

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR EN PHYSIOLOGIE
NERVEUSE ET MUSCULAIRE
(3ème cycle)**

par

Roméo CECHELLI

**ETUDE COMPARATIVE
DES ACTIVITES ADENYLCYCLASIQUE ET GUANYLCYCLASIQUE
DES CAPILLAIRES ISOLES A PARTIR DU
TELENCEPHALE ET DU MYOCARDE DU POULET DE 30 JOURS**



Soutenue le 21 novembre 1980 devant la Commission d'Examen

Président	J. MONTREUIL	Professeur à l'Université de Lille I
Rapporteur	P. DELORME	Professeur à l'Université de Lille I
Examineurs	J. GAYET	Professeur à l'Université de Nancy I
	P. GUILBAULT	Professeur à l'Université de Lille I
	J.P. ROUSSEAU	Professeur à l'Université de Lille I
	A. VERBERT	Professeur à l'Université de Lille I

Travail réalisé au Laboratoire de Neurobiologie Fonctionnelle de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 308

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	6
I - MATERIEL	6
II - METHODES	6
1 - Isolement des capillaires	6
A - Choix de la méthode	6
B - Isolement des capillaires télencéphaliques	8
C - Isolement des capillaires cardiaques	10
D - Contrôle de la pureté en microscopie électronique	12
2 - Détermination de l'activité enzymatique des capillaires isolés	13
A - Détermination de l'activité adénylcyclasique	13
B - Détermination de l'activité guanylcyclasique	19
C - Etude de l'inhibition de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques	22
RESULTATS	24
1 - Contrôle de la pureté de l'isolement en microscopie électronique	24
A - Isolement des capillaires télencéphaliques	24
B - Isolement des capillaires cardiaques	24
2 - Détermination de l'activité adénylcyclasique	24
A - Analyse de la séparation de la radioactivité lors de l'électrophorèse et de la chromatographie	24
B - Activité adénylcyclasique	27
C - Etude de l'inhibition de la 3',5' phosphodiesterase	36
3 - Détermination de l'activité guanylcyclasique	41
A - Analyse de la séparation de la radioactivité lors de la chromatographie	41
B - Activité guanylcyclasique	41

DISCUSSION	55
1 - Choix de la méthode	55
2 - Activité adénylcyclasique des broyats et capillaires isolés	55
3 - Action de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques sur la dégradation de l'AMP _c	58
4 - Activité guanylcyclasique	59
5 - Action de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques sur la dégradation du GMP _c	61
6 - Activité adénylcyclasique, guanylcyclasique et pinocytose	61
CONCLUSION	66
BIBLIOGRAPHIE	67

PRINCIPALES ABREVIATIONS DANS LE TEXTE

Adé	:	Adénine
Ado	:	Adénosine
ADP	:	Adénosine 5' diphosphate
ADPase	:	Adénosine diphosphatase
AMP	:	Adénosine 5' monophosphate
AMP _C	:	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ATP	:	Adénosine triphosphate
GDP	:	Guanosine diphosphate
GMP	:	Guanosine monophosphate
GMP _C	:	Guanosine 3',5' monophosphate cyclique
GTP	:	Guanosine triphosphate
GTPase	:	Guanosine triphosphatase
Guo	:	Guanosine
Gua	:	Guanine
cpm	:	Coups par minute

INTRODUCTION

Le système nerveux central a longtemps été considéré comme une structure "supérieure" différente et isolée du reste de l'organisme. Cette notion d'isolement, tout d'abord empirique, fut visualisée par EHRlich, lorsqu'en 1885, il remarque que la coeruleïne S, injectée par voie intraveineuse, colore tous les tissus de l'organisme, exceptés ceux du cerveau.

Quelques années plus tard, ROUX et BORREL (1898) constatent que l'antitoxine tétanique injectée par voie sanguine ne protège pas l'animal contre les effets de la toxine injectée par voie intracérébrale. Par contre, l'injection intracérébrale de l'antitoxine s'oppose aux effets de l'injection intraventriculaire de la toxine. Ils en concluent que l'antitoxine, administrée par voie sanguine, ne parvient pas à l'encéphale.

Plus tard, GOLDMAN (1909, 1913) injecte par voie intraveineuse du bleu Trypan à des Lapins. Il constate que le colorant, qui se lie à des protéines plasmatiques, colore tous les tissus sauf le cerveau. Mais, si l'injection est réalisée par voie intraventriculaire, seul le cerveau est coloré.

Ces observations sont à l'origine de la notion de BARRIÈRE HÉMATO-ENCEPHALIQUE. Ce terme est défini comme étant "un mécanisme spécial réglant le passage de diverses substances du sang dans le liquide céphalo-rachidien et dans les centres nerveux spinaux" (STERN et GAUTHIER, 1922).

Cette barrière hémato-encéphalique est composée en réalité,

d'après WALTER (1933), de trois barrières :

- la première correspondrait aux cellules épithéliales des plexus choroïdes et aux parois des vaisseaux arachnoïdiens ;
- la deuxième serait constituée par l'épendyme et la couche gliale superficielle du cortex cérébral en regard des espaces arachnoïdiens ;
- la troisième se situerait au niveau de la paroi des capillaires cérébraux.

Cette dernière occupe une place importante dans les rapports entre le sang et la parenchyme nerveux, car c'est la voie la plus directe des échanges entre ces différents compartiments.

Les modalités d'échanges de substances au travers de la paroi des capillaires peuvent se regrouper en trois catégories : la diffusion passive, la diffusion facilitée et le transport actif.

La diffusion passive est observée quand un soluté, placé dans un solvant, de part et d'autre d'une membrane ou d'une couche cellulaire, diffuse passivement vers le compartiment le moins concentré jusqu'à ce que l'équilibre des concentrations soit atteint.

La diffusion facilitée est un mécanisme de transport stéréospécifique et saturable. Elle se caractérise également par des phénomènes de compétitivité. Elle fait vraisemblablement appel à un système de transporteurs. Elle accroît le transfert des métabolites et de produits spécifiques.

Le transport actif, lui, nécessite de l'énergie. Le transport des ions Na^+ en est l'exemple le plus significatif.

A ces trois types il convient d'ajouter le transport vésiculaire de substances de poids moléculaire élevé, principalement les protéines.

La participation de vésicules de pinocytose dans le transport de substances, de la lumière des capillaires vers le tissu extravasculaire, a été suggérée pour la première fois par PALADE (1953) à partir d'observations en microscopie électronique.

La rareté des vésicules de pinocytose présentes dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (REYNERS et al., 1975), et la présence de "zonulae occludentes" entre ces cellules sont les deux caractéristiques morphologiques qui peuvent expliquer l'imperméabilité de la paroi vasculaire de la majeure partie du système nerveux central aux substances de poids moléculaire élevé (REESE et KARNOVSKY, 1967 ; DELORME et al., 1968, 1970 ; DELORME, 1971).

8 Les capillaires télencéphaliques et cardiaques sont normalement classés dans le même grand groupe, à savoir celui des capillaires continus (MAJNO, 1965 ; SIMON, 1966). En dépit de cette classification, les capillaires myocardiques diffèrent des capillaires cérébraux par ces deux mêmes caractéristiques morphologiques : les cellules y sont jointes par des "maculae occludentes" et le transport vésiculaire y est particulièrement important (KARNOVSKY, 1967, 1968 ; KARNOVSKY et SHEA, 1970).

X Ainsi, des capillaires de type continu, présentant une structure très voisine, ont un comportement physiologique différent du point de vue de l'activité de pinocytose. A quoi est due cette différence ?

WETZEL et al. (1965) montrent que les hormones neurohypophysaires modifient la perméabilité au niveau de la thyroïde, lors de la résorption de la colloïde par les cellules thyroïdiennes, en augmentant le phénomène de pinocytose. Cette augmentation de la pinocytose est accompagnée d'une augmentation du taux intracellulaire de 3',5'-adenosine monophosphate cyclique (AMPC).

MASER et al. (1971) font les mêmes remarques au niveau de la vessie de Cobaye.

JOO (1972), à la suite d'injections intrapéritonéales de N_6-O_2 dibutyryl-AMPC, constate une augmentation de la pinocytose dans les capillaires cérébraux de Souris. Il suggère que l'AMPC peut jouer un rôle important dans la régulation de la perméabilité de ces vaisseaux.

Plus récemment, WESTERGAARD (1975) montre que l'AMPC stimule la pinocytose dans les cellules endothéliales des artérioles cérébrales.

Ces quelques exemples suggèrent donc que l'AMPC joue un rôle important dans la formation des vésicules de pinocytose au niveau des capillaires.

On sait, depuis SUTHERLAND et al. (1962) que l'AMPC intervient comme médiateur dans un grand nombre de phénomènes se déroulant au sein de la cellule.

D'autres nucléotides cycliques ont été découverts par la suite dans tous les organismes : ASCHMAN et al. (1963), PRICE et al. (1967) mettent en évidence la présence de guanosine 3',5'-monophosphate cyclique (GMPc) dans l'urine de Rat ; STEINER et al. (1970), la présence d'uracyle 3',5'-monophosphate cyclique (UMPc) dans l'urine de Rat. Ces nucléotides cycliques sont toujours présents à des taux nettement inférieurs à ceux de l'AMPC (MARKS, 1973). C'est surtout vers le GMPc que les recherches se sont orientées ces dernières années (KOLATA, 1973). Comme l'AMPC, le GMPc est détecté dans de nombreux tissus d'un même animal : intestin, coeur de Rat (ISHIKAWA et al., 1962) ; coeur, cerveau de Rat (GOLDBERG et al., 1970). L'enzyme responsable de la synthèse du GMPc est la guanylcyclase. Elle utilise le guanosine triphosphate (GTP) comme substrat, et n'est active qu'en présence d'ions manganèse. Le GMPc est hydrolysé par une phosphodiesterase des nucléotides cycliques, identique à celle hydrolysant l'AMPC (MARKS, 1973).

Ce n'est qu'en 1970, que GOLDBERG et al. réussirent à mettre en évidence, dans le coeur de Rat, une augmentation de la concentration

intracellulaire en GMPc, à la suite d'une perfusion d'acétylcholine. Dans ces mêmes conditions, la concentration en AMPc diminue légèrement. D'autre part, l'adjonction au liquide de perfusion d'isoprotérénol (un analogue de la noradrénaline) provoque une diminution du taux intracellulaire de GMPc et une augmentation de celui de l'AMPc.

Il apparaît que dans de nombreux phénomènes régulateurs, les taux d'AMPc et de GMPc intracellulaires soient en concentration inversement proportionnels. Cet antagonisme serait à l'origine de nombreuses régulations métaboliques (GOLDBERG et al., 1970 ; KUO et al., 1972).

Il semblerait donc que :

- l'AMPc soit liée très intimement au phénomène de pinocytose, la présence d'AMPc pouvant induire ce phénomène ;
- la pinocytose soit régulée par l'antagonisme AMPc-GMPc.

Nous nous proposons, pour apporter une preuve supplémentaire à ces deux hypothèses, de déterminer :

X - *Dans un premier temps*, l'activité adénylcyclasique des capillaires télencéphaliques et cardiaques, afin de voir s'il existe une différence d'activité, en relation avec la pinocytose, entre les deux types de capillaires que nous aurons auparavant isolés.

- *Dans un second temps*, l'activité guanylcyclasique des capillaires cardiaques et télencéphaliques afin de vérifier si l'antagonisme AMPc-GMPc s'applique au phénomène cellulaire qu'est la pinocytose.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL

Notre travail est effectué sur des poulets, mâles ou femelles, de race HYBRO, âgés d'environ 30 jours (± 1). Ces animaux proviennent tous de l'élevage du laboratoire, et sont donc tous soumis aux mêmes conditions de nutrition, environnement...

II - METHODES

Afin de doser l'activité des cyclases au niveau des capillaires cérébraux et cardiaques, il nous faut, dans un premier temps, obtenir une fraction purifiée de ces capillaires. Pour ce faire, nous devons procéder à leur isolement après homogénéisation des tissus concernés.

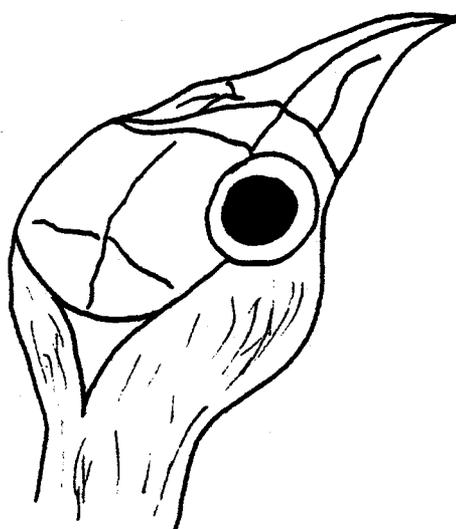
1 - Isolement des capillaires

A - Choix de la technique

SIAKOTOS et FLEISCHER (1969) sont les premiers à décrire une technique d'isolement des capillaires cérébraux. Cette technique est essentiellement fondée sur l'utilisation de différentes centrifugations en gradient de saccharose. Depuis, plusieurs techniques ont été décrites :

- celles de SESSA et al. (1970), JOO et KARNUSHINA (1973), MRSULJA et al. (1976) s'appuient, toutes les trois, sur l'emploi combiné de centrifugation différentielle et de centrifugation en gradient de densité.

- celles de MEEZAN et al. (1974), BRENDDEL et al. (1974), LAI et al. (1975), GOLDSTEIN et al. (1975) consistent à filtrer les tissus homogénéisés sur des tamis à mailles de tailles différentes.



Mise à nu du crâne par élimination totale de la peau et des plumes.
Les flèches numérotées indiquent l'ordre et le tracé
des incisions.

- Schéma I -

Notre choix s'est porté vers les méthodes de cette dernière catégorie, car elles présentent deux avantages essentiels :

- l'obtention des capillaires est beaucoup plus rapide par cette méthode de filtration que par centrifugation.
- l'acquisition des tamis est relativement peu onéreuse.

Notre technique s'inspire de celle de BRENDÉL et al. (1974). Grâce à cette technique ces auteurs obtiennent une fraction de microvaisseaux, comprenant à la fois des capillaires, des veinules et des artérioles. En la modifiant légèrement, nous recueillons une fraction purifiée de capillaires (CECCELLI, 1977).

B - Isolement des capillaires télencéphaliques

1) Prélèvement des hémisphères cérébraux

Les animaux sont sacrifiés par décapitation. Le crâne est rapidement mis à nu, en incisant la peau recouvrant la tête. Ensuite, la boîte crânienne est ouverte à l'aide d'une paire de gros ciseaux. Le schéma 1 indique les différentes étapes de ce prélèvement.

Les hémisphères cérébraux, sitôt dégagés, sont plongés le plus rapidement possible dans le milieu d'homogénéisation oxygéné et réfrigéré, placé dans un bain de glace pilée.

2) Homogénéisation

Le milieu utilisé est celui décrit par MEEZAN et al. (1974). Il s'agit d'une solution d'Earle tamponnée par de l'H.E.P.E.S. à pH 7,4. Cette solution comprend :

116	mM NaCl
16	mM KCl
1	mM NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O
0,8	mM MgSO ₄ , 7 H ₂ O

5,6 mM Glucose
1,8 mM CaCl_2
2,8 mM H.E.P.E.S. (Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N-2 éthane sulfonique)
0,01 % Sérum Albumine Bovine
50 mg Pénicillium G et Strepto-sulfate par litre.

Une dizaine de télencéphales sont ajoutés dans le tube d'un homogénéiseur à main DOUNCE de 40 ml (KONTES), rempli au tiers d'une solution de MEEZAN.

L'homogénéisation s'effectue par vingt mouvements alternatifs du piston de clearance A (La clearance du piston A est supérieure à la clearance du piston B).

Toutes les opérations ultérieures sont effectuées en chambre réfrigérée (+ 4°C).

3) Tamissage

L'homogénat est versé sur un tamis de nylon (Toile à bluter - ZURICHER BEUTELTUCHFABRIK A.G.), dont les mailles ont un côté de 212 μm .

Le matériel retenu sur le tamis est lavé abondamment à l'aide d'une pissette, dont le bec effilé permet d'obtenir un jet puissant de liquide de MEEZAN. Le filtrat est récupéré dans un bēcher.

Ce filtrat, repris dans un homogénéiseur DOUNCE de 100 ml, subit une nouvelle homogénéisation qui, comme la précédente, comporte vingt alleret retour de piston. Cette fois, cependant, nous utilisons le piston de clearance B.

L'homogénat ainsi obtenu est déposé sur un second tamis dont le diamètre des mailles est de 90 μm .

La filtration est réalisée comme précédemment. Mais cette fois, ce sont les éléments retenus sur le tamis qui sont récupérés. Pour ce faire, le tamis est retourné au-dessus d'un béccher, et la toile est là encore lavée par un jet puissant de solution de MEEZAN.

4) Centrifugation

Le contenu du béccher est réparti dans quatre tubes à centrifuger. La centrifugation s'effectue pendant 5 minutes à 3 000 x g (Centrifugeuse CHRIST réfrigérée).

La pellicule de capillaires flottant à la surface du liquide est recueillie et placée dans un béccher contenant 2 ml de solution de MEEZAN.

La totalité de l'isolement, depuis le sacrifice des animaux jusqu'à la récupération des capillaires, est réalisée en une demi-heure environ.

C - Isolement des capillaires cardiaques

1) Prélèvement du matériel

Les animaux sont, là aussi, sacrifiés par décapitation. Après une large thoracotomie, les différents troncs artériels et veineux sont sectionnés. Le coeur, prélevé, est placé dans une solution de MEEZAN. Il est ensuite disséqué afin de ne conserver que les ventricules. Les différentes activités enzymatiques sont déterminées à partir des capillaires de ces ventricules.

