons que plusieurs d'entre eux sont déjà clonés : A_1 , A_{2a} , A_{2b} , A_3 , P_{2y} et P_{2u} .

RÉFÉRENCES

1. Lùthje J. Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. *Klin Wochenschr* 1989 ; 67 : 317-27.
2. Dubyak GR, Fedan JS. Biological actions of extracellular ATP. *Ann NY Acad Sci*, 1990 ; 603, 542 p.
3. Côté YP, Pavate CT, Beaudoin AR. The control of nucleotides in blood vessels : role of the ATP-diphosphohydrolase (apyrase). *Curr Top Pharmacol* 1993 ; 1 : 83-93.
4. Pearson JD, Gordon JL. Nucleotide metabolism by endothelium. *Annu Rev Physiol* 1985 ; 47 : 617-27.
5. Stone TW. Receptors for adenosine and adenine nucleotides. *Gen Pharmacol* 1991 ; 22 : 25-31.
6. Stiles GL. Adenosine receptors. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 6451-4.
7. O'Connor SE. Recent developments in the classification and functional significance of receptors for ATP and UTP, evidence for nucleotide receptors. *Life Sci* 1992 ; 50 : 1657-64.
8. Abbracchio MP, Cattabeni F, Fredholm BB, Williams M. Purinoreceptor nomenclature: a status report. *Drug Dev Res* 1993 ; 28 : 207-13.
9. Seifert R, Schultz G. Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracyl nucleotides. *Trends Pharmacol Sci* 1989 ; 10 : 365-9.
10. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972 ; 24 : 510-69.
11. Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 1992 ; 359 : 144-7.
12. Evans RJ, Derkach V, Surprenant A. ATP mediated fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 1992 ; 357 : 503-5.

Tableau I

DISTRIBUTION ET FONCTIONS DES RÉCEPTEURS DES NUCLÉOTIDES ET DES NUCLÉOSIDES

Tissus/Cellules	Récepteurs	Agonistes	Effets physiologiques
Système circulatoire			
Cœur			
oreillettes	A ₁	ADO	action inotrope négative
ventricules (myocytes)	A ₃	ADO	action inotrope négative
	P _{2y}	ATP	action inotrope négative
Artères (coronaires, fémorales mésentériques, aorte...)	P _{2x}	ATP	action inotrope positive
	A ₂	ADO	vasodilatation
cellules musculaires lisses	P _{2x}	ATP	vasoconstriction
	P _{2u}	UTP et ATP	PGI ₂ ↑ et vasodilatation
	P _{2y}	ATP	NO, PGI ₂ ↑ ; vasodilatation, agrégation plaquettaire ↓
cellules endothéliales	P _{2u}	UTP et ATP	PGI ₂ ↑ et vasodilatation
	A ₂	ADO	agrégation induite par l'ADP ↓
Cellules sanguines plaquettes	P _{2T}	ADP	agrégation des plaquettes ↑
	P _{2u}	UTP et ATP	adhérence ↑
neutrophiles	P _{2u}	ATP	activation, prolifération cellulaire ↑
lymphocytes B	P _{2z}	ATP ⁴⁻	perméabilisation ↑
lymphocytes T	P _{2z}	ATP ⁴⁻	perméabilisation ↑
Système digestif			
Estomac	P ₂	ATP	acide ↑
Intestin			
cellules épithéliales	P ₂	ATP	transport ionique (régulation)
muscles lisses	P _{2x}	ATP	contraction
Foie			
hépatocytes	A ₂ P _{2y} et/ou P _{2u}	ADO UTP et ATP	glycogénolyse ↑ glycogénolyse ↑
Système respiratoire			
Poumons			
pneumocytes de type II	A ₂ P _{2y}	ADO ATP	surfactants ↑ surfactants ↑
Trachée			
cellules épithéliales	P _{2u}	UTP et ATP	sécrétion Cl ⁻ (régulation du canal)
cellules caliciformes	P ₂	ATP	mucine ↑
Système excréteur			
Reins			
région préglomérulaire	A ₁	ADO	vasoconstriction
région postglomérulaire	A ₂	ADO	vasodilatation
macula densa	A ₁	ADO	rénine ↓
région corticale	A ₂	ADO	rénine ↑
	A ₁	ADO	érythropoïétine ↓
tube contourné distal	A ₂	ADO	érythropoïétine ↑
tube collecteur	A ₁	ADO	transport du NaCl ↓
cellules épithéliales	A ₂	ADO	conductivité hydraulique ↑
	P ₂	ATP	transport ionique (régulation)
Système endocrinien			
Pancréas			
cellules A	A ₂	ADO	glucagon ↑
cellules B	P _{2y}	ATP	insuline ↑
cellules D	P ₂	ATP	somatostatine ↑
Autres			
adipocytes	A ₁	ADO	lipolyse ↓
glandes lacrymales	P ₂	ATP ⁴⁻	fluide ↑
fibroblastes	P _{2z}	ATP ⁴⁻	perméabilisation ↑
macrophages	P _{2z} et P ₂ ?	ATP ⁴⁻	perméabilisation ↑ ; cytotoxicité ↓
mastocytes	P _{2z}	et ATP	phagocytose ↓
		ATP ⁴⁻	histamine ↑
terminaisons nerveuses (récepteurs présynaptiques)	A ₁	ADO	perméabilisation ↑ neurotransmetteurs ↓

ADO, adénosine ; NO, oxyde nitrique ; PGI₂ prostacycline.

RÉFÉRENCES

13. Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 1990 ; 70 : 761-845.
14. Vassort G, Scamps F, Pucéat M, Clément-Chomienne O, Alvarez J. Multiple effects of extracellular ATP in cardiac tissues. *Drug Dev Res* 1993 ; 28 : 306-8.
15. Kennedy C, Delbro D, Burnstock G. P2-purinoceptors mediate both vasodilatation (via the endothelium) and vasoconstriction of the isolated rat femoral artery. *Eur J Pharmacol* 1985 ; 107 : 161-8.
16. Gachet C, Cazenave JP. ADP induced blood platelet activation : a review. *Nouv Rev Fr Hematol* 1991 ; 33 : 347-58.
17. El-Moatassim C, Dornand J, Mani JC. Extracellular ATP and cell signalling. *Biochim Biophys Acta* 1992 ; 1134 : 31-45.
18. Dubyak GR, El-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinoceptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993 ; 265 : C577-C606.
19. Burnstock G. Physiological and pathological roles of purines : an update. *Drug Dev Res* 1993 ; 28 : 195-206.
20. Ribeiro JMC. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* 1987 ; 32 : 463-78.
21. Rigbi M, Levy H, Iraqui F, Teitelbaum M, Orevi M, Alajoutsijärvi A, Horowitz A, Galun R. The saliva of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. I. Biochemical characterization of the high molecular weight fraction. *Comp Biochem Physiol* 1987 ; 87B : 567-73.
22. Lebel D, Poirier GG, Phaneuf S, St-Jean P, Laliberté JF, Beaudoin AR. Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP-diphosphohydrolase from pig pancreas. *J Biol Chem* 1980 ; 255 : 1227-33.
23. Laliberté JF, St-Jean P, Beaudoin AR. Kinetic effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on ATP hydrolysis by the purified ATP-diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 1982 ; 257 : 3869-74.
24. Knowles AF, Isler RE, Reece JF. The common occurrence of ATP-diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1983 ; 731 : 88-96.
25. Valenzuela MA, Lopez J, Depix M, Mancilla M, Kettlun AM, Catalan L, Chiong M, Garrido J, Traverso-Cori A. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comp Biochem Physiol* 1989 ; 93B : 509-13.