2) Isolement des capillaires

Compte tenu de la structure du tissu cardiaque, il est impossible d'homogénéiser avec un homogénéiseur à main les ventricules ainsi isolés. Ceux-ci sont d'abord hachés dans un broyeur FISCHER dont la grille

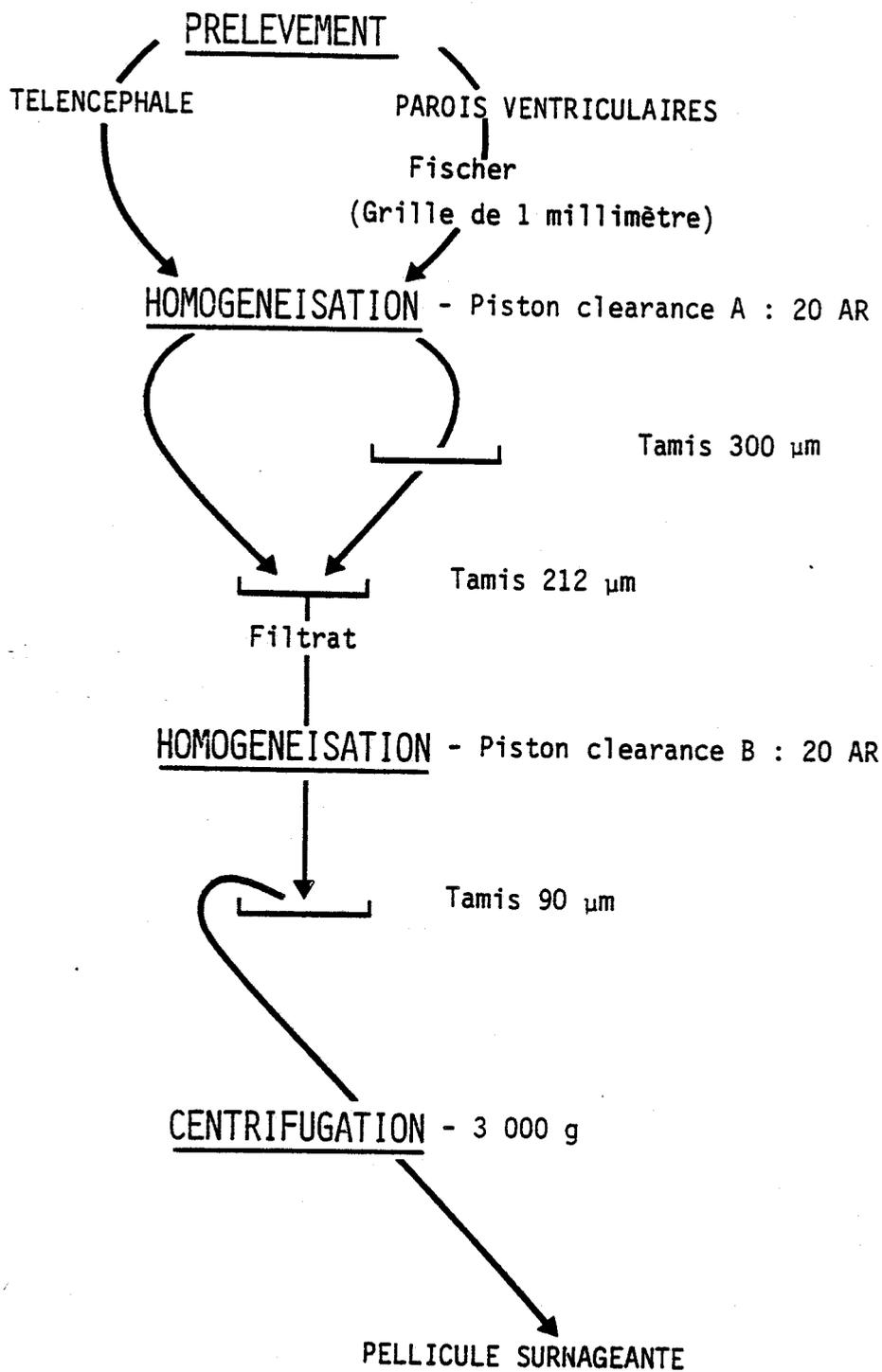


Tableau I

Résumé de la technique d'isolement des capillaires.



est faite de mailles de 1 mm de côté.

Le broyat recueilli est placé dans 30 à 40 ml de milieu de MEEZAN, et homogénéisé par vingt aller et retour d'un piston de clearance A d'un homogénéiseur DOUNCE de 100 ml (KONTES). L'homogénat est versé sur un tamis, dont les mailles ont 300 μ m de côté. Le tamis est lavé abondamment.

Le filtrat ainsi obtenu est ensuite traité de la même manière que le filtrat obtenu après la première homogénéisation lors de l'isolement des capillaires télencéphaliques.

Le *tableau 1* résume les différentes phases des isollements.

D - Contrôle de la pureté de l'isolement en microscopie électronique

Afin de doser l'activité enzymatique sur une fraction composée uniquement de capillaires, il est nécessaire de contrôler la pureté des isollements.

Les capillaires, télencéphaliques ou cardiaques, isolés sont immergés dans une solution fixatrice de glutaraldéhyde à 2,5 % dans un tampon phosphate Soerensen 0,1 M, pH 7,2. Ils sont ensuite centrifugés dans une microcentrifugeuse (TH-12. JANETZKI) à 9 800 x g pendant 15 minutes. Le sédiment ainsi obtenu est lavé pendant une heure dans du tampon phosphate Soerensen 0,1 M, pH 7,2 contenant 0,18 M de saccharose. Après une postfixation à l'acide osmique à 1 % dans le même tampon, le sédiment est de nouveau centrifugé. Un agrégat plus compact est ainsi obtenu. Ce dernier est déshydraté, par passage dans des bains d'alcool de concentrations croissantes, et inclus dans de l'EPON 812 suivant la technique de LUFT (1961). Les coupes sont réalisées avec un couteau de diamant (DIATOME), sur un ultramicrotome REICHERT OM U3.

Avant l'examen en microscopie électronique, les coupes sont

contrastées par une technique de double coloration à l'acétate d'uranyle à 1 % en tampon maléate de sodium 0,2M, pH 5,2 (WATSON, 1958) et au nitrate de plomb (REYNOLDS, 1963).

L'examen des coupes se fait à l'aide d'un microscope électronique ELMISCKOP 1 A de SIEMENS.

Des contrôles sont régulièrement effectués afin de vérifier la reproductibilité de la technique d'isolement.

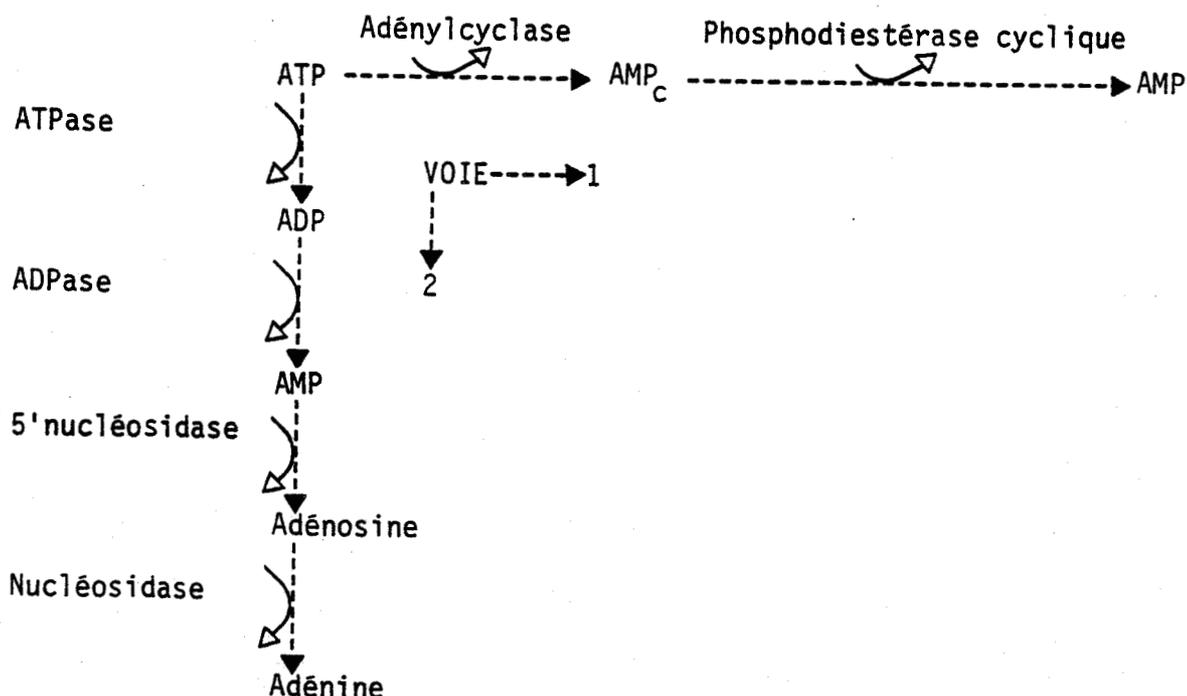
2 - Détermination de l'activité enzymatique des capillaires isolés

C'est le dosage des nucléotides cycliques nouvellement formés qui nous permet de déterminer l'activité adénylcyclasique et guanylcyclasique des capillaires cérébraux et cardiaques.

A - Détermination de l'activité de l'adénylcyclase

1) Principe

Dans la cellule, l'ATP est métabolisé suivant le schéma :



Pour mettre en évidence l'activité adénylcyclasique, il convient, d'une part, d'inhiber l'action de tous les enzymes de la voie 2, d'autre part, l'activité de l'adénylcyclase étant mesurée par la quantité d'AMPc formée, de bloquer l'activité de la phosphodiesterase des nucléotides cycliques.

2) Choix de la méthode

Depuis la mise en évidence par SUTHERLAND et al. (1962) de l'existence de l'AMPc, de nombreuses méthodes de dosage de ce nucléotide cyclique, et de détermination de l'activité adénylcyclasique ont été décrites. Parmi les plus récentes, citons celles de :

- FRANDSEN et KRISHMA (1976), méthode basée sur des dosages radioimmunologiques de l'AMPc ;
- KUO et GREENGARD (1972), fondée sur la capacité de l'AMPc d'activer à faible concentration les protéines kinases qui catalysent la phosphorylation d'un substrat protéique.

Ces techniques étant particulièrement onéreuses, nous nous sommes tournés vers des techniques plus accessibles mais néanmoins fiables.

Les techniques les plus utilisées font appel, soit à la chromatographie de partage bidimensionnelle (MARINETTI et al., 1969), parfois complétée par une migration supplémentaire d'un système solvant dans une troisième dimension (DOUSA et RYCHLICK, 1970), soit à la chromatographie échangeuse d'ions (KRISHNA et al., 1968).

Toutefois, ces procédés sont généralement longs et ne séparent pas, en un seul temps, tous les métabolites de l'ATP.

RAO et al. (1971) ainsi qu'OSNES et al. (1972) proposent des méthodes plus simples utilisant la chromatographie monodimensionnelle. Mais celles-ci ne résolvent pas le problème de la séparation de tous les dérivés de l'ATP.

Notre choix s'est porté sur la technique mise au point par VERBERT et CACAN (1972). Elle utilise un procédé d'électrophorèse sur papier. Ce procédé permet de séparer parfaitement adénine, adénosine, AMPc d'un ensemble comprenant l'ATP, l'ADP et l'AMP.

Afin d'obtenir une séparation complète de tous les métabolites de l'ATP, nous avons mis au point une méthode de chromatographie sur papier dans un solvant introduit par TURBA et TURBA (1951) pour séparer l'ATP de l'ADP.

3) Milieu d'incubation

La composition du milieu d'incubation est la suivante :

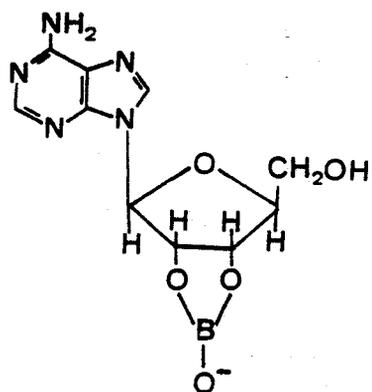
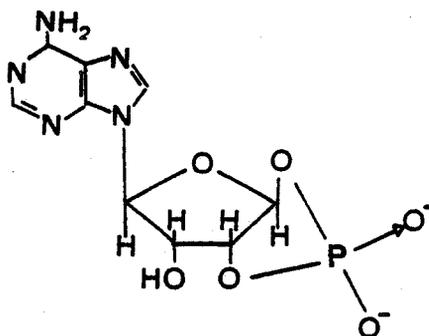
- Tris HCL pH 7,4	20 mM
- MgCl ₂	4 mM
- Théophilline	10 mM
- ATP non radioactif	2 mM
- AMPc non radioactif	2 mM
- Phosphoénolpyruvate	50 mM
- Pyruvate kinase	5 µl
- [³ H]-ATP	5 µCi - 0,2 nm

La théophylline et l'AMPc non radioactif, en concentration élevée ont pour but d'atténuer, voire d'inhiber, l'action de la phosphodiesterase des nucléotides cycliques (DRUMMOND et DUNCAN, 1970).

Le phosphoénolpyruvate et la pyruvate kinase constituent un système régénérateur d'énergie s'opposant à la dégradation de l'ATP par la voie 2 et oriente la réaction vers la voie 1 (DRUMMOND et DUNCAN, 1970).

Les capillaires isolés sont homogénéisés dans un appareil de Potter - Elvehjem BRAUN, pendant trois fois vingt secondes à 1 500 tours par minute, dans 2 ml de tampon Tris-HCl.

Ado

AMP_C

AMP, ADP, ATP

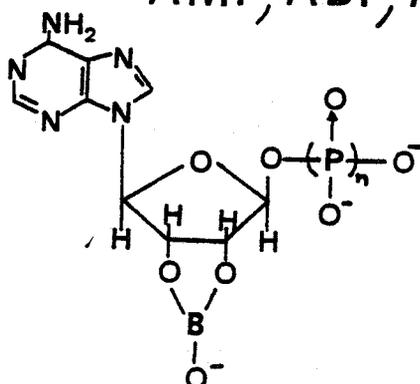


Figure 1

Structure des complexes boratés formés avec l'adénosine et ses composés phosphorylés

Ensuite, dans un tube à essais, on verse 100 μ l de milieu d'incubation et 150 μ l de broyat de capillaires. Le tout est vigoureusement agité puis incubé pendant une heure, dans un bain-marie à 37°C. La réaction est arrêtée, en ajoutant, pour 100 μ l de milieu d'incubation, un excès de chacun des métabolites de l'ATP (20 μ g).

4) Electrophorèse

a - Principe

La *figure 1* montre que l'AMPc, contrairement à l'adénosine et aux dérivés phosphorylés de celle-ci, ne peut pas former de complexes boratés. Il devient alors possible, en ajustant le pH à une valeur correcte, de réduire l'ionisation des groupements boratés de l'adénosine et de ces dérivés phosphorylés (pK 9), tout en maintenant celle du groupement phosphorylé de l'AMPc (pK 1) et d'obtenir ainsi la séparation électrophorétique des différents composés. La formation de complexes boratés ne gêne en rien la migration des nucléotides 5' phosphate, puisque l'influence de l'ionisation des groupements phosphorylés reste prépondérante (CACAN, 1974).

b - Mode opératoire

150 μ l de l'incubat sont déposés sur une ligne tracée à 9 cm du bord inférieur de papier Whatman 3 MM. La feuille est imprégnée par un tampon borate de sodium à 1 % (P/V), ajustée à pH 7,5 par l'addition d'acide citrique 1 M.

VERBERT et CACAN (1972) utilisent un procédé d'électrophorèse à haut voltage (3 000 V - 45 minutes), ce qui leur permet d'obtenir une séparation complète de tous les dérivés de l'ATP. L'électrophorèse à haut voltage ne permettant pas l'examen d'un grand nombre d'échantillons à la fois, nous avons dû pratiquer des électrophorèses à bas voltage (200 V - 16 heures), ce qui peut expliquer la mauvaise séparation de l'ATP, l'ADP et l'AMPc (*Figure 2a*).

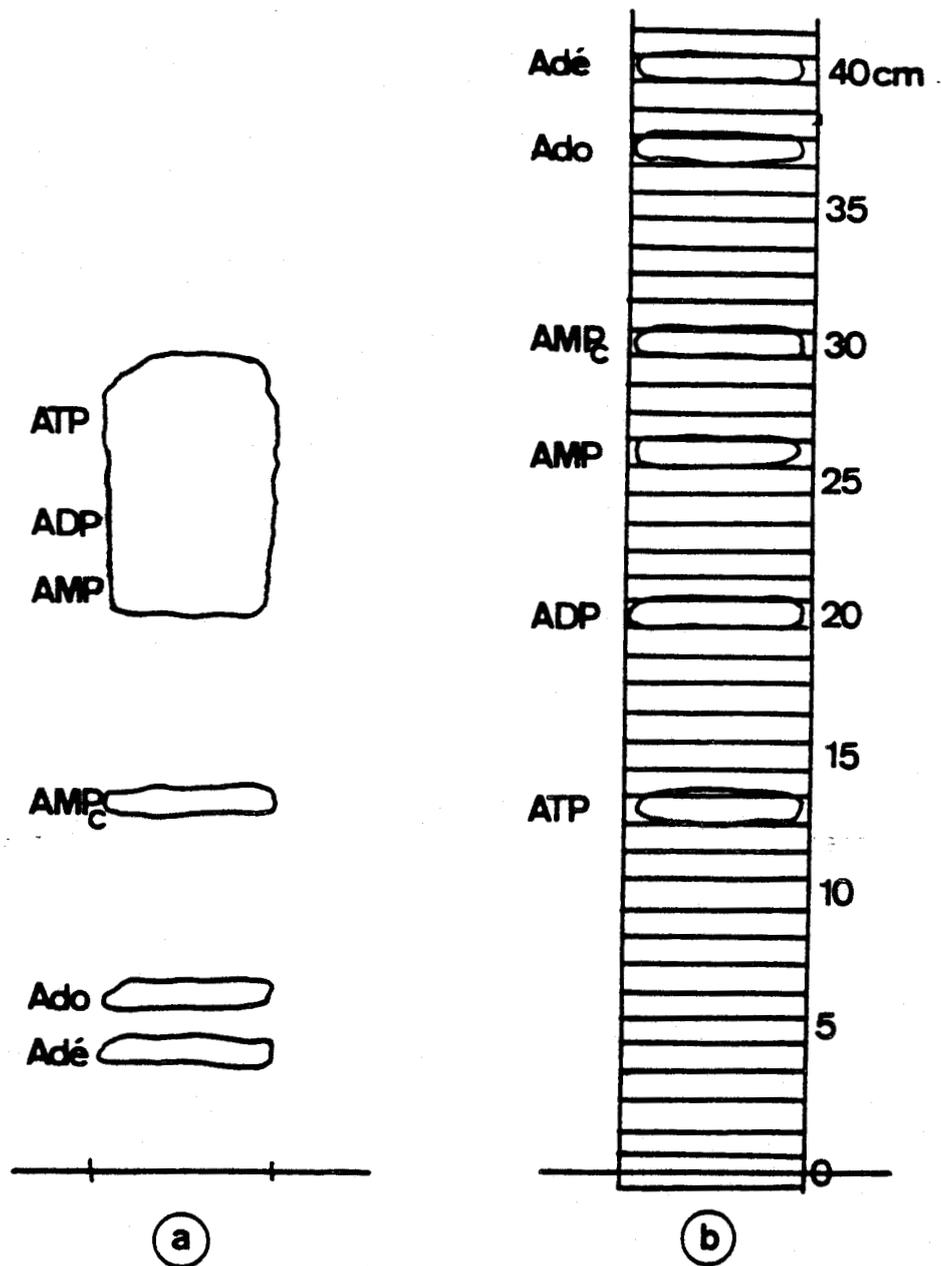


Figure 2

Séparation des différents métabolites de l'ATP :

a - Migration électrophorétique des dérivés de l'adénine. L'électrophorèse, à 200 V - 15 mA, a une durée de 16 heures.

b - Migration chromatographique des dérivés de l'adénine. La chromatographie est réalisée en tampon isobutyrique 66-1-33, pendant 18 heures.