Tableau II
CLASSIFICATION DES RÉCEPTEURS DES NUCLÉOTIDES
ET DES NUCLÉOSIDES

Récepteur	Efficacité des agonistes	Systèmes effecteurs
A ₁	CCPA > CPA > NECA >> CGS 21680	-adénylylcyclase ↓ (via protéine Gi)
A _{2a}	CGS 21680 ≥ NECA > CV 1808 > R-PIA > CPA	-adénylylcyclase ↑ (via protéine Gs)
A _{2b}	NECA	-adénylylcyclase ↑ (via protéine Gs)
A ₃	APNEA > R-PIA = NECA >> CGS 21680	-protéine G ?, mal défini
P _{2x}	APPCP ≥ APCPP ≥ ATP = ADP ≥ 2-MeSATP > AMP	-Ca ²⁺ intracellulaire (via un canal ionique intrinsèque) -dépoliarisation de la membrane
P _{2y}	2-MeSATP > ATPγS > ATP = ADP >> APCPP = APPCP = UTP	-PLC ↑ (via protéine G) -Ca ²⁺ intracellulaire ↑ -autres phospholipases ↑
P _{2T}	2-MeSADP > ADP	-PLC ↑ (via protéine G) -Ca ²⁺ intracellulaire ↑
P _{2z}	ATP ⁴⁻ ; BzATP > ATP = ATPγS >>> ADP	-Ca ²⁺ intracellulaire ↑ -dépoliarisation de la membrane -ouverture d'un pore non sélectif
P _{2u}	UTP ≥ ATP = ATPγS > ADP > 2-MeSATP > APCPP = APPCP	-PLC ↑ (via protéine G) -Ca ²⁺ intracellulaire ↑ -autres phospholipases ↑

2-MeSATP, 2-méthylthio-ATP ; APCPP, adénosine 5'-(a,b méthylène) triphosphate ; APPCP, adénosine 5'-(b,g méthylène) triphosphate ; ATPγS, adénosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) ; BzATP, benzoylbenzoïque-ATP ; CPA, N⁶-cyclopentyl adénosine ; CCPA, 2-chloro CPA ; NECA, 5'N-éthylcarboxamino adénosine ; PLC, phospholipase C.

L'omniprésence des récepteurs de nucléotides et de nucléosides dans les divers systèmes est donc établie (Tableau I). On retrouve même plusieurs types de récepteurs à proximité les uns des autres, soit sur une même cellule, soit sur des cellules voisines, permettant vraisemblablement un contrôle étroit de certaines fonctions cellulaires, selon le type de nucléotide, sa concentration et son affinité pour les récepteurs. Le système circulatoire en est un bon exemple (Tableau I). Évidemment, cette 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.

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 nerveux, le système circulatoire et le système respiratoire. 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. Au niveau des voies aériennes, il stimule aussi la libération de mucine par les cellules caliciformes. L'ATP, l'ADP et l'adénosine agissent sur le tonus des muscles lisses de la trachée, et vraisemblablement tout le long de l'arbre trachéo-bronchique, causant une relaxation. Cependant, on soupçonne que c'est l'adénosine qui serait responsable de cette relaxation puisque certains indices suggèrent que l'ATP et l'ADP sont hydrolysés en adénosine avant d'induire leur action. D'autres études montrent que l'ATP provoque la contraction des cellules musculaires lisses. Ajoutons qu'au niveau des cellules épithéliales, l'ATP et l'adénosine contrôlent l'ouverture des canaux chlorure.

Les actions des nucléotides extracellulaires sur le système nerveux et le système circulatoire ont été beaucoup plus étudiées. Burnstock *et al.* furent les premiers à proposer l'existence d'une transmission nerveuse dépendante de l'ATP. Ils l'ont appelée « transmission nerveuse purinergique » [10]. L'ATP est libéré par des fibres nerveuses non-adrénergiques non-cholinergiques, cholinergiques, et adrénergiques [2]. Comme ces fibres nerveuses sont omniprésentes dans l'organisme, on peut difficilement imaginer tout le spectre des actions de ces « neurotransmetteurs ». Selon une étude récente, l'ATP ferait même partie des transmetteurs rapides de l'influx nerveux entre les neurones, dans le système nerveux central [11, 12]. A ce titre, il rejoindrait ainsi le rang jusqu'alors exclusif du glutamate, de l'acétylcholine et de la sérotonine. De plus, la présence de purinorécepteurs A_1 aux extrémités des axones semble indiquer que les produits d'hydrolyse de l'ATP exercent une rétroaction en inhibant la libération additionnelle de neurotransmetteurs. 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 cœur des mammifères ont fait l'objet de revues récentes [13, 14]. L'adénosine et les nucléotides adényliques agissent sur les vaisseaux coro-

naires, sur le nœud 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 nœuds 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). 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 alors que l'ATP peut induire, soit une vasodilatation, soit une vasoconstriction coronarienne, selon son site d'action. Les actions de l'adénosine énumérées plus haut permettent à celle-ci de jouer un rôle protecteur sur le cœur, particulièrement dans des conditions ischémiques, en diminuant la demande en oxygène des cellules et en augmentant 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_2 à la surface des cellules endothéliales causent une vasodilatation [15]. Cette vasodilatation est le résultat final d'une cascade de réactions cellulaires initiée par la liaison du nucléotide au récepteur, activation de la phospholipase C, *via* une protéine G, hydrolyse du phosphatidyl-inositol diphosphate (PIP₂) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et libération du Ca²⁺ du réticulum

endoplasmique. L'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire cause : (1) la production de PGI₂, suite à l'hydrolyse de l'acide arachidonique des phospholipides par une phospholipase A₂ ; (2) l'activation de l'oxyde nitrique synthétase (NOS) ; (3) la libération de l'EDHF (*endothelium derived hyperpolarising factor*). La NOS produit du NO et/ou du R-NO à partir d'arginine. Le NO, originalement appelé EDRF (*endothelium derived relaxing factor*), la PGI₂ 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 PGI₂ provoque une augmentation d'AMP cyclique (AMPc) et l'EDHF causerait la libération d'ions potassium. Il est clair que le NO et la PGI₂ sont impliqués *in vivo* dans la vasodilatation alors que cette action induite par l'EDHF n'est pas aussi évidente. Lorsque l'ATP et/ou l'ADP se fixent aux récepteurs P_{2x} des cellules musculaires lisses, ils induisent une vasoconstriction [15] précédée d'une accumulation de Ca²⁺ intracellulaire. 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 incitons le lecteur à se référer à un article récent de Olsson et Pearson [13].

Les nucléotides exercent un autre effet important sur le système circulatoire, au niveau de l'agrégation plaquettaire [16]. L'ADP est responsable d'une voie principale d'activation et de la cascade d'événements qui aboutissent à l'agrégation. La liaison de l'ADP à son purinorécepteur P_{2t} , proposé comme étant l'agrégine, se traduit, dans l'ordre, par le changement de forme des plaquettes, l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, la libération du contenu des grains α 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 (*figure 3*). Le purinorécepteur P_{2t} est