Les nombres, indiqués en cm, donnent la distance qui sépare chaque métabolite de l'ATP du dépôt initial.

Les rectangles de 8 cm de long sur 1 cm de large, permettent, une fois découpés, de compter dans chaque flacon de comptage, exactement la même surface de papier.

5) Chromatographie

a - Tampon

La chromatographie est réalisée en une seule étape dans un tampon isobutyrique 66-1-33, pH 3,7 (66 ml d'acide isobutyrique, 1 ml de NH_4OH concentré, 33 ml d' H_2O). Il est réalisé, en versant 10 ml de NH_4OH concentré dans 329 ml d'eau distillée, puis en ajoutant 661 ml d'acide isobutyrique.

b - Mode opératoire

30 μl de l'incubat sont déposés sur une ligne tracée à 9 cm du bord inférieur d'une feuille de papier Whatman 3 MM. La chromatographie s'effectue pendant 18 heures environ à la température de la pièce (Figure 2b).

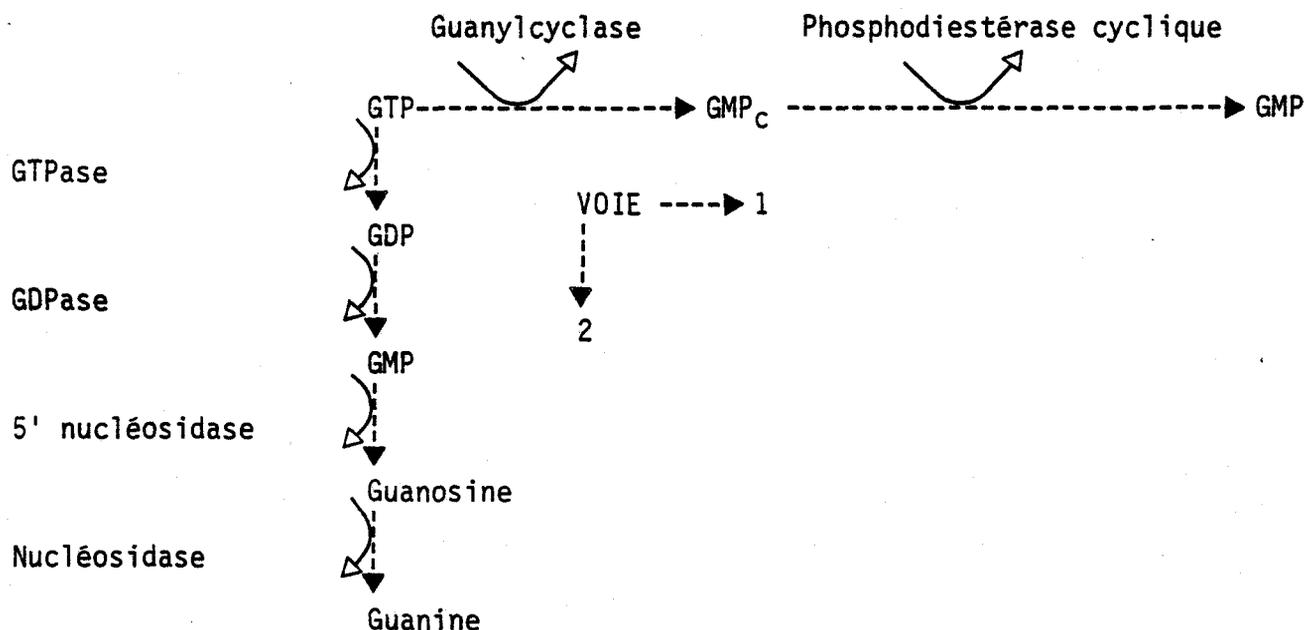
6) Dosage des protéines

Le dosage des protéines des homogénats totaux et des fractions capillaires est déterminé par la méthode de LOWRY et al. (1951).

B - Détermination de l'activité guanylcyclasique

1) Principe

Dans la cellule le GTP est métabolisé suivant le schéma :



On voit donc que, comme lors de l'étude de l'adénylcyclase, il suffit d'inhiber l'activité des enzymes dégradant le GTP en guanine, et le GMPc en GMP, pour que la concentration en GMPc augmente dans le milieu d'incubation et soit un reflet de l'activité guanylcyclasique.

2) Choix de la méthode

Deux méthodes différentes sont généralement utilisées pour le dosage de la guanylcyclase. La première, basée sur des dosages radio-immunologiques du GMPc, a été décrite par KIMURA et MURAD (1974). Dans la seconde la plus couramment utilisée, le GMPc formé lors de l'incubation est isolé par chromatographies successives sur alumine et résine échangeuses d'ions (LIMBIRG et LEFKOWITZ, 1975 ; SULAKHE et al., 1976b ; ZWILLER et MANDEL, 1978).

Mais ces méthodes ne permettent pas d'obtenir simultanément tous les métabolites du GTP (GDP, GMPc, GMP, Guanosine, Guanine). C'est pourquoi, nous avons mis au point une technique de chromatographie sur papier, qui a l'avantage de séparer et de permettre la récupération de tous les métabolites du GTP.

3) Milieu d'incubation

La composition du milieu d'incubation, décrit pour le dosage de l'activité guanylcyclasique, varie énormément suivant les auteurs. C'est pourquoi, nous avons procédé à des essais destinés à déterminer le milieu d'incubation susceptible de nous donner une activité guanylcyclasique maximale. La composition qualitative du milieu finalement adopté est la suivante :

- | | |
|-----------------------|-------|
| - Tris HCl pH 7,4 | 20 mM |
| - MnCl ₂ | 5 mM |
| - GMPc non radioactif | 2 mM |
| - Phosphoénolpyruvate | 10 mM |

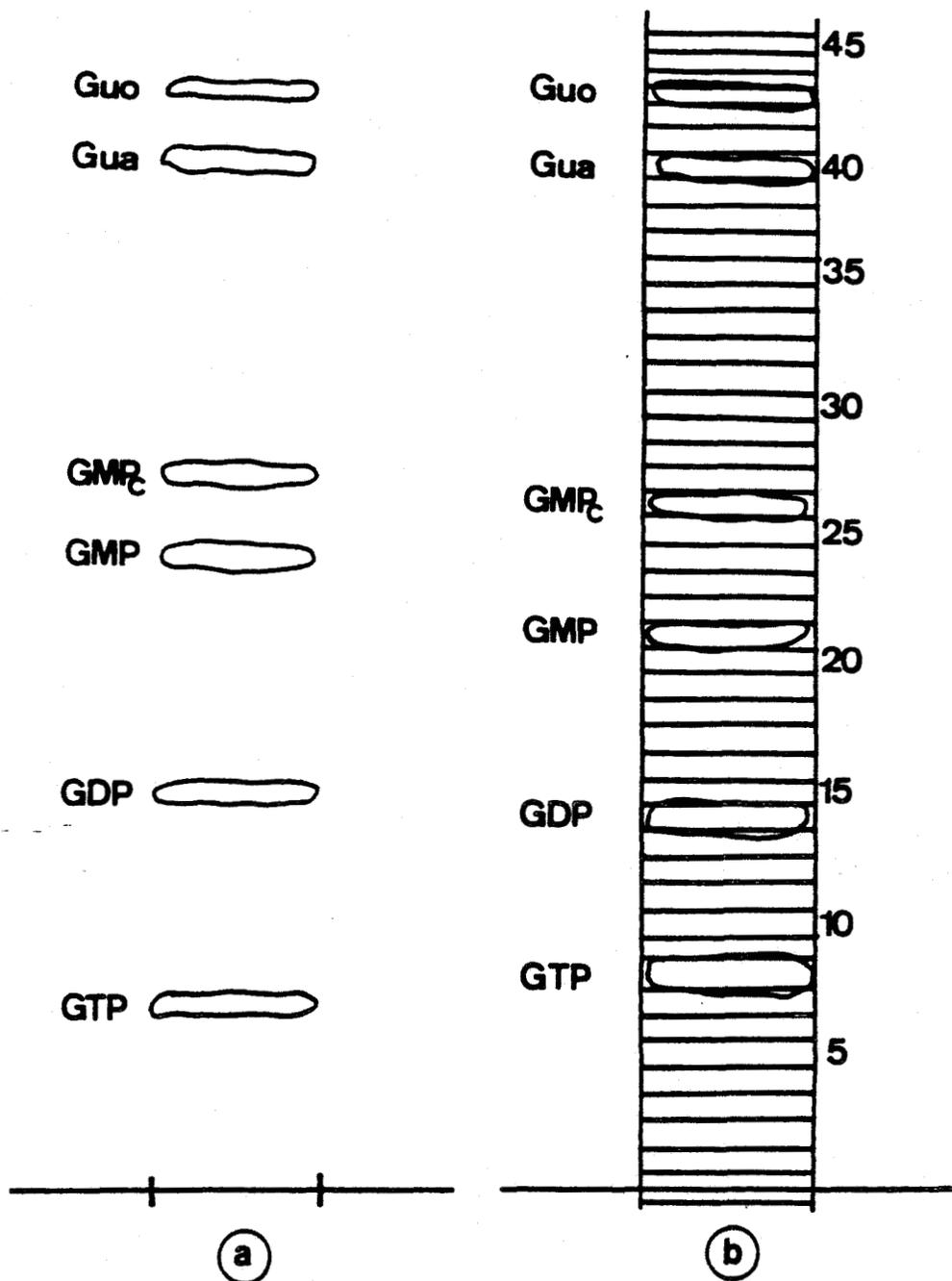


Figure 3

Séparation chromatographique de la guanine et ses dérivés :

a - Migration chromatographique des métabolites du GTP, en tampon isobutyrique 57 - 4 - 39, pH = 4,3 (Acide isobutyrique : 57 ml ; NH₄OH concentrée : 4 ml ; eau : 39 ml) pendant 30 heures, à la température du laboratoire.

b - Migration chromatographique des métabolites du GTP, en tampon isobutyrique 66 - 1 - 33, pH = 3,7 (Acide isobutyrique : 66 ml ; NH₄OH concentrée : 1 ml ; eau : 33 ml) pendant 30 heures, à la température du laboratoire.

Les nombres, indiqués en cm, donnent la distance qui sépare chaque métabolite du GTP du dépôt initial.

Les rectangles de 8 cm de long sur 1 cm de large permettent, une fois découpés, de compter dans chaque flacon de comptage exactement la même surface de papier.

- Pyruvate kinase	5 µg
- Théophilline	10 mM
- Triton X-100	0,75 %
- [³ H]-GTP	5 µCi - 0,2 nm

La technique opératoire est identique à celle utilisée lors de l'étude de l'adénylcyclase. La durée de l'incubation est cependant ramenée à vingt minutes (*voir résultats*).

4) Chromatographie

Afin d'obtenir une meilleure séparation entre le GTP et le GDP, TURBA et TURBA (1951) utilisent un tampon isobutyrique 57-4-39, pH 4,3 (acide isobutyrique, NH₄OH concentré, eau distillée). L'expérience nous a montré qu'avec le tampon 66-1-33, pH 3,7 la séparation ~~entre~~ le GMPc et le GMP est meilleure (*Figure 3*). Le protocole expérimental est identique à celui utilisé lors de l'étude de l'adénylcyclase, en tampon 66-1-33, mais la chromatographie dure 30 heures à la température ambiante.

L'analyse de chaque tache, révélée en lumière ultraviolette, se fait exactement de la même façon que lors de l'étude de l'activité adénylcyclasique.

C - Etude de l'inhibition de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques

Cette étude de l'inhibition de la phosphodiesterase des nucléotides cycliques a été réalisée dans les mêmes conditions que les études des activités adénylcyclasiques et guanylcyclasiques.

Cependant, de l'AMPc ou du GMPc radioactifs sont substitués dans le milieu d'incubation à l'ATP ou GTP radioactifs.

L'efficacité de l'inhibition de la phosphodiesterase des

nucléotides cycliques nous est donnée par la quantité d'AMPc ou GMPc radioactif dégradée.

Différents inhibiteurs ont été essayés, certains non spécifiques : Dithiothreitol (Sigma), d'autres spécifiques : Caféine (Sigma), Théophylline (Sigma) et dérivé RO 201724/001 (Laboratoires Hoffman-La Roche).

RESULTATS

RESULTATS

1 - CONTROLE DE LA PURETE DE L'ISOLEMENT EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

A - Isolement des capillaires télencéphaliques

La fraction capillaire télencéphalique peut être considérée comme presque entièrement constituée de capillaires. L'examen au microscope électronique (*Figure 4*) montre que les capillaires représentent 90 à 95 % de la totalité des éléments isolés. Quelques artérioles, veinules et quelques noyaux constituent les autres éléments.

B - Isolement des capillaires cardiaques

La fraction capillaire cardiaque n'est pas aussi pure que la fraction capillaire télencéphalique. Elle contient environ 75 à 80 % de capillaires. Les artérioles et les veinules représentent elles environ 5 à 10 % des autres éléments. Le reste consiste en fragments de cellules musculaires cardiaques, comprenant essentiellement des myofilaments et des mitochondries (*Figure 5*).

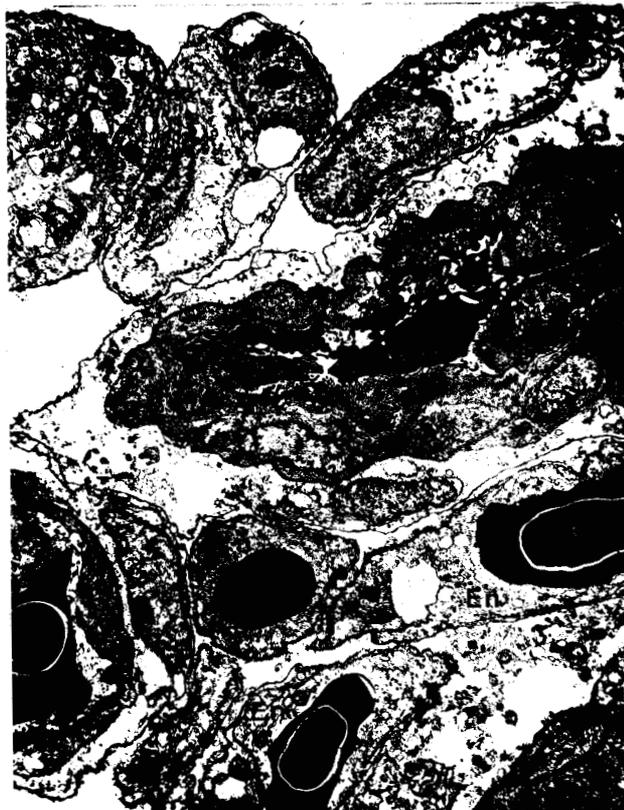
2 - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ADENYLCYCLASIQUE

A - Analyse de la séparation de la radioactivité lors de l'électrophorèse et de la chromatographie

La *figure 2* (*page 18*) montre les résultats obtenus après séparation des différents métabolites de l'ATP, soit par électrophorèse (*Figure 2a*), soit par chromatographie (*Figure 2b*).



LILLE



LILLE

Figure 4

Fraction capillaires isolés à partir de télencéphales de Poulets âgés de 30 jours

La plupart des vaisseaux visibles sont des sections de capillaires dont quelques-uns contiennent encore des érythrocytes (E). Les cellules endothéliales (En) sont bien conservées et généralement entourées de leur basale (B). Les autres constituants de cette fraction sont des vaisseaux plus larges, spécialement de petites artérioles (Ar). Quelques vaisseaux sont encore entourés par des cellules périvasculaires et des éléments cellulaires dont quelques uns sont des pieds astrocytaires (A).

Photo A : échelle 1 500

Photo B : échelle 2 500

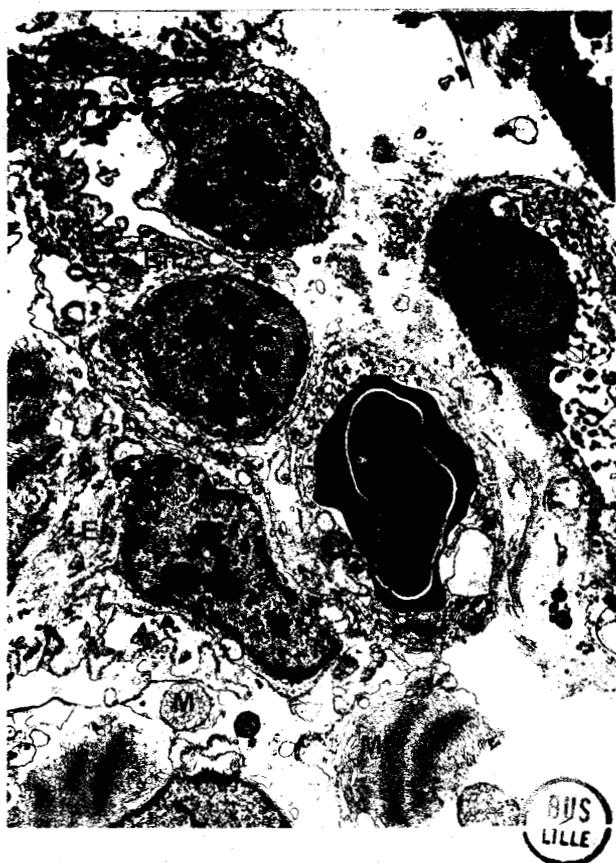


Figure 5

Fraction capillaires isolés à partir de ventricules de Poulets âgés de 30 jours

Les capillaires sont toujours les éléments les plus importants de cette fraction (environ 75 %). L'origine de la contamination n'est pas seulement vasculaire mais aussi musculaire (environ 15 %), en particulier des myofibrilles (Mf) et des mitochondries (M). Les cellules endothéliales (En) sont souvent entourées de leur lame basale (B) et sont plus ou moins altérées.