RÉFÉRENCES

26. Moodie FDL, Baum H, Butterworth PJ, Peters TJ. Purification and characterisation of bovine spleen ADPase. *Eur J Biochem* 1991 ; 202 : 1209-15.
27. Picher M, Côté YP, Béliveau R, Pothier M, Beaudoin AR. Demonstration of a novel type of ATP-diphosphohydrolase (E.C.3.6.1.5) in the bovine lung. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 4699-703.
28. Miura Y, Hirota K, Arai Y, Yagi K. Purification and partial characterization of adenosine diphosphatase activity in bovine aorta microsomes. *Thromb Res* 1987 ; 46 : 685-95.
29. Côté YP, Picher M, St-Jean P, Béliveau R, Pothier M, Beaudoin AR. Identification and localization of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) in bovine aorta: relevance to vascular tone and platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1991 ; 1978 : 187-91.
30. Papamarcaki T, Tsolas O. Identification of ATP-diphosphohydrolase activity in human term placenta using a novel assay for AMP. *Mol Cell Biochem* 1990 ; 97 : 1-8.
31. Yagi K, Kato N, Shinbo M, Shimba LS, Miura Y. Purification and characterization of adenosine diphosphatase from human umbilical vessels. *Chem Pharm Bull* 1992 ; 40 : 2143-6.
32. Beaudoin AR, Sévigny J, Picher M. ATP-diphosphohydrolases, apyrases and nucleotides phospho-hydrolases: biochemical properties and functions. In : Lee AG, ed. *Treatise on biomembranes*. Vol. 6. Greenwich : JAI Press Inc, 1994 (sous presse).
33. Côté YP, Filep JG, Battistini B, Gauvreau J, Sirois P, Beaudoin AR. 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* 1992 ; 1139 : 133-42.
34. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993 ; 7 : 516-22.

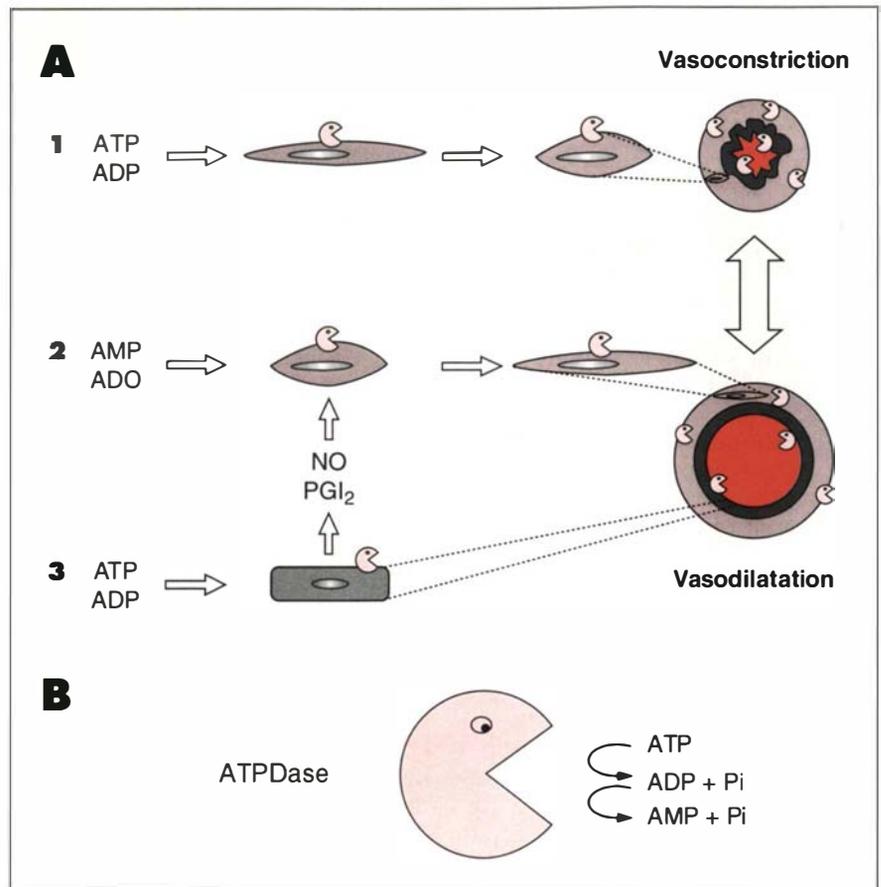


Figure 2. **ATP-diphosphohydrolase et tonus vasculaire.** **A.** (1) L'ATP et l'ADP agissent sur les purinorécepteurs P_{2x} des cellules musculaires lisses et provoquent une vasoconstriction. (2) L'AMP et l'adénosine (ADO) se lient aux purinorécepteurs A_2 des cellules musculaires lisses et produisent une vasodilatation. (3) L'ATP et l'ADP agissent sur les récepteurs P_{2y} des cellules endothéliales et libèrent l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline (PGI_2). 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 (bistre) ; cellules endothéliales (gris) ; ATP-diphosphohydrolase (rose).