Photo A : échelle 7 500

Photo B : échelle 2 500

Quelle que soit la méthode utilisée, la tache visualisant l'AMPc est nettement délimitée.

Mais la séparation de tous les métabolites de l'ATP, en électrophorèse (*Figure 2a*), n'est pas parfaite. En effet, la présence de sels entraîne très souvent une mauvaise répartition de l'ATP, ADP et l'AMP, et ceux-ci ne forment qu'une seule tache.

Par contre, la technique chromatographique donne, facilement en une seule étape, une bonne séparation de tous les métabolites de l'ATP (*Figure 2b*). De plus, cette méthode est très peu sensible à la concentration en sel du dépôt et permet donc l'analyse d'une quantité minime de matériel.

Pour ces raisons, la chromatographie sur papier a été préférée à l'électrophorèse, en vue d'une meilleure séparation de tous les métabolites de l'ATP.

B - Activité adénylcyclasique

1) Distribution de la radioactivité le long du chromatogramme

L'analyse systématique de la radioactivité le long du chromatogramme (*Figure 6a*) montrent une succession de pics. Ces pics correspondent à la distribution des taches visualisées en lumière ultraviolette (*Figure 6b*).

2) Détermination de l'activité adénylcyclasique

a - Mesure de la radioactivité liée aux différents métabolites de l'ATP

Soit E, l'ensemble des coups par minute (cpm) donné par le

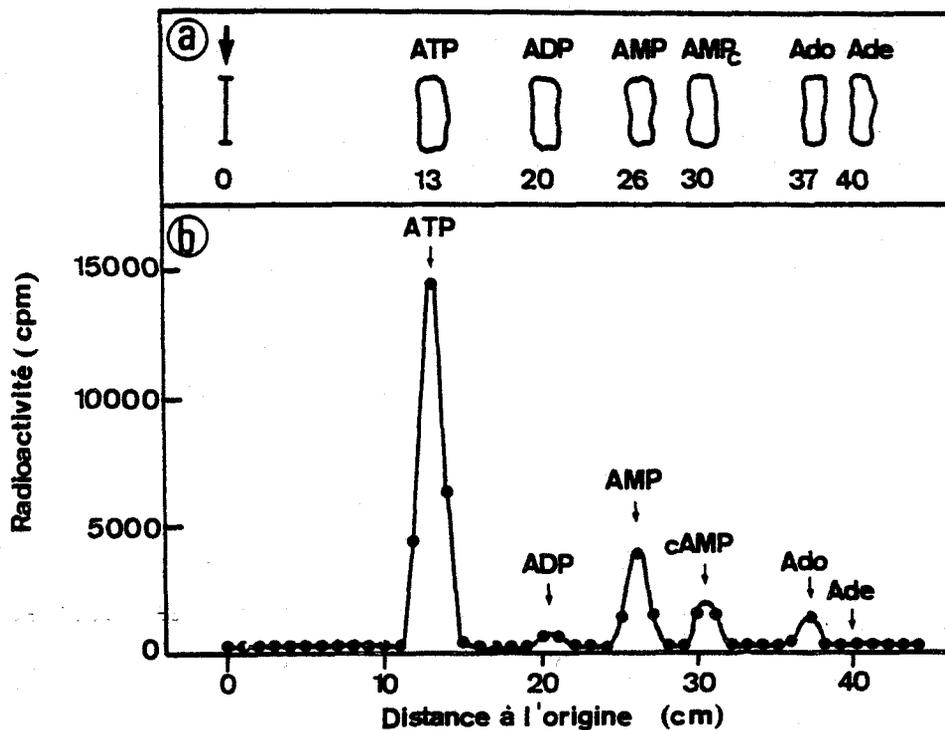


Figure 6

a - Séparation chromatographique des métabolites de l'ATP. Un aliquot (40 μ l) du milieu d'incubation est placé sur un papier WHATMAN 3 MM. La chromatographie dure 18 heures, à la température ambiante. Elle est réalisée dans le solvant suivant : acide isobutyrique, NH_4OH concentrée, eau (66 - 1 - 33), pH 3,7. Cette chromatographie permet une séparation de tous les dérivés de l'ATP. L'abscisse donne la distance, exprimée en cm, des différentes taches à l'origine.

b - Distribution de la radioactivité le long du chromatogramme. Les capillaires télencéphaliques (1 mg) sont incubés à 37°C pendant une heure, dans un milieu d'incubation décrit dans le texte page 15.

compteur à scintillation (INTERTECHNIQUE SL 30) sur l'ensemble du chromatogramme.

Ces cpm correspondent à la radioactivité des 5 μ Ci d'ATP introduit dans le milieu d'incubation.

A cette valeur nous devons retirer le bruit de fond propre à chaque flacon de comptage. Avant chaque manipulation nos flacons de comptage, remplis de liquide de scintillation, sont précomptés. Le nombre de cpm de chaque flacon de comptage vide correspond au bruit de fond de chacun d'eux. Ce bruit de fond varie de 23 à 47 cpm. Dans nos calculs, nous surestimons le bruit de fond en lui donnant la valeur de 50 cpm.

Nous devons retirer à E cpm :

50 cpm x nombre de flacons de comptage. Le nombre de cpm provenant uniquement de l'ATP radioactif placé dans le milieu est de :

$$E - (50 \text{ cpm} \times \text{nombre de flacons}) = \text{cpm (ATP radioactif)}$$

b - Calcul du nombre de cpm provenant de l'AMP_c radioactif

Il suffit de comptabiliser le nombre de cpm correspondant au pic d'AMP_c radioactif sur le chromatogramme.

Si x est ce nombre, il convient là aussi de retrancher la radioactivité due au bruit de fond :

$$x - (50 \text{ cpm} \times \text{nombre de flacons}) = \text{cpm (AMP}_c \text{ radioactif)}.$$

c - Calcul du nombre de moles d'ATP présentes dans le milieu d'incubation

On sait qu'une millimole d'ATP radioactif correspond à 25 Ci. Dans notre milieu, nous utilisons 5 μ Ci, c'est-à-dire 0,2 nanomole d'ATP radioactif.

A cet ATP radioactif, il convient d'ajouter l'ATP non radioactif présent dans le milieu d'incubation : 2 mM final (100 l d'incubat + 150 l de milieu d'incubation), soit 500 nanomoles. Il y a donc 500 + 0,2, soit environ 500 nanomoles dans notre milieu d'incubation.

d - Activité adénylcyclasique

Le nombre de moles d'AMP_C radioactif formées au cours de l'incubation est de :

$$\frac{500 \text{ nM} \times \text{cpm (AMP}_C\text{ radioactif)}}{\text{cpm (ATP radioactif)}} = a \text{ nanomole d'AMP}_C\text{ radioactif}$$

pour une incubation de 60 minutes avec x mg de protéine.

L'activité spécifique de l'enzyme, pour une incubation de 60 minutes et pour un milligramme de protéine est de :

$$\frac{a \text{ nanomole d'AMP}_C\text{ radioactif}}{x} = A$$

soit : A nmole d'AMP_C radioactif/60 minutes/mg protéine

3) Etude cinétique de l'activité de l'adénylcyclase

Une étude cinétique de la formation de l'AMP_C radioactif par une fraction de capillaires télencéphaliques ou cardiaques est réalisée en vue de déterminer la durée optimale de l'incubation. Nous réalisons la même étude avec les broyats télencéphaliques et cardiaques. Les résultats sont présentés *figure 7*.

La mesure d'une activité enzymatique doit se faire à vitesse initiale, c'est-à-dire dans la partie linéaire de la courbe, où la vitesse

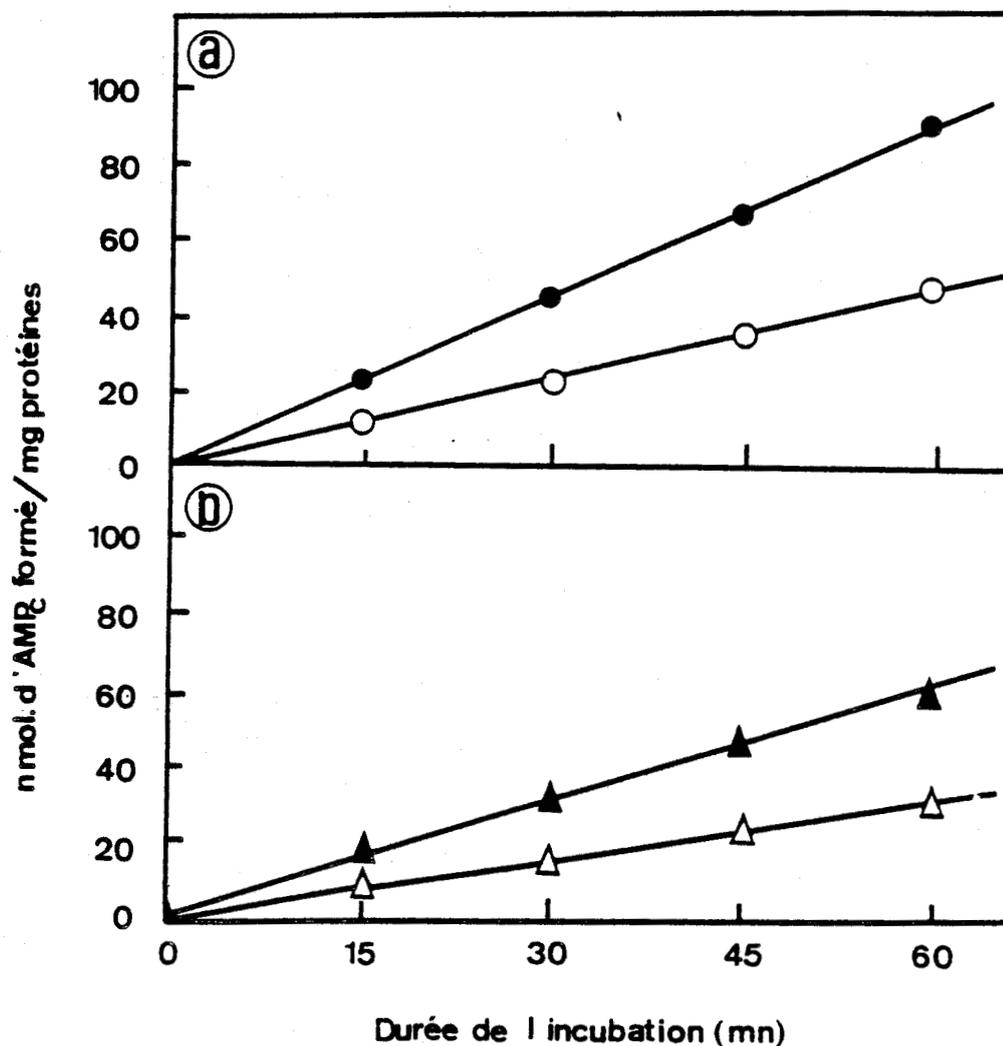


Figure 7

Etude cinétique de la formation de l'AMP_c

Les expériences sont réalisées à 15, 30, 45 et 60 minutes, dans le milieu d'incubation décrit dans "Matériels et Méthodes", page .

Pour chaque fraction étudiée :

- a - ● Homogénat télencéphalique
- Homogénat cardiaque
- b - ▲ Capillaires cardiaques
- △ Capillaires télencéphaliques.

La vitesse de formation de l'AMP_c est constante. La quantité en protéines, lors de chaque expérience, est de 1 mg.

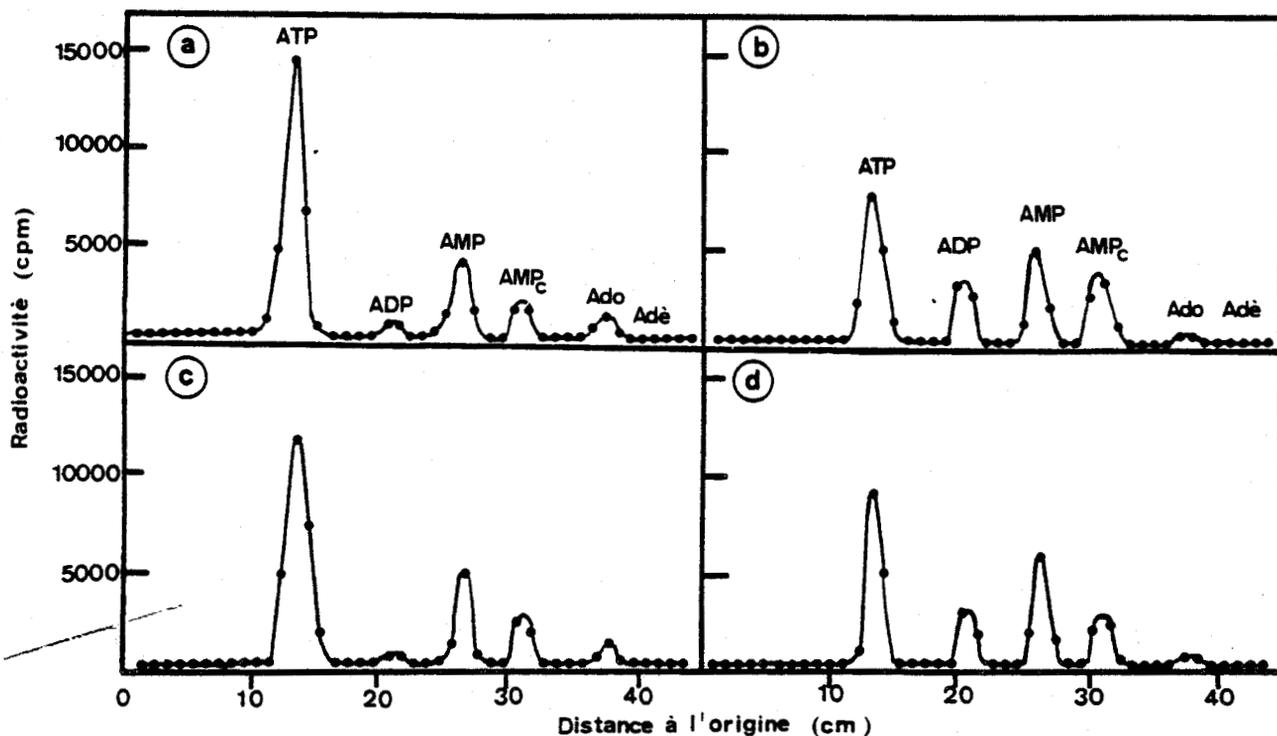


Figure 8

Formation d'AMP_c dans les différents échantillons

Distribution de la radioactivité le long du chromatogramme après incubation durant une heure, à 37°C, dans un milieu contenant de l'ATP radioactif avec :

- a - Capillaires cérébraux
- b - Capillaires cardiaques
- c - Homogénat télencéphalique
- d - Homogénat ventriculaire

La séparation sur papier WHATMAN 3 MM a duré 18 heures, à la température ambiante. Elle est réalisée dans un solvant acide isobutyrique 66 - 1 - 33, pH 3,7.

La radioactivité est exprimée en cpm sur l'axe des ordonnées. L'abscisse donne la distance, en cm, des différentes taches à l'origine.

Cap. cérébraux	Cap. cardiaques	Homog. télencéphaliques	Homog. ventriculaires
nm d'AMP _c formé / mg protéines / 60 minutes			
27,4	59,0	88,4	62,2
41,8	48,0	93,7	71,5
28,3	55,8	83,7	70,4
40,1	65,2	88,7	68,0
26,6	41,7	98,3	66,2
35,0	60,5	87,9	55,1
27,4	58,2	99,7	61,8
29,1	37,0	84,8	56,6
33,4	56,3	91,7	57,8
25,8	45,2	103,0	65,4
m = 31,5±5,5 nmoles	m = 52,7±8,7 nmoles	m = 92,0±6,2 nmoles	m = 63,5±5,5 nmoles

Tableau II

Activité adénylcyclasique des capillaires cérébraux et cardiaques et des homogénats télencéphaliques et ventriculaires.



de formation du composé reste constante.

Pour chaque fraction étudiée, le taux de formation de l'AMP_c radioactif reste constant tout au long de l'incubation. Par conséquent, afin d'avoir le plus de précision possible, toutes les études comparatives de l'activité adénylcyclasique sont réalisées avec une durée d'incubation de 60 minutes.

4) Résultats

Un exemple de profil chromatographique obtenu lors d'une expérience pour chaque fraction est illustré *figure 8*.

L'analyse de ces différents profils nous montre la présence de quantité variable d'AMP radioactif, suivant le type de tissu étudié. En effet, le pic d'AMP_c radioactif au niveau des capillaires cérébraux n'atteint que 2 000 cpm environ, tandis que celui détecté dans le télencéphale atteint 5 000 cpm. Mais ces valeurs n'ont de signification que lorsqu'elles sont exprimées en activités spécifiques.

De plus, la présence d'une quantité d'AMP radioactif formé au cours de l'incubation dans chaque type de fraction suggère l'existence d'une dégradation partielle de l'AMP_c radioactif nouvellement formé, dégradation qui ne devrait pas se produire puisque la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques est théoriquement inhibée par la théophylline.

Il semble donc que l'inhibition de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques ne soit pas réalisée à 100 %. Ce fait nous a conduit à étudier d'une façon plus précise l'inhibition de cet enzyme.

L'activité adénylcyclasique, déterminée à partir de dix expériences (*Tableau II*) pour chaque type de préparation, est illustrée *figure 9*.