spécifique des plaquettes et de 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'AMP et l'adénosine inhibent aussi l'agrégation plaquettaire, mais en se liant à des récepteurs P_1 (figure 3). 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 beau-

coup d'hormones et de neurotransmetteurs, les nucléotides peuvent mobiliser le Ca^{2+} intracellulaire par l'intermédiaire de leurs récepteurs, en activant la phospholipase C qui convertit le PIP_2 en IP_3 et en diacylglycérol (DAG). Toute une panoplie de cellules endocrines et exocrines à travers l'organisme répondent à l'ATP et à l'UTP selon des mécanismes semblables (Tableaux I et II). Mentionnons les pneumocytes, les cellules caliciformes, les cellules chromaffines des médullosurrénales, les cellules A, B, D du pancréas

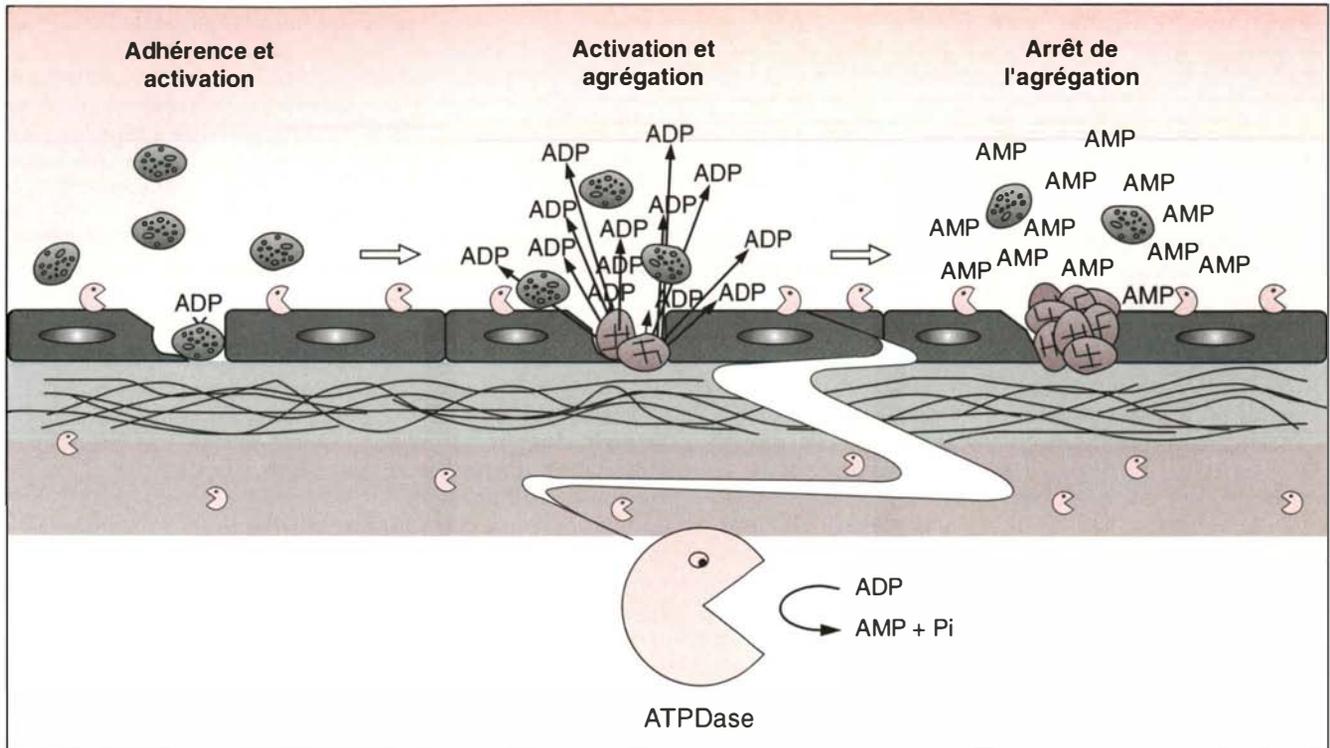


Figure 3. **ATP-diphosphohydrolase et agrégation plaquettaire.** Lors d'un bris cellulaire, des nucléotides sont libérés. L'ADP et le collagène de la membrane basale activent les plaquettes. L'exocytose d'une forte concentration d'ADP des plaquettes activées entraîne une agrégation massive. L'ATPDase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

endocrine, les cellules de la thyroïde, de la parotide et les cellules acineuses lacrymales qui répondent à l'ATP, à l'UTP ou à l'adénosine.

Pour une étude plus détaillée du rôle de l'ATP sur une variété de cellules, dont la modification de la perméabilité cellulaire et la prolifération cellulaire, le lecteur est invité à consulter les revues récentes de El-Moatassim *et al.* [17], de Dubyak et El-Moatassim [18], de Burnstock [19] ainsi que l'ouvrage de Dubyak et Fedan [2].

Les ATP-diphosphohydrolases

Comme nous l'avons signalé, la stimulation d'une cellule par les nucléotides dépend 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 donc la

capacité qu'ont ces mêmes cellules de les hydrolyser. On connaissait depuis plusieurs années 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 triphospho- et diphosphonucléosides étaient hydrolysés par des enzymes de surface appelées ectonucléotidases. Dans ce groupe d'enzymes, la 5'-nucléotidase qui convertit l'AMP en adénosine est aussi incluse. On croyait, certains croient toujours, que deux enzymes distinctes étaient responsables de l'hydrolyse successive des groupements γ et β phosphate des triphospho- et diphosphonucléosides pour produire le dérivé monophosphate. Des études récentes ont cependant mis en évidence des enzymes capables de produire l'hydrolyse séquentielle de ces deux phosphates. Ces enzymes sont appelées apyrases ou ATP-diphosphohydrolases (ATPDases). On les avait

d'abord trouvées sous forme soluble et membranaire chez certaines plantes, puis, par la suite, chez des insectes [20] et autres arthropodes hématophages [20] dont la sangsue médicinale [21] et chez le ver *Schistosoma mansoni*. Chez ces animaux, on a attribué à l'enzyme une fonction anticoagulante [20]. Chez les vertébrés, l'ATPDase a d'abord été retrouvée dans la membrane des grains de sécrétion des cellules acineuses du pancréas exocrine de porc [22]. Bien qu'on ait réussi à la purifier et à définir ses propriétés cinétiques [23], on n'a pas réussi à lui assigner une fonction précise. On a rapporté plus tard d'autres activités ATPDasiques chez plusieurs espèces et dans une variété d'organes : foie et cerveau de souris [24], glande mammaire [25], glande salivaire [25], utérus [25], myomètre, placenta et fraction synaptosomale du cerveau du rat, reins de chien [24] et plusieurs lignées de

cellules tumorales [24]. L'enzyme a été purifiée à un haut niveau à partir d'oviductes et de foie de poulet. On l'a isolée de la rate [26], des poumons [27], des cellules endothéliales et des muscles lisses de l'aorte [28, 29] de même que des muscles lisses de la trachée de bœuf. Finalement, l'ATPDase a aussi été identifiée dans le placenta [30] et le cordon ombilical humain [31]. De nombreuses ectoATPases furent rapportées dans la littérature sans que l'activité ADPasique n'ait été mesurée. De même, des activités ADPasiques ont été observées sans que l'activité ATPasique n'ait été vérifiée. 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 ectoADPasiques 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 ectoATPasiques et ectoADPasiques décrites dans la littérature seraient attribuables, dans bien des cas, à des ATPDases. Ainsi, la présence des ATPDases chez les vertébrés a été montrée dans une variété d'organes, en particulier au niveau du système circulatoire [32]. Quel est donc le rôle de cette enzyme ?