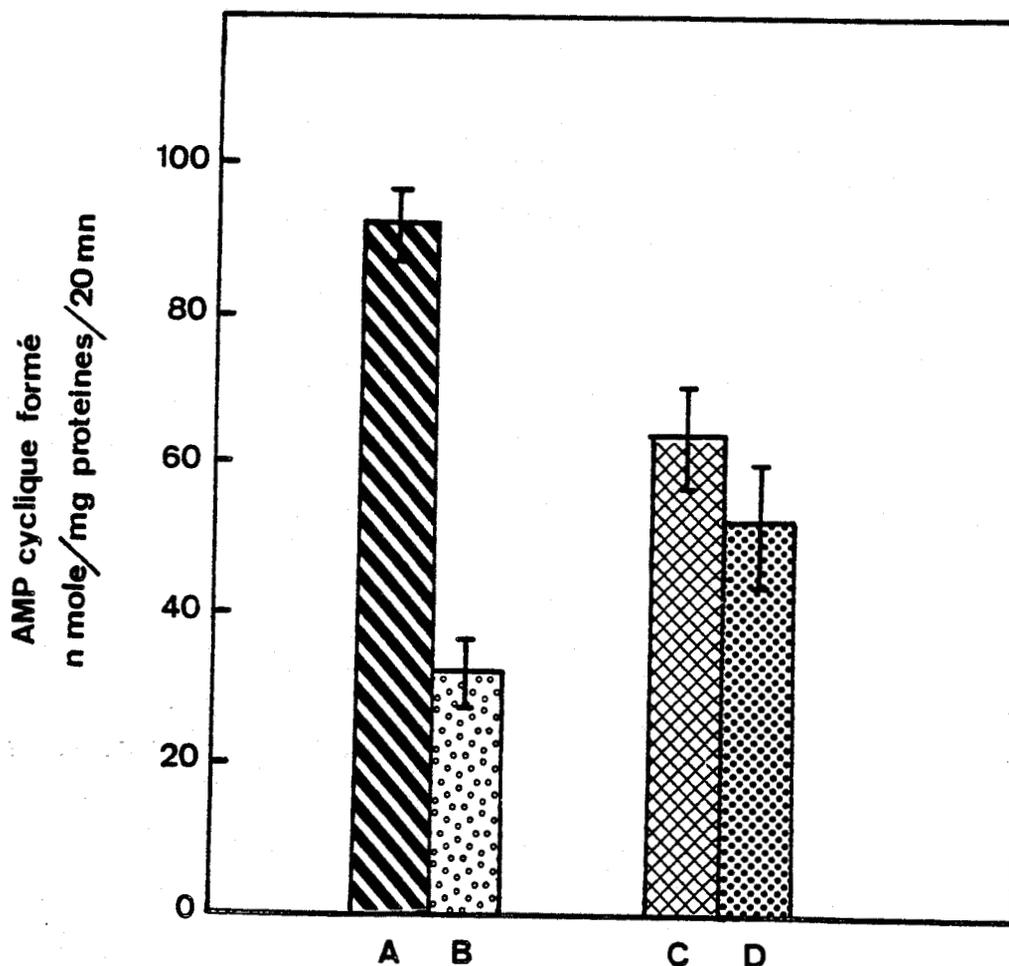


Figure 9

Ce diagramme donne les résultats de l'étude comparative de la formation de l'AMP_c dans les différentes fractions étudiées.

- A Homogénat télencéphalique
- B Capillaires cérébraux
- C Homogénat cardiaque
- D Capillaires cardiaques

Les homogénats télencéphaliques et ventriculaires ont une activité moyenne respectivement de 92 et 63,5 nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes.

Les capillaires télencéphaliques et cardiaques ont une activité moyenne respectivement de 31,5 et 52,7 nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes.

Les moyennes et les écarts types sont calculés à partir de 10 expériences (voir tableau II).

L'activité spécifique trouvée au niveau des capillaires cardiaques ($52,7 \pm 8,7$ nmol. d'AMP_C radioactif formé/mg protéines/60 minutes) est très proche de celle trouvée au niveau de l'homogénat ventriculaire ($63,5$ nmol. d'AMP_C radioactif formé/mg protéine/60 minutes).

Par contre, l'activité mesurée au niveau des capillaires télencéphaliques ($31,5$ nmol. d'AMP_C radioactif/mg protéine/60 minutes) est beaucoup plus faible que celle obtenue avec un homogénat de télencéphale ($92,0 \pm 6,2$ nmol. d'AMP_C radioactif/mg protéine/60 minutes).

C - Etude de l'inhibition de la 3'-5' phosphodiesterase cyclique

Ainsi que nous l'avons suggéré (CECCELLI, 1977) l'inhibition de la 3',5' phosphodiesterase de nucléotides cycliques ne semble pas totale. De plus, l'AMP est obtenu en quantités variables, comme nous venons de le voir, en fonction de la fraction étudiée. La caféine, utilisée au début de nos recherches, comme inhibiteur est-elle en cause ?

Pour le vérifier, nous remplaçons la caféine par d'autres inhibiteurs de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques, déjà utilisés par d'autres chercheurs :

- Dithiothréitol (PANNBACKER et BREVARD, 1972)
- Théophilline (SWISLOCKI et TIERNEY, 1973)
(RYAN et STORM, 1974)
- Dérivé RO 20 1724 (4-(3-butoxy-4-méthoxy)-2-imidazolinone)
(SHEPPARD et WIGGAN, 1971)
(NAHORSKI et ROGERS, 1976).

Les expériences d'inhibition sont réalisées sur chaque fraction (capillaires télencéphaliques et cardiaques, homogénats télencéphaliques et cardiaques), avec les produits précités, à des concentrations de 2,5 et 10 mM. De plus, pour chaque type d'expérience, les concentrations d'AMP_C non radioactif sont de 2 à 5 mM.

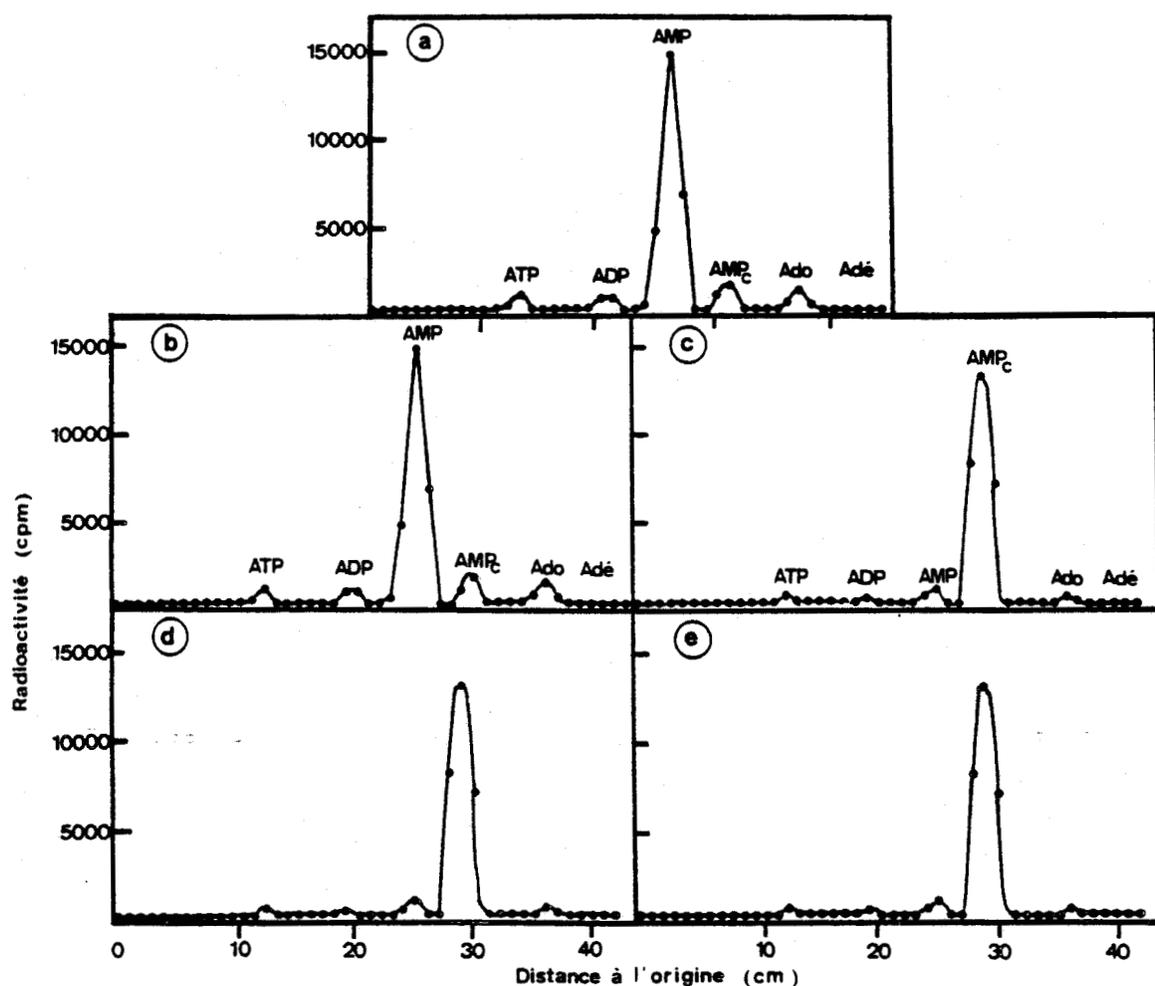


Figure 10

Etude de l'inhibition de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques

Distribution de la radioactivité, le long des chromatogrammes, après incubation de capillaires cérébraux, durant 60 minutes, dans un milieu contenant de l'AMP_c radioactif et comme inhibiteur de la 3',5' phosphodiesterase cyclique :

- a - Pas d'inhibiteur
- b - Du dithiothréitol
- c - De la caféine
- d - Du dérivé RO 20/1724
- e - De la théophilline.

La radioactivité est exprimée en cpm sur l'axe des ordonnées, tandis qu'en abscisse figurent, en cm, les distances des différentes taches à l'origine.

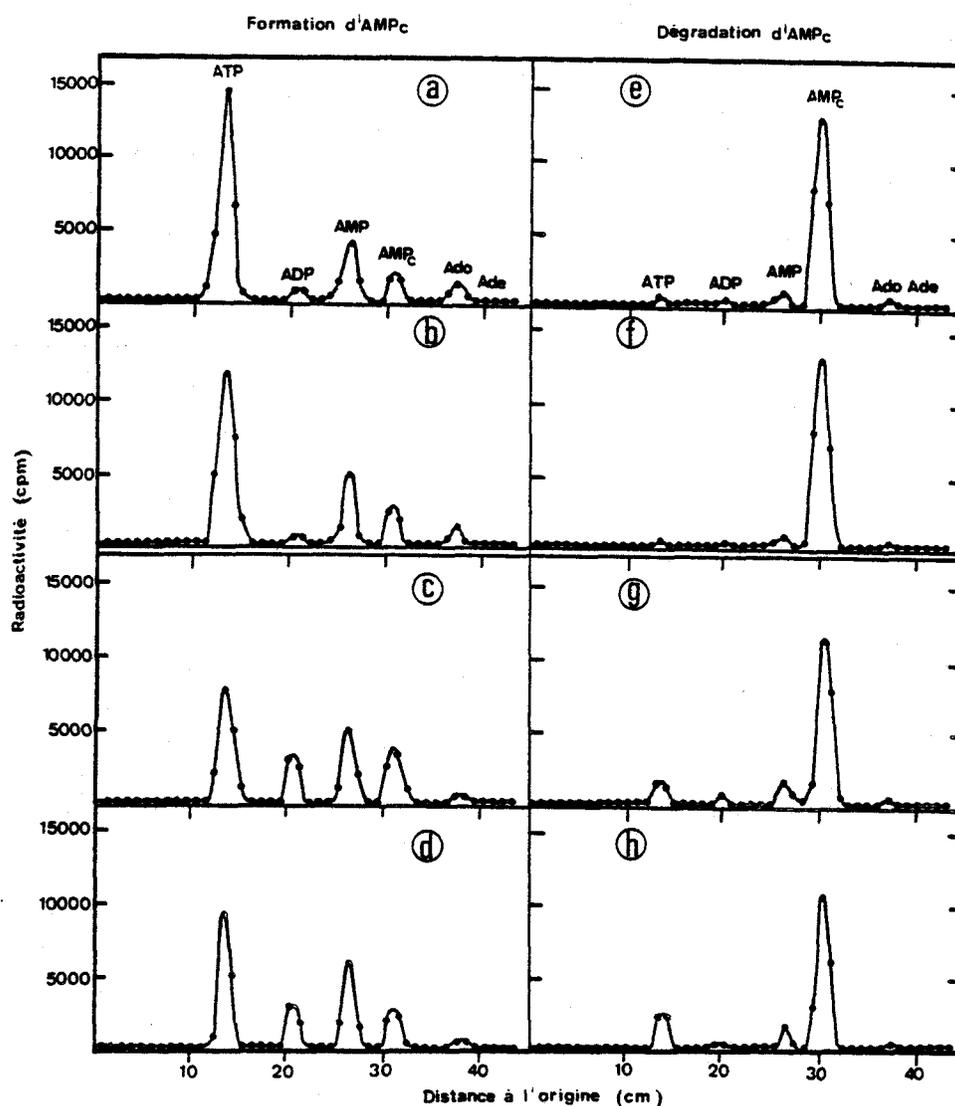


Figure 11

Chacun des chromatogrammes représente la radioactivité détectée le long des chromatogrammes après incubation des divers échantillons pendant une heure, à 37°C avec de l'ATP radioactif (a - b - c - d) ou de l'AMP_c radioactif (e - f - g - h).

La colonne de gauche indique les quantités d'AMP_c radioactif formées, celle de droite, les quantités d'AMP_c dégradées dans le même temps.

Les chromatogrammes représentés correspondent de haut en bas : aux capillaires cérébraux, a - e ; aux capillaires cardiaques, b - f ; au broyat télencéphalique, c - g ; au broyat ventriculaire, d - h.

La radioactivité est exprimée en cpm sur l'axe des ordonnées tandis qu'en abscisse figurent, en cm, les distances des différentes taches à l'origine.

L'examen de la *figure 10* permet de tirer plusieurs conclusions :

. La présence d'un inhibiteur est indispensable. En effet, lors de l'expérience réalisée avec un milieu d'incubation dépourvu d'inhibiteur 99 % de l'AMP_c est transformé en ATP, ADP, AMP, Adé, Ado (*Figure 11a*).

. La caféine, la théophilline et le dérivé RO 10 1724 exercent une action inhibitrice sur la 3',5' phosphodiesterase de nucléotides cycliques (*Figure 11 c-d-e*) car après incubation, il reste environ 90 % d'AMP_c radioactif dans le milieu.

Dans tous les cas, une quantité variable d'AMP_c radioactif, suivant le tissu étudié, est dégradée. L'inhibition complète de la 3',5' phosphodiesterase de nucléotides cycliques n'est pas obtenue. De plus, comme le montre le *tableau III*, dans aucune des fractions, il n'est apparu de différences significatives (mis à part le dithiothreitol) entre les différents produits testés.

C'est pourquoi, nous avons choisi l'inhibiteur et les concentrations les plus couramment utilisés, à savoir 10 mM de théophilline.

Les profils chromatographiques obtenus dans ces conditions, avec chaque type de tissu, sont représentés dans la *figure 11*.

Les pourcentages de dégradation de l'AMP_c radioactif, que nous retenons, sont ceux donnés dans la 4ème colonne du *tableau III*.

Les résultats montrent que la dégradation est sensiblement du même ordre de grandeur dans les capillaires télencéphaliques et cardiaques isolés (10 et 11 %) et peu différents pour les broyats télencéphaliques et cardiaques (26 et 32 %).

	Sans inhibiteur	Dithiothrēitol	Cafēine	Théophilline	RO 201724
Cap. cérébraux	99%	99%	10%	10%	12%
Cap. cardiaques	98%	97%	11%	11%	13%
Broyat cérébral	100%	98%	26%	25%	27%
Broyat cardiaque	100%	99%	34%	32%	32%

Tableau III

Etude de l'inhibition de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques :

Pourcentage de dégradation de l'AMP_c par la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques des diverses fractions, placées dans un milieu d'incubation sans inhibiteur, ou en présence de dithiothrēitol, de caféine, de théophilline ou de dérivé RO 201724.

Les résultats obtenus sont la moyenne de 3 expériences pour chaque inhibiteur et chaque fraction.



3 - DETERMINATION DE L'ACTIVITE GUANYLCYCLASIQUE

A - Analyse de la séparation de la radioactivité lors de la chromatographie

La *figure 3* montre les résultats obtenus après séparation des différents métabolites du GTP, par chromatographie sur papier (*Figure 3*) en tampon isobutyrique, NH_4OH concentré, eau (57-4-39, pH 4,3) et en tampon 66-1-33, pH 3,7 (*Figure 3*), page 19.

La chromatographie en tampon 66-1-33 permet une excellente séparation de tous les métabolites du GTP. De plus, avec ce tampon, la distance séparant les taches de GMP et de GMPc est de l'ordre de 5 à 6 cm. En tampon 57-4-36, elle varie de 3 à 4 cm.

B - Activité guanylcyclasique

1) Distribution de la radioactivité le long du chromatogramme

L'analyse systématique de la radioactivité le long du chromatogramme (*Figure 12*) montre une succession de pics de radioactivité. Ces pics correspondent à la distribution des taches visualisées en lumière ultraviolette (*Figure 12*).

2) Activité guanylcyclasique

a - Action de la concentration en GTP non radioactif

Comme lors de l'étude de l'activité adénylcyclasique, nous ajoutons au GTP radioactif, dans le milieu d'incubation, 2 mM de GTP non radioactif, afin d'accélérer la vitesse de réaction en augmentant la quantité de substrat fourni à l'enzyme.

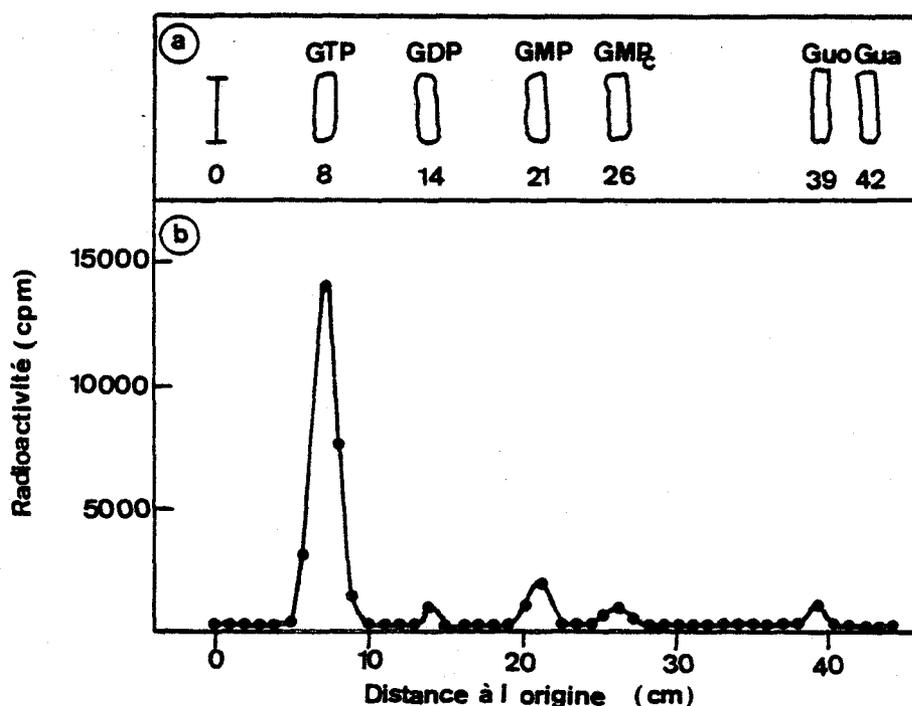


Figure 12

a - Séparation chromatographique des métabolites du GTP. Un aliquot (40 μ l) du milieu d'incubation est placé sur un papier WHATMAN 3MM. La chromatographie dure 30 heures, à la température ambiante, dans le solvant suivant : acide isobutyrique, NH_4OH concentrée, eau (66 - 1 - 33), pH 3,7. Cette chromatographie permet une séparation complète de tous les dérivés du GTP. Les nombres donnent la distance, en cm, des différentes taches à l'origine.

b - Distribution de la radioactivité le long du chromatogramme. Les capillaires télencéphaliques (1 mg) sont incubés à 37°C pendant une heure, dans le milieu d'incubation décrit dans le texte, page 18.