Rôle des ATP-diphosphohydrolases

En examinant quelques-unes des fonctions des nucléotides extracellulaires nous avons pu constater leur importance manifeste au niveau physiologique. L'ATPDase, 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+}), de même que par la localisation extracellulaire de son site actif, serait en mesure d'intervenir efficacement *in vivo* en altérant les concentrations de nucléotides extracellulaires. Le fait que l'enzyme ait une forte 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 en comparant les actions souvent

antagonistes des substrats et des produits de la réaction que l'on peut proposer des fonctions à cette enzyme. 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). Certaines études ont mis en évidence ce rôle potentiel de l'ATPDase dans la thromborégulation [28, 33, 34]. De façon plus générale, cette enzyme limiterait l'action des purinorécepteurs P_2 , et/ou convertirait une action de type P_2 en P_1 . L'ATPDase pourrait, par ce moyen, convertir une vasoconstriction en vasodilatation (figure 2). Elle pourrait également influencer les actions du système nerveux et moduler les réponses de tous les systèmes qui subissent les assauts des nucléotides extracellulaires, quelle qu'en soit la source. L'ATPDase peut non seulement influencer l'activation des purinorécepteurs mais aussi celle de tous les récepteurs de nucléotides en général. Finalement, une conséquence importante de l'action combinée de l'ATPDase et de la 5'-nucléotidase est la possibilité de récupérer le groupement adénosine grâce à un transporteur spécifique pour les besoins du métabolisme cellulaire.

Conclusion

Dans cette revue, nous n'avons présenté qu'une partie des fonctions des nucléotides extracellulaires chez les organismes supérieurs. Nous avons porté un intérêt particulier à quelques grands systèmes en laissant de côté certains effets directs non relayés par des récepteurs connus. Nous avons mis l'accent sur l'enzyme ATPDase dans la modulation des niveaux de nucléotides extracellulaires tout en sachant bien que le contrôle de la concentration relative des nucléotides est la résultante de plusieurs variables. Certaines études nous portent à croire qu'il y aurait au moins un autre type de nucléotide phosphohydrolase sur la membrane de cellules eucaryotes. Ce champ de recherche présente donc de nouveaux défis à relever. Une étude plus approfondie des mécanismes de libération des nucléotides extracellulaires, des récepteurs impliqués, des fonctions de ces nucléotides, de

même qu'une analyse détaillée de la localisation tissulaire des ectonucléotidases, et des facteurs qui contrôlent leur expression, permettront d'obtenir une image plus complète et mieux intégrée du monde fascinant des nucléotides extracellulaires ■

TIRES À PART

Adrien R. Beaudoin.

Summary

An open window on the world of extracellular nucleotides and the potential role of the ATP-diphosphohydrolase

The interest for extracellular nucleotides and their physiological role in superior organisms has considerably increased in the past decade. Extracellular nucleotides are released as a result of cell lysis, or from intact cells by exocytosis, and other mechanisms which are still poorly understood. A well known example of exocytotic release of ATP and ADP is activated platelets. The action of nucleotides is mediated by specific receptors and many of these functions have been described in the cardiovascular, respiratory and nervous systems. The action of these nucleotides appears to be modulated by an ectoenzyme, an ATP-diphosphohydrolase which catalyses the hydrolysis of the γ and β phosphate residues of triphospho- and diphosphonucleosides (for example : ATP' ADP' AMP). The physiological role of ATP-diphosphohydrolase is discussed in this review.

Remerciements

Nous remercions Mme Maryse Picher pour une lecture critique de ce manuscrit. Nous tenons également à remercier la Fondation des maladies du cœur du Québec et du Canada ainsi que les fonds FCAR (Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide à la recherche) pour leur support financier. Jean Sévigny est boursier du FRSQ (Fonds de la recherche en santé du Québec) et de la fondation canadienne des maladies du cœur.