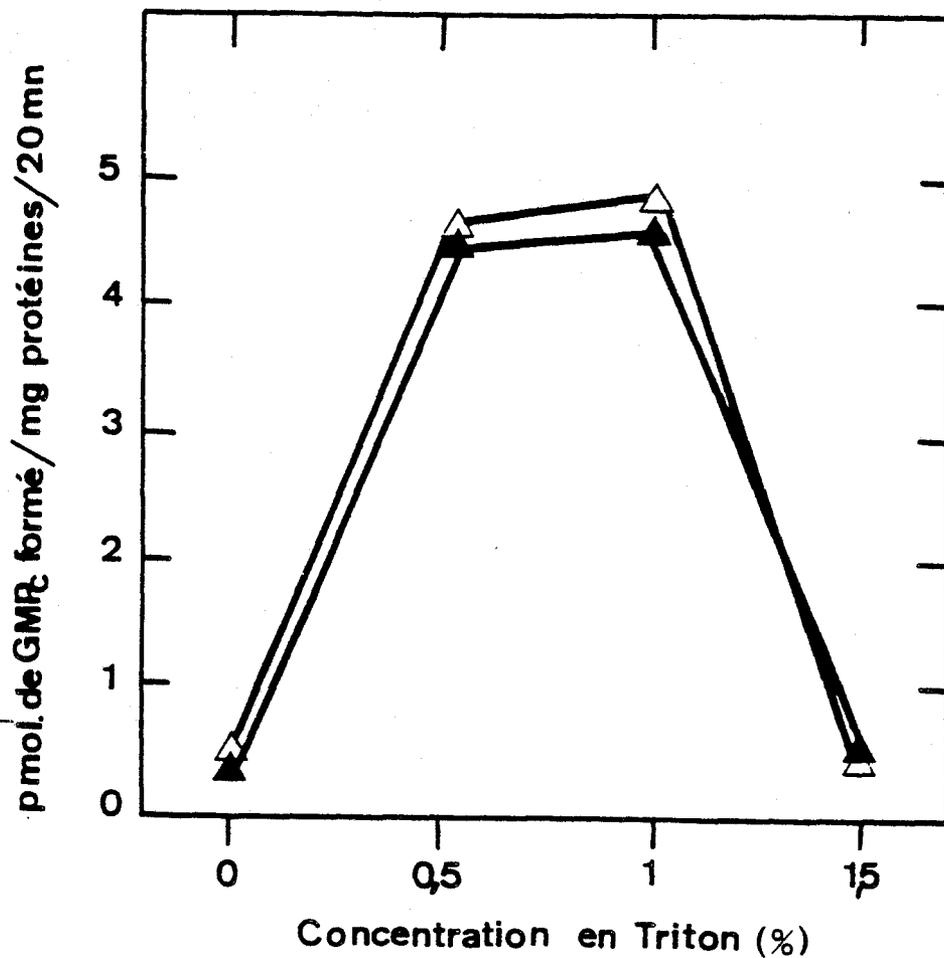


Figure 13

Action de la concentration du triton X-100 sur l'activité guanylcyclasique

Les capillaires cardiaques \triangle et télencéphaliques \blacktriangle sont incubés pendant 20 minutes, à 37°C , dans un milieu d'incubation contenant des concentrations croissantes 0 - 0,5 - 1 - 1,5 % de triton X-100.

En ordonnée, nous indiquons la quantité de GMP_c formée pendant 20 minutes à 37°C pour un milligramme de protéine. En abscisse, sont indiquées les différentes concentrations de triton X-100, contenues dans les milieux d'incubations successifs.

Lors des expérimentations, nous ne notons aucune formation de GMP_c radioactif. De plus, 92 % de la radioactivité sont toujours localisés, même après 60 minutes d'incubation, au niveau de la tache correspondant au GTP radioactif sur le chromatogramme. Ce résultat nous suggère deux hypothèses :

- Nous n'avons pas d'activité guanylcyclasique dans nos tissus.

- Cette activité est si faible qu'elle n'est pas détectable, le GTP radioactif étant trop dilué dans le GTP non radioactif.

C'est pourquoi, nous avons étudié l'action de concentrations croissantes de GTP non radioactif (0 - 0,5 - 1 - 2 mM) sur l'activité guanylcyclasique.

Nous n'observons une formation de GMP_c radioactif que, lorsque notre milieu ne contient pas de GTP non radioactif. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par VESELY et al. (1976) et SULAKHE et al. (1976a).

b - Action du triton X-100

HARDMANN et al. (1973), CHRISMAN et al. (1975), KIMURA et MURAD (1974) montrent l'action activatrice du triton X-100 sur la guanylcyclase. Ils pensent que la guanylcyclase est une enzyme profondément incorporée dans la membrane plasmique. Le triton, en désagrégant cette membrane, permettrait une libération de l'enzyme dans le milieu d'incubation.

Nous effectuons des incubations à des concentrations de triton X-100 : 0 - 0,5 - 1 - 1,5 %. Les résultats obtenus sont illustrés par la *figure 13*.

Les concentrations de triton X-100, comprises entre 0,5 et 1 %,

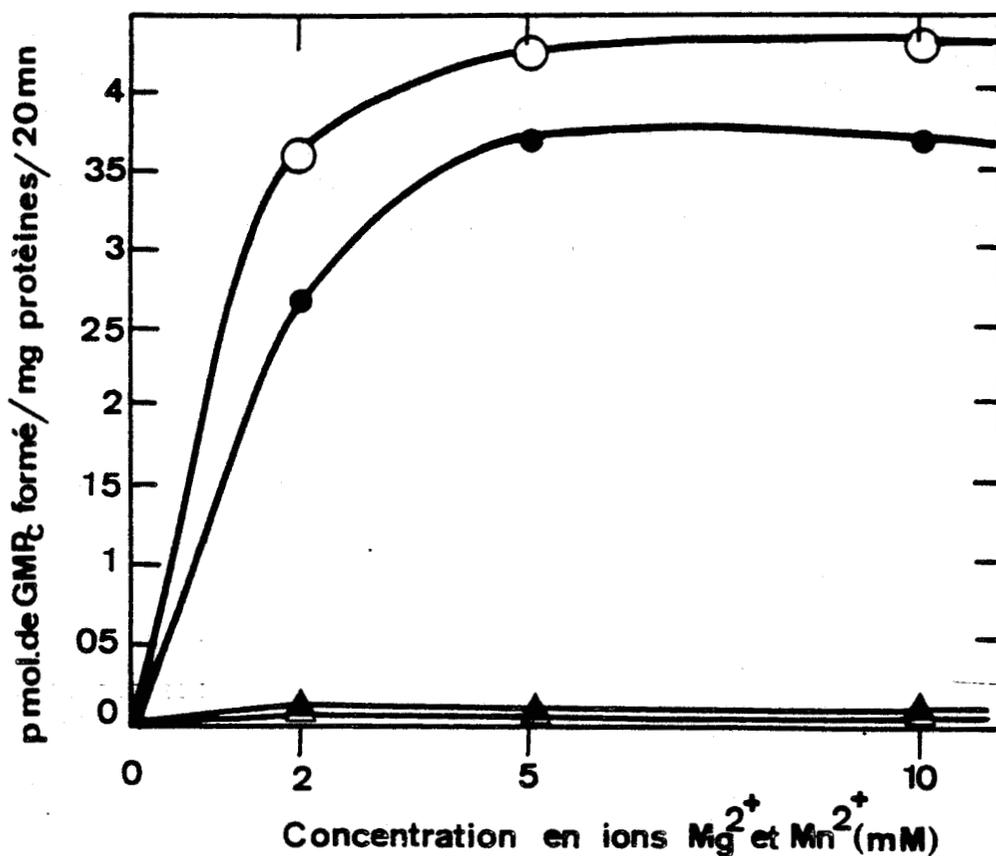


Figure 14

Action des ions Mg⁺⁺ et Mn⁺⁺ sur l'activité guanylcyclasique

Les capillaires cardiaques (○ et △) et télencéphaliques (● et ▲) sont incubés pendant 20 minutes à 37°C, dans un milieu contenant des concentrations croissantes 0 - 2 - 5 - 10 mM d'ions Mn⁺⁺ (○ et ●) et Mg⁺⁺ (△ et ▲).

En ordonnée, nous indiquons la quantité de GMP_c formée durant l'incubation pour un milligramme de protéine. En abscisse, sont indiquées les différentes concentrations en mM des ions Mn⁺⁺ et Mg⁺⁺, contenues dans les différents milieux.

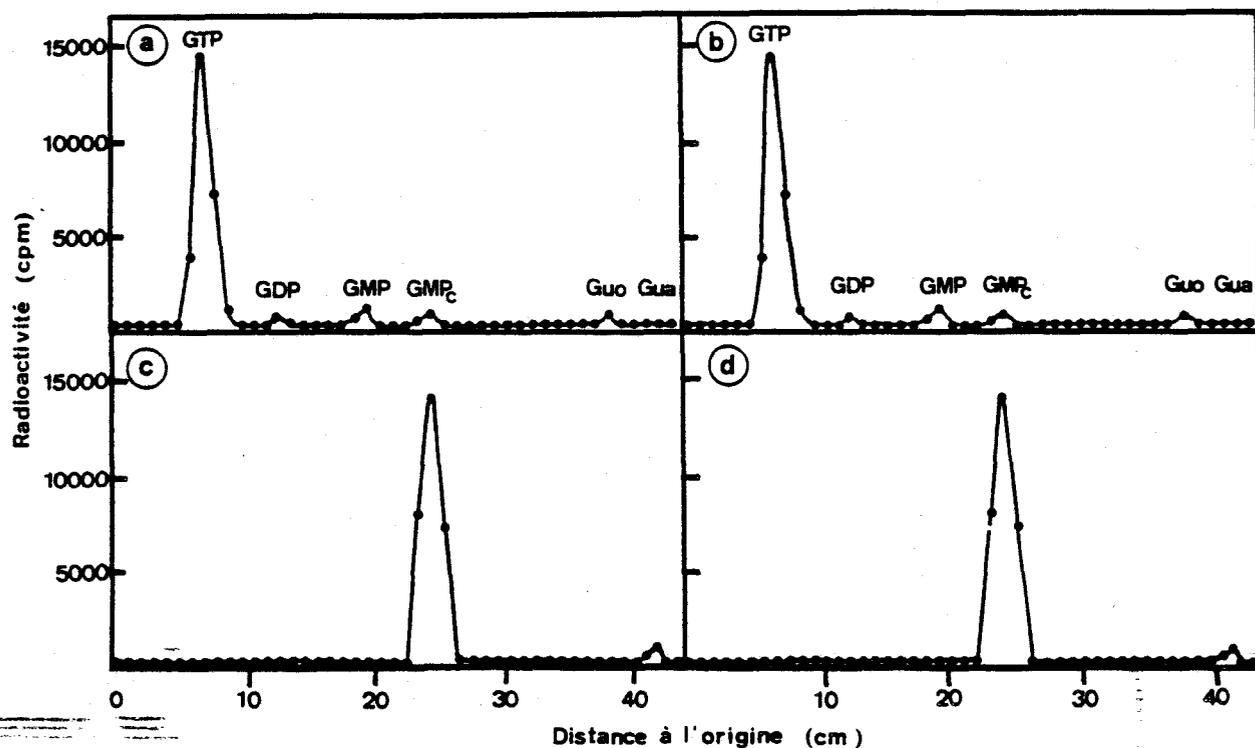


Figure 15

Chacun des chromatogrammes représente la radioactivité détectée le long des chromatographies après incubation des divers échantillons pendant une heure avec du GTP (a - b) ou du GMP_c (c - d).

La colonne de gauche indique en a, la quantité de GMP_c formée lors de l'incubation de un milligramme de capillaires télencéphaliques pendant 20 minutes, à 37°C, en c, la dégradation de ce GMP_c dans les mêmes conditions d'expériences.

La colonne de droite indique en b, la quantité de GMP_c formée lors de l'incubation de un milligramme de capillaires ventriculaires pendant 20 minutes à 37°C, en d, la dégradation de ce GMP_c dans les mêmes conditions.

La radioactivité est exprimée en cpm sur l'axe des ordonnées tandis qu'en abscisse figurent les distances, en cm, des différentes taches à l'origine.

	Sans inhibiteur	Caféine	Théophilline	RO 201724
Capillaires télencéphaliques	98%	2%	2%	3,5%
Capillaires cardiaques	97%	3%	2,5%	3%

Tableau IV

Etude de l'inhibition de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques :

Pourcentage de dégradation du GMP_c par la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques des fractions étudiées, placées dans un milieu d'incubation sans inhibiteur, ou en présence de théophilline, de caféine ou de dérivé

RO 201724.

Les résultats obtenus sont la moyenne de 3 expériences pour chaque inhibiteur et chaque fraction.



nous donnent un plateau d'activité maximale. Nous avons donc opté pour une concentration moyenne de 0,75 %.

c - Action des ions Mn^{++} et Mg^{++}

ZWILLER et MANDEL (1978) montrent l'action activatrice des ions Mn^{++} , et inhibitrice des ions Mg^{++} sur l'activité guanylcyclasique du cerveau de Rat.

Nous plaçons dans le milieu d'incubation des concentrations croissantes de ces deux types d'ions (*Figure 14*).

Nous constatons une stimulation maximale de l'activité guanylcyclasique dans les deux types de capillaires pour une concentration en Mn^{++} de 5 mM. De plus, nous remarquons que les ions Mg^{++} n'ont aucune action sur l'activité guanylcyclasique quelle que soit leur concentration dans le milieu d'incubation. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus par VESELY et al. (1976) et ZWILLER et MANDEL (1978b).

d - Inhibition de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques

Lors de l'étude de l'adénylcyclase, nous ne sommes pas parvenus à bloquer totalement l'action de la 3',5' phosphodiesterase cyclique. Afin de vérifier le degré d'inhibition de cette enzyme, nous avons reconduit le même type d'expérimentation.

La *figure 15* nous donne un exemple des résultats obtenus.

Quel que soit l'inhibiteur utilisé (théophilline 10 mM ; caféine 10 mM et RO 20 1724 10 mM) associé à 2 mM de GMP_c non radioactif, nous obtenons dans les deux types de capillaires, un blocage total de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques (*Tableau IV*).

Par conséquent, nous utilisons, comme inhibiteur de la dégradation du GMP_c radioactif nouvellement formé, de la théophilline à une concentration de 10 mM et 2 mM de GMP_c non radioactif.

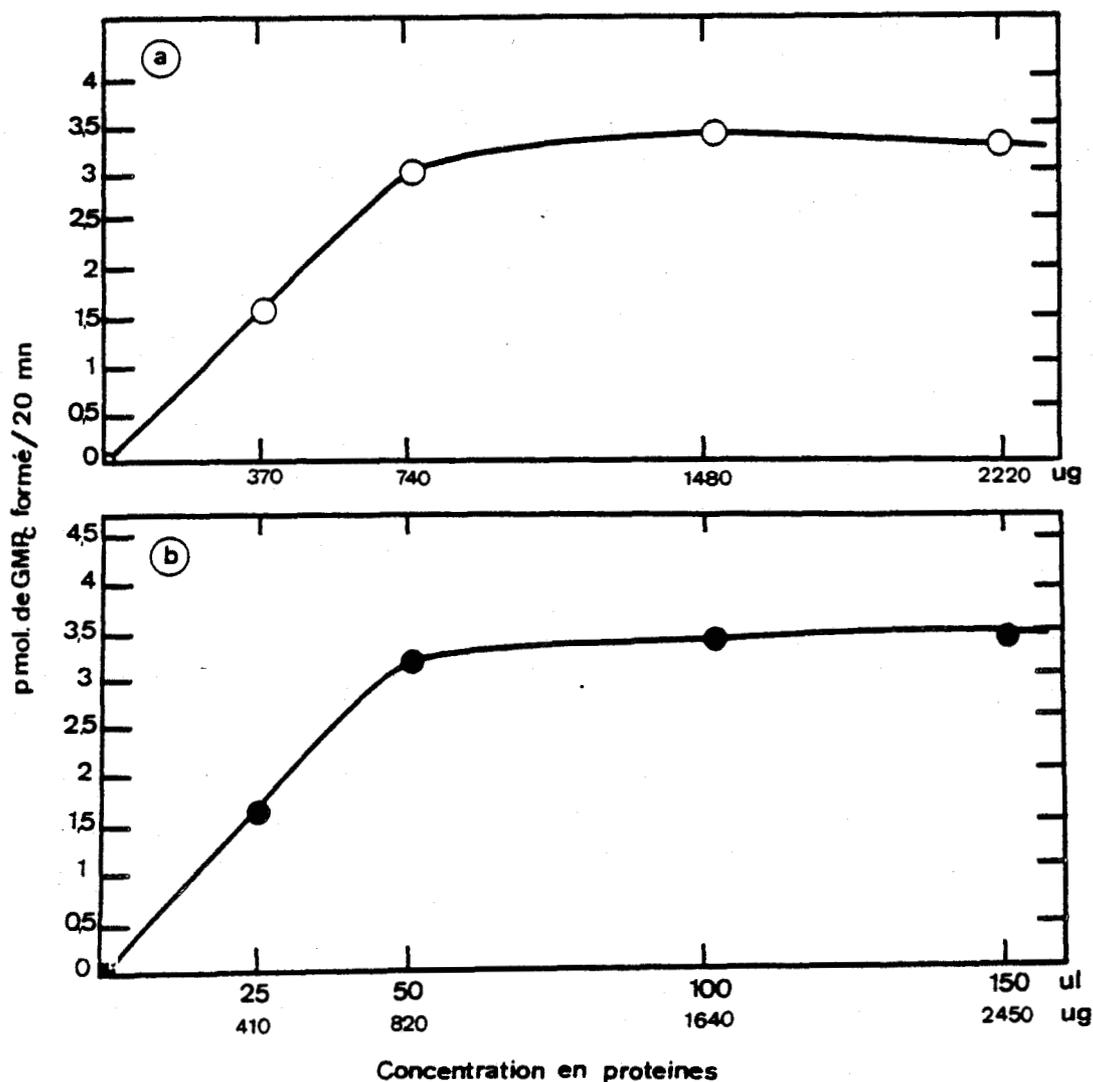


Figure 16

Etude de la concentration en protéines du milieu d'incubation

Le milieu d'incubation est identique à celui décrit page 18, la durée de l'incubation est de 20 minutes à 37°C.

- Le graphe a nous montre la quantité de GMP_c radioactif formée en 20 minutes, à des concentrations croissantes de protéines, par les capillaires cérébraux. Ces concentrations sont données en abscisses. Elles sont exprimées en μg de protéines.

- Le graphe b nous donne la quantité de GMP_c radioactif formée par les capillaires cardiaques en 20 minutes, à des concentrations croissantes de protéines. Ces concentrations sont exprimées en μl d'incubat placé dans le milieu et à leur correspondance en μg de protéines après dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al. (1951).

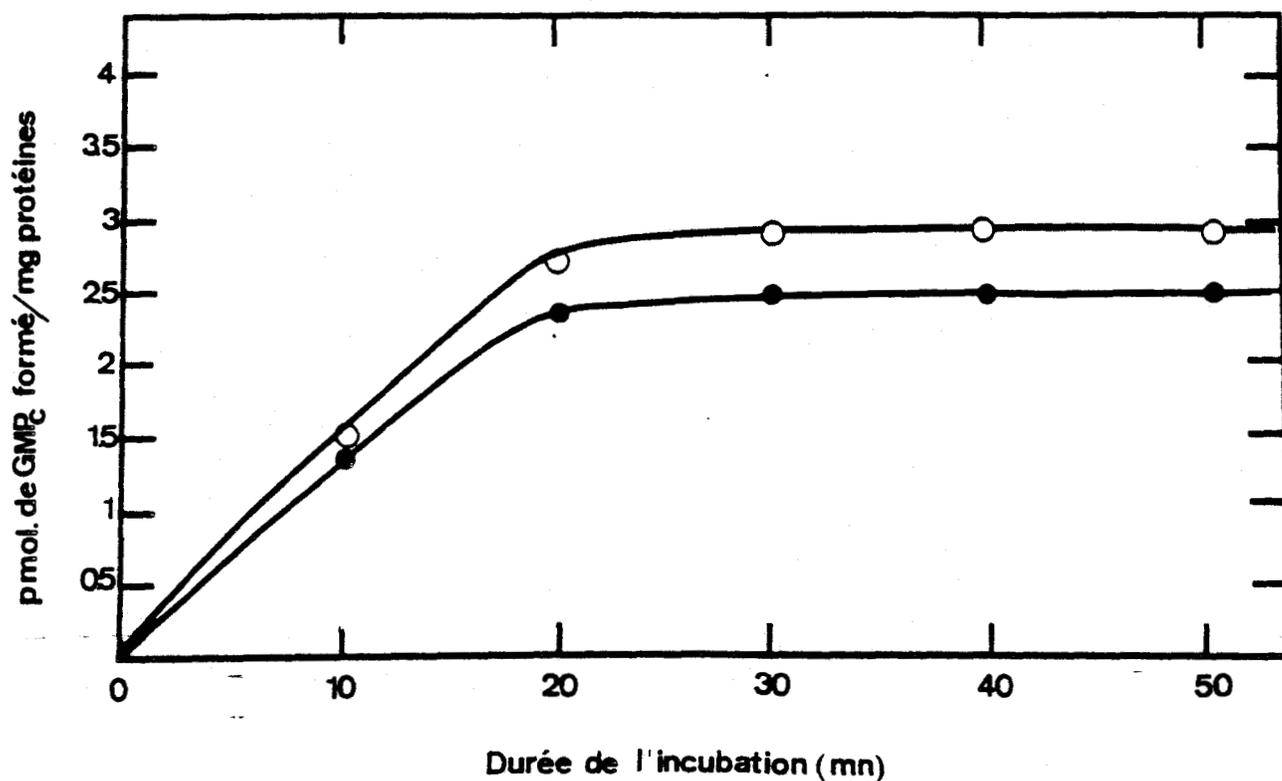


Figure 17

Etude cinétique de la formation du GMP_c

Les expériences sont réalisées dans le milieu d'incubation décrit page 18, à 37°C. La durée de l'incubation est de 0 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50 minutes.

La courbe, jalonnée de ○, correspond aux résultats obtenus avec les capillaires cardiaques; celle marquée de ● nous donne les résultats obtenus avec les capillaires télencéphaliques.

e - Concentration en protéines dans le milieu d'incubation

Une étude de la concentration en protéines du milieu d'incubation est réalisée (*Figure 16*).

Pour les deux types de capillaires étudiés, la vitesse de formation du GMP_C reste constante jusqu'à une concentration en protéines d'environ 900 μg , ensuite elle s'annule rapidement.

C'est pourquoi, dans notre travail, nous ne donnons comme valeur de l'activité enzymatique que les valeurs obtenues avec des concentrations en protéines inférieures à 900 μg .

3) Etude cinétique de la guanylcyclase

Une étude cinétique de la formation du GMP_C par les capillaires télencéphaliques et cardiaques est réalisée en vue de déterminer la durée optimale de l'incubation.

Les résultats sont présentés *figure 17*.

Pour chaque fraction étudiée, la vitesse de formation du GMP_C croît régulièrement de 0 à 25 minutes et s'annule après 30 minutes.

Par conséquent, toutes les études comparatives de l'activité guanylcyclasique sont réalisées avec une durée d'incubation de 20 minutes.

4) Résultats

Un exemple de chromatogramme obtenu à partir d'une expérience pour chaque fraction est présenté *figure 15*.

L'analyse de ces différents scintigrammes nous montre la présence de faibles quantités de GMP_C radioactif (500 cpm environ par pic).

Capillaires cardiaques pmole de GMP _c formé/20 minutes/mg prot.	Capillaires télencéphaliques pmole de GMP _c formé/20 minutes/mg prot.
3,80	3,64
3,49	3,23
3,66	3,18
3,51	3,11
3,02	3,07
4,21	3,00
3,42	
$m = 3,58 \pm 0,33$ pmoles	$m = 3,08 \pm 0,38$ pmoles

Tableau V

Activité guanylcyclasique des capillaires télencéphaliques et cardiaques isolés.



L'activité guanylcyclasique déterminée à partir d'un nombre plus important d'expériences (*Tableau V*) est représentée *figure 18*.

L'activité spécifique trouvée au niveau des capillaires cardiaques ($3,58 \pm 0,33$ picomoles de GMP_c radioactif/mg protéine/20 minutes) est très proche de celle trouvée au niveau des capillaires télencéphaliques ($3,08 \pm 0,38$ picomoles de GMP_c radioactif/mg protéine/20 minutes).

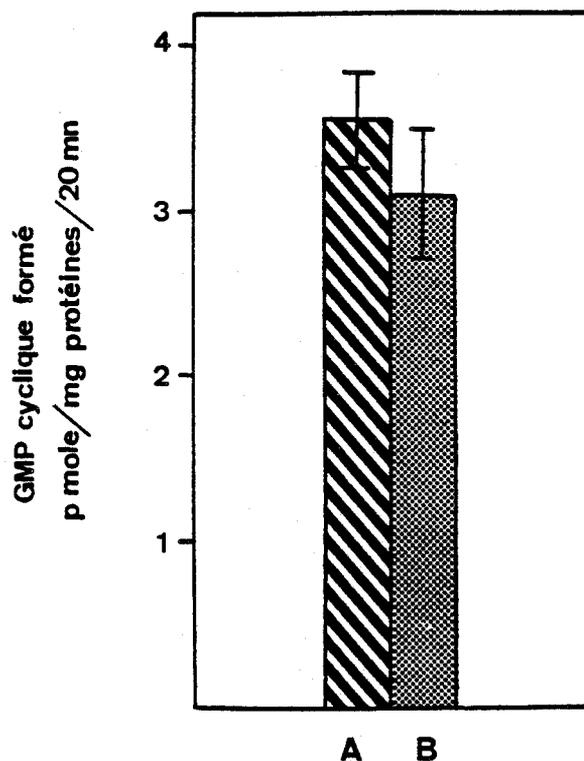


Figure 18

Ce diagramme donne les résultats de l'étude comparative de la formation du GMP_c dans les deux fractions étudiées.

Les capillaires cardiaques et télencéphaliques ont une activité moyenne respectivement de 3,58 et 3,08 picomoles de GMP_c /mg protéine/20 minutes.

Les moyennes et les écarts types sont calculés à partir de huit expériences (voir tableau V).

- A** Capillaires cardiaques
- B** Capillaires télencéphaliques.

DISCUSSION

DISCUSSION

I - CHOIX DE LA METHODE

Le dosage de l'activité adénylcyclasique et guanylcyclasique à partir d'ATP ou de GTP nécessite, dans le milieu d'incubation, la présence d'un système régénérateur d'énergie et d'un inhibiteur de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques. Le système régénérateur d'énergie permet de fabriquer de l'ATP ou du GTP, au cas où ces derniers seraient dégradés par les nucléotidases présentes dans les cellules des membranes endothéliales. L'inhibiteur de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques empêche la dégradation de l'AMP_c nouvellement formé en AMP.

Dans notre étude, il fallait vérifier que ces dégradations étaient bien évitées. C'est pourquoi, nous avons choisi d'analyser tous les produits du métabolisme de l'ATP et du GTP. Cette façon de procéder diffère de celle de DRUMMOND et DUNCAN (1970), SWISLOCKI et TIERNEY (1973), JÓÓ et al. (1975), ENGELHART et al. (1976), S^t LOUIS et SULAKHE (1976) qui, eux, ne collectent et n'analysent que la fraction éluée contenant l'AMP_c.

La méthode chromatographique utilisée nous permet une séparation complète, en une seule étape, de tous les dérivés de l'ATP ou du GTP. Ainsi, il est possible, in vitro, d'analyser le métabolisme de ces deux nucléotides.

II - ACTIVITE ADENYLCYCLASIQUE DES HOMOGENATS ET CAPILLAIRES ISOLES

L'activité adénylcyclasique déterminée dans les homogénats

de télencéphale et de myocarde est relativement élevée. Cela n'a rien de surprenant. Dans le cerveau, l'adénylcyclase se rencontre en grande quantité dans les membranes synaptiques principalement (RODBELL, 1975 ; NATHANSON et GREENGARD, 1976 ; KEBABIAN, 1977 ; PHILLIS, 1977 ; BARTFAI, 1978). En ce qui concerne le coeur, l'adénylcyclase est essentiellement localisée dans le sarcolemme des cellules myocardiques (ENGELHART et al., 1976).

Chez le Rat, SWISLOCKI et TIERNEY (1973) montrent que l'activité adénylcyclasique est beaucoup plus importante au niveau du tissu cérébral qu'au niveau du myocarde (environ treize fois). Nos résultats vont dans le même sens que les leurs. En effet, l'activité adénylcyclasique du télencéphale de Poulet est environ 1,5 fois supérieure à celle rencontrée au niveau du myocarde de Poulet.

L'activité adénylcyclasique obtenue à partir du myocarde de Poulet est plus importante que celle rapportée par DRUMMOND et DUNCAN (1970) pour le coeur de Pigeon (13,4 nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes), par St LOUIS et SULAKHE (1976) pour le coeur de Cobaye (6,2 nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes), par SWISLOCKI et TIERNEY (1973) et ENGELHART et al. (1976) pour le myocarde de Rat (respectivement 3,4 et 10,96 nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes). Nos résultats concernant le broyat télencéphalique sont aussi supérieurs à ceux publiés par SWISLOCKI et TIERNEY (1973), JÓO et al. chez le Rat (respectivement 45 nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes et 1 387 nmoles d'AMP_c/mg protéine/5 minutes soit 16,6 nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes).

Ces différences peuvent être dues au fait que tous ces résultats sont obtenus sur des animaux d'espèces différentes (Rat, Cobaye, Lapin, Chien, Poulet). De plus, la composition du milieu d'incubation varie énormément suivant les chercheurs : absence d'ATP non radioactif dans le milieu, absence de système régénérateur d'énergie pour tous ces auteurs. De plus, la durée relativement longue de la préparation de leurs échantillons, plus de deux heures pour JÓO et al. (1975) par exemple, peut

expliquer une baisse d'activité de l'adénylcyclase. SNYDER et DRUMMOND (1978) ont en effet montré que l'activité de cet enzyme diminue avec le temps.

L'activité adénylcyclasique de la fraction capillaires isolés ne peut être comparée, en ce qui concerne uniquement le télencéphale, qu'avec les valeurs obtenues par JÓÓ et al. (1975), qui sont les seuls à avoir réalisé, chez le Rat, une étude similaire à la nôtre. NEMECEK (1980) met en évidence la présence d'activité adénylcyclasique dans les capillaires isolés de tissus adipeux de Hamster. Ces résultats ne peuvent être comparés aux nôtres, car ils sont exprimés en milligramme de poids sec et non en milligramme de protéine.

L'activité spécifique de l'adénylcyclase que JÓÓ et al (1975) déterminent dans une fraction riche en capillaires télencéphaliques est de 10 245 pmoles d'AMP_c/mg protéine/5 minutes soit 122,8 nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes. L'activité adénylcyclasique que nous mesurons dans les capillaires télencéphaliques isolés de Poulet est de 31,5 nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes, soit environ quatre fois moins.

Plusieurs arguments peuvent être avancés pour expliquer ces différences : le travail de JÓÓ et son équipe est réalisé sur des Rats. Nos résultats sont obtenus sur les Poulets, il est possible qu'il existe une différence interspécifique d'activité entre ces animaux. CECHELLI (1977) montre qu'il existe chez le Poulet des différences d'activité adénylcyclasique interraciales.

Les dosages de l'activité adénylcyclasique sont effectués sur ce que ces auteurs appellent "une fraction riche en capillaires". Le contrôle ultrastructural de leurs échantillons n'est représenté que par une seule section de capillaires prise à fort grossissement, et non pas par une ou plusieurs plages prises à faible grossissement. Aussi n'avons-nous pas une vue d'ensemble de leurs échantillons pour juger du degré de pureté de leurs isollements. Au début de cette étude, lors de l'application stricte de leur technique, les contrôles en microscopie électronique ont

révélé que la fraction ainsi isolée contenait à la fois des capillaires, des veinules, des artérioles et de nombreux débris de neurones. Or, l'activité adénylcyclasique de l'homogénat télencéphalique étant environ trois fois supérieure à l'activité de nos capillaires télencéphaliques isolés, il se peut que le contaminant ait augmenté la valeur de l'activité enzymatique au niveau de la "fraction riche en capillaires". Il se peut aussi qu'en appliquant leur méthode d'isolement au Poulet les conditions d'isolement ne soient plus identiques. La structure du tissu nerveux du Poulet est différente de celle du Rat. Ces différences peuvent se traduire par une contamination plus importante de la fraction capillaire.

L'activité adénylcyclasique des capillaires cardiaques n'a fait jusqu'ici l'objet d'aucun dosage. L'activité spécifique trouvée au niveau des capillaires cardiaques ($52,7 \pm 8,7$ nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes) est très proche de celle trouvée au niveau du broyat ventriculaire ($63,5 \pm 5,5$ nmoles d'AMP_c/mg protéine/60 minutes).

Par conséquent, le fait que notre isolement ne soit pas totalement pur (75 à 80 % des capillaires) n'a qu'une importance relative. Le contaminant, ayant une activité enzymatique très proche de celle des capillaires cardiaques, ne peut que très légèrement modifier la valeur moyenne de leur propre activité. Cette valeur ne peut être que très légèrement surestimée.

III - ACTION DE LA 3'5' PHOSPHODIESTERASE DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR LA DEGRADATION DE L'AMP_c

Au cours de nos travaux, nous avons été amenés à prendre en considération le rôle de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques. Cet enzyme catalyse la réaction de dégradation de l'AMP_c en AMP (APPLEMAN et al., 1973 ; AMER et KREIGHBAUM, 1975 ; KAKIUCHI et al., 1975). WEISS et COSTA (1968), BRECKENRIDGE et JOHNSTON (1969), DALTON et al. (1974) montrent que, suivant les tissus étudiés, et même à l'intérieur d'un même tissu, l'activité de la 3',5' phosphodiesterase des

nucléotides cycliques varie énormément. Nous n'avons jamais réussi à inhiber totalement cet enzyme. D'autres auteurs ont rencontré les mêmes problèmes lors de l'étude spécifique de l'enzyme (WEISS, 1973 ; DALY, 1975 ; NAHORSKI et ROGERS, 1976 ; KRUSE et SCHOLZ, 1978 ; NEMOZ et al., 1978 ; STEFANOVICH, 1979).

La dégradation de l'AMP_c nouvellement formé est sensiblement du même ordre de grandeur dans les homogénats télencéphaliques et cardiaques : elle est respectivement de 25 à 32 %.

Dans les capillaires télencéphaliques et cardiaques isolés, cette dégradation est de l'ordre de 10 et 11 %.

Notre but est de réaliser uniquement une étude comparative de l'activité adénylcyclasique dans les deux types de capillaires. Nous n'avons donc pas de corrections à apporter aux valeurs de nos activités adénylcyclasiques, compte tenu que, comme nous venons de le voir, la dégradation de l'AMP_c dans les deux types de capillaires, est du même ordre de grandeur. Par contre, il n'est pas possible de comparer l'activité adénylcyclasique d'un homogénat à celle de capillaires isolés à partir de ce broyat, sans tenir compte de l'action de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques car le taux d'inhibition de la transformation de l'AMP_c en AMP varie de 1 à 1,5 au niveau du tissu cérébral et de 1 à 3 pour le tissu ventriculaire.

IV - ACTIVITE GUANYLCYCLASIQUE

L'activité guanylcyclasique des capillaires cardiaques et télencéphaliques isolés n'a fait jusqu'ici l'objet d'aucune étude. Nos résultats sont donc les premiers.

L'activité spécifique de la guanylcyclase trouvée au niveau des capillaires cardiaques ($3,58 \pm 0,33$ pmoles de GMP_c/mg protéine/20 minutes) est très proche de celle trouvée au niveau des capillaires

téleencéphaliques ($3,08 \pm 0,38$ pmoles de GMP_c /mg protéine/20 minutes).

Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par les auteurs quant à l'action du triton X-100 sur l'activité guanylcyclasique. HARDMAN et al. (1973), CHRISMAN et al. (1975), KIMURA et MURAD (1974), SPRUIL et al. (1978) donnent une activité maximale de la guanylcyclase dans différents tissus, en particulier le coeur et le cerveau, pour une concentration en triton X-100 égale à 1 %.

Quant à l'action des ions Mn^{++} et Mg^{++} , VESELY et al. (1976) et ZWILLER et MANDEL (1978) montrent que, dans le coeur et le cerveau de Rat, l'activité maximale de la guanylcyclase est obtenue pour une concentration en ions Mn^{++} de 5 mM. Ils montrent, tous les deux, l'action inhibitrice des ions Mg^{++} . Nos résultats sont en accord avec les leurs.

Comme le montrent HARDMAN et SUTHERLAND (1969), STEINER et al. (1972), FERRENDELLI et al. (1970, 1972, 1975), KHOO et GORDAN (1979), l'activité guanylcyclasique est beaucoup plus faible que l'activité adénylcyclasique dans tous les tissus qu'ils ont étudiés (cerveau, coeur, foie). L'activité guanylcyclasique est de l'ordre de la picomole de GMP_c tandis que l'activité adénylcyclasique est de l'ordre de la nanomole d' AMP_c . Nos résultats confirment ces travaux. L'activité adénylcyclasique varie dans nos capillaires isolés de 52,7 nmoles d' AMP_c radioactif/mg protéine/60 minutes, pour les capillaires cardiaques, à 31,5 nmoles d' AMP_c radioactif/mg protéine/60 minutes, dans les capillaires cérébraux. L'activité guanylcyclasique varie, elle, dans ces mêmes capillaires isolés, de 3,58 pmoles de GMP_c radioactif/mg protéine/60 minutes à 3,08 pmoles de GMP_c radioactif/mg protéine/60 minutes. HOFMANN et al. (1977) donnent une activité adénylcyclasique variant entre 14,1 et 24,1 pmoles de GMP_c /mg protéine/60 minutes dans différentes régions du cerveau de Rat. Aucune étude de l'enzyme n'a été réalisée jusqu'à présent sur le téleencéphale de Poulet.

V - ACTION DE LA 3',5' PHOSPHODIESTÉRISE DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES SUR LA DEGRADATION DU GMP_c

La 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques catalyse aussi la dégradation du GMP_c en GMP (NATHANSON, 1977). Quel que soit l'inhibiteur de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques utilisé, nous obtenons un blocage à 100 % de l'activité de cet enzyme. L'existence de différentes formes de 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques à spécificité de substrat est montrée par AMER et KREIGHBAUM (1975), WELLS et al. (1975). PHILLIS (1977) pense que les 3',5' phosphodiesterase cyclique catabolisent les deux types de nucléotides (AMP_c et GMP_c) mais présentent une affinité plus élevée pour un type ou l'autre, suivant le taux de l'un ou l'autre nucléotide cyclique présent dans la cellule.

Nos résultats tendent à confirmer l'hypothèse de l'existence d'au moins deux formes de 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques. En effet, l'enzyme qui catabolise la dégradation de l'AMP_c n'est, par les différents produits testés, qu'inhibé à 90 % dans les capillaires isolés. Celui qui dégrade le GMP_c, dans ces mêmes capillaires, l'est à 100 %, à moins bien sûr qu'il s'agisse du même enzyme. Mais il aurait une affinité plus grande pour l'AMP_c, ce qui expliquerait la dégradation plus importante de ce nucléotide cyclique.

La comparaison des activités guanylcyclasiques des deux types de capillaires isolés est donc possible. Il n'existe pas de différence significative dans les capillaires télencéphaliques et cardiaques isolés.

VI - ACTIVITE ADENYLCYCLASIQUE, GUANYLCYCLASIQUE ET PINOCYTOSE

Existe-t-il une relation entre les activités adénylcyclasique et guanylcyclasique des capillaires cérébraux et cardiaques et le phénomène de pinocytose ?

La réponse à cette question est d'une très grande importance dans un très grand nombre de cas pathologiques, tels que l'ischémie ou l'hypertension. Dans ces conditions, une augmentation de la pinocytose est décrite spécialement dans les artérioles du cerveau (BEGGS et WAGGENER, 1976 ; WESTERGAARD et al., 1976, 1977 ; WESTERGAARD, 1977 ; LAURSEN et WESTERGAARD, 1977 ; BOLWIG et al., 1977 ; HEDLEY-WHYTE et al., 1977) et les parois artérielles (DELORME, soumis à publication). JÓÓ et al. (1975) considèrent que cette relation existe depuis qu'ils ont montré que l'injection de N_6O_2 dibutyryl- AMP_c provoque une augmentation de la pinocytose au niveau des capillaires cérébraux chez la Souris. Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse. En effet, si l'on compare les capillaires télencéphaliques aux capillaires cardiaques où le phénomène de pinocytose est beaucoup plus important, on constate que l'activité adénylcyclasique des capillaires cardiaques est 1,6 fois plus élevée que celle déterminée au niveau des capillaires télencéphaliques. Comme le montre KARNOVSKY (1967, 1968) au niveau des capillaires cardiaques, on rencontre aussi une forte activité pinocytotique. Or, c'est aussi dans les capillaires cardiaques que l'activité adénylcyclasique est la plus élevée.

La différence d'activité spécifique adénylcyclasique entre les deux types de capillaires peut s'expliquer d'au moins deux façons : il est possible de penser que la valeur de l'activité adénylcyclasique est le reflet exact du contenu en adénylcyclase des membranes plasmiques des cellules endothéliales de chaque type de capillaires. Donc, l'absence relative d'adénylcyclase dans les capillaires télencéphaliques par rapport aux capillaires cardiaques pourrait expliquer la rareté des vésicules de pinocytose. Mais il est possible d'envisager que chaque type de capillaires contient la même quantité d'enzymes alors que ces enzymes peuvent être activés ou inhibés suivant le type de capillaires où ils se trouvent. Dans le cas qui nous intéresse, il y aurait inhibition de l'adénylcyclase dans les capillaires télencéphaliques. FOLKMAN (1971) montre que les propriétés enzymatiques de vaisseaux neuroectodermaux sont gouvernées par des substances spécifiques libérées par les tissus où les capillaires se développent. Il semblerait donc que ce soit la première hypothèse qui

soit la plus plausible. Mais cette question ne pourra être résolue qu'en réalisant une étude biochimique d'activation de l'adénylcyclase par du NaF, par exemple, et une étude cytochimique de la localisation de l'adénylcyclase dans les deux types de capillaires.

La différence significative d'activité adénylcyclasique entre les capillaires télencéphaliques et cardiaques est donc un argument en faveur d'une participation effective de l'adénylcyclase dans l'induction de la pinocytose.

Des études concernant l'addition de nucléotides cycliques, de leurs dérivés dibutyryl ou d'agents connus comme étant des inhibiteurs de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques ont été réalisées sur le système immunitaire chez l'Homme (STOSSEL, 1977). L'AMP_c exerce un effet légèrement inhibiteur sur l'endocytose des polynucléaires humains (STOSSEL, 1977). Le GMP_c augmente la phagocytose des neutrophiles (IGNARRO et CECH, 1976) mais n'a aucun effet sur les monocytes (SANDLER et al., 1975) et sur les neutrophiles (BOXER et al., 1974).

Des études réalisées sur l'induction de la pinocytose dans d'autres types de cellules donnent des résultats tout aussi contradictoires. Des produits augmentant le taux d'AMP_c intracellulaire des macrophages pulmonaires montrent que tantôt ils inhibent la pinocytose (MASON et al., 1973) tantôt ils l'augmentent (SCHMIDT-GAYK et al., 1975).

Inversement, l'ingestion de particules de latex augmente légèrement (SEYBERT et al., 1973) ou ne modifie pas (MANGANIELLO et al., 1971) le taux d'AMP_c intracellulaire des macrophages pulmonaires de Lapin. Par contre, PARK et al. (1971) constatent, lors de la phagocytose de particules de polystyrène par ces mêmes leucocytes de Lapin, une augmentation du taux intracellulaire d'AMP_c. MANGANIELLO et al. (1971) montrent que la phagocytose d'émulsion d'huile de paraffine, par des leucocytes humains, provoque une légère augmentation du taux d'AMP_c intracellulaire.

Ainsi, suivant le type de cellules étudiées et pour un même type de cellule, selon l'espèce considérée, l'endocytose s'accompagne ou non d'une augmentation du taux intracellulaire d'AMP_c.

Cependant, l'AMP_c stimule la pinocytose dans les cellules de la vessie de Grenouille (MASER et al., 1971) et provoque par pinocytose l'ingestion de la colloïde dans les cellules thyroïdiennes (RODESCH et al., 1970).

Ces résultats montrent que d'une façon ou d'une autre, dans certains types cellulaires, les nucléotides cycliques interviennent dans le mécanisme de la pinocytose. Mais comment ? Pour l'instant, la réponse n'est pas encore connue.

L'endocytose est accompagnée d'augmentations importantes du métabolisme cellulaire : consommation d'oxygène, glycolyse, glycogénolyse, activation du shunt des pentoses phosphates (KARNOVSKY, 1962). SCHMIDT-GAYK et al. (1975) montrent la simultanéité de ces phénomènes lors de la phagocytose de particules de polystyrène par les macrophages alvéolaires humains. De plus, MOSES (1976) rapporte qu'une augmentation du taux intracellulaire d'AMP_c conduit à une élévation de la glycogénolyse et à une inhibition de la synthèse du glycogène, donc à une production accrue d'énergie pour la cellule, énergie indispensable à la réalisation de la pinocytose (synthèse de membranes plasmiques, par exemple).

L'endocytose nécessite la présence de protéines contractiles afin d'assurer la formation des vésicules (STOSSEL, 1977). La présence d'actine et de myosine vient d'être récemment démontrée dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux (OWMAN et al., 1977 ; LE BEUX et WILLEMOT, 1978) et dans les capillaires périphériques (OWMAN et al., 1977). DEDMAN et al. (1979) montrent le rôle joué par l'AMP_c et le Ca⁺⁺ sur les microfilaments et les microtubules des cellules non musculaires. Comme lors de la contraction musculaire le Ca⁺⁺ semble jouer un rôle important dans la formation des vésicules d'endocytose. STOCKEN et KLEIN

(1979) montrent qu'il induit la pinocytose chez l'amibe.

L'AMP_C régule l'activité de nombreuses enzymes, par l'intermédiaire de système phospho-déphospho (ROBINSON et al., 1971). Les points d'impact de l'AMP_C sont les protéines kinases. Les protéines kinases ont pour rôle de phosphoryler d'autres enzymes qui, de ce fait, deviennent actives et peuvent réguler de nombreux métabolismes (SCOTT et DOUSA, 1978).

JOHNSON et al. (1972) montrent le rôle de l'AMP_C sur la stimulation de la phosphorylation des protéines des microfilaments qui régulent la mobilité des fibroblastes.

Il est donc possible de spéculer sur le fait que la phosphorylation des protéines polymérisables puisse être régulée par des nucléotides cycliques, avec intervention probable des ions Ca⁺⁺. Mais pour l'instant aucune preuve n'est apportée à cette hypothèse, dans le cas de la pinocytose dans les capillaires.

°
° °

On ne trouve pas de différence significative entre les activités guanylcyclasiques des capillaires télencéphaliques et cardiaques.

La théorie de GOLDBERG et al. (1973) : "les régulations du métabolisme cellulaire pourraient être influencées par les interactions entre l'AMP_C et le GMP_C (à un taux élevé d'AMP_C correspond un taux intracellulaire plus faible de GMP_C, et inversement), ne semble pas s'appliquer au phénomène induisant la pinocytose. La généralisation de ce concept était tentante. Mais, comme le montre KOLATA (1973), les effets opposés de l'AMP_C et du GMP_C sont restreints à certains systèmes cellulaires tels que, par exemple, la glycogénolyse, la glycogénèse. Il faut distinguer de ces systèmes ceux qui sont susceptibles d'être influencés par un seul type de nucléotide comme, par exemple, la production de stéroïdes par le cortex surrénal (KOLATA, 1973).

La pinocytose ne serait donc pas, d'après nos résultats, un système contrôlé par un antagonisme entre le taux intracellulaire d'AMP_C et de GMP_C. Seul l'AMP_C semble intervenir dans l'induction de ce phénomène.

CONCLUSION

CONCLUSION

Lors de ce travail, nous apportons un argument en faveur d'une participation effective de l'adénylcyclase dans l'induction de la pinocytose au niveau des capillaires.

De plus, nous montrons que dans les capillaires isolés le phénomène de pinocytose ne semble pas régi par l'antagonisme des deux nucléotides cycliques, l'AMP_c et le GMP_c.

Plusieurs critères doivent être remplis pour affirmer qu'un nucléotide cyclique induit l'endocytose (STOSSEL, 1977) :

1. Le phénomène de pinocytose doit augmenter le taux intracellulaire de ce nucléotide ;
2. Une nucléotidase cyclase doit exister dans les membranes plasmiques des cellules ;
3. Les inhibiteurs de la 3',5' phosphodiesterase des nucléotides cycliques doivent augmenter le phénomène de pinocytose ;
4. L'addition de nucléotides cycliques ou de leurs dérivés doit augmenter la pinocytose ;
5. Les produits augmentant le taux intracellulaire de nucléotides cycliques doivent accroître la pinocytose.

La vérification de ces différents points, afin de confirmer nos hypothèses au niveau des capillaires télencéphaliques et cardiaques, fera l'objet d'études ultérieures.

BIBLIOGRAPHIE

AMER, M. S. and KREIGHBAUM, E. (1975)

Cyclic nucleotide phosphodiesterase : Properties, activators, inhibitors, structure. Activity relationships and possible role in drug development.

J. Pharm. Sci., 64 , 1 - 37.

APPLEMAN, M. M.; THOMPSON, W. J. and RUSSEL, T. R. (1973)

Cyclic nucleotide phosphodiesterase

Advanc. Cyclic Nucleotide Res., 3 , 66 - 98.

ASCHMAN, D. F.; LIPTON, R.; MELICON, M. M. and PRICE, T. D. (1963)

Isolation of adenosine 3',5' monophosphate and guanosine 3',5' monophosphate from rat urine.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 11, 330 .

BARTFAI, T. (1978)

Cyclic nucleotides in central nervous system.

TIBS, 3, 121 - 122.

BEGGS, J.L. and WAGGENER, J.D. (1976)

Transendothelial vesicular transport of protein following compression injury to the spinal cord.

Lab. Invest., 34 , 428 - 439 .

BOLWIG, T. G.; HERTZ, M. M. and WESTERGAARD, E. (1977)

Acute hypertension causing blood-brain barrier breakdown during epileptic seizures.

Acta Neurol. Scand., 56 , 335 - 342 .

BOXER, L. A.; HEDLEY-WHYTE, E.T. and STOSSEL, T. P. (1974)

Neutrophil actin dysfunction and abnormal neutrophil behaviour.

N. Engl. J. Med., 291 , 1093 - 1099 .

BRECKENRIDGE, B. M. and JOHNSTON, R. E. (1969)

Cyclic 3',5' nucleotide phosphodiesterase in brain.

J. Histochem. Cytochem., 17 , 505 - 511 .

BRENDEL, K.; MEEZAN, E. and CARLSON, E.C. (1974)

Isolated Brain Microvessels: A Purified, Metabolically Active Preparation from Bovine Cerebral Cortex.

Science, 185, 953-955.

CACAN, R. (1974)

Recherches préliminaires sur les membranes péricytoplasmiques de l'hépatocyte de Rat normal : Etude sur les glycoprotéines.

Doctorat 3ème Cycle, 1974, Biochimie, Université de Lille I.

CECCELLI, R. (1977)

Etudes préliminaires de l'activité adénylcyclasique dans les capillaires du télencéphale et du myocarde de Poulets âgés de 30 jours.

DEA Physiologie Nerveuse et Musculaire, 1977, Université de Lille I.

CHRISMAN, T.D.; GARBERS, D.L.; PARS, M.A. and HARDMAN, J.G. (1975)

Characterization of particulate and soluble guanylate cyclase from Rat Lung

J. Biol. Chem. 250, 374-381.

DALTON, C.; CROWLEY, H.J.; SHEPPARD, H. and SCHALLEK, W. (1974)

Regional cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in Rat central nervous system.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 145, 407-410.

DALY, J. (1975)

Role of cyclic nucleotides in the nervous system.

In Handbook of Psychopharmacology, L.L. Iverson, S.D. Iverson and S.H. Snyder, Eds, New-York, Plenum, 153-195.

DEDMAN, J.R.; BRINKLEY, B.R. and MEANS, A. (1979)

Regulation of microfilaments and microtubules by calcium and cyclic AMP.

Advanc. Cyclic Nucleotide Res., 11, 131-174.

DELORME, P. (1971)

Etude ultrastructurale du développement des capillaires, de leur environnement et des modifications de leur perméabilité à la peroxydase du Raifort dans le t elencephale du Poulet au cours de l'embryog en ese et de la croissance postnatale.

Th ese de Doctorat  es Sciences, Nancy, 1971, 232p.

DELORME, P. (1980)

Ultrastructural investigation of the preventive action of 5023 during ischemia. II At the carotide artery level.

Arzneim. Forsch. Drug. Res. (soumis  a publication).

DELORME, P. ; GAYET, J. and GRIGNON, G. (1970)

Ultrastructural study on transcapillary exchanges in the developing telencephalon of the Chicken.

Brain Res., 22, 269-283.

DELORME, P. ; GRIGNON, G. and GAYET, J. (1968)

Ultrastructure des capillaires dans le t elenc ephal de Poulet au cours de l'embryog en ese et de la croissance postnatale.

Z. Zellforsch., 87, 592-602.

DOUSA, T. and RYCHLICK, I. (1970)

The metabolism of adenosine 3',5' cyclic phosphate. I. Method for the determination of adenylcyclase isolated from Rat kidney.

Biochim. Biophys. Acta., 204, 1-9.

DRUMMOND, G.I. and DUNCAN, L. (1970)

Adenyl cyclase in cardiac tissue.

J. Biol. Chem., 245, 976-983.

EHRlich, P. (1885)

Das Sauerstoffbed urfniss des Organismus. Ein Farbenanalytische Studie.

A. Hirschwald Edit., Berlin, 1885

Cit e par DELORME (1971).

ENGELHART, V.H.; PIUT, D.A. and STORM, D.R. (1976)

Subcellular localisation of adenylate cyclase in Rat cardiac muscle.

Biochem. Biophys. Acta., 451, 48-61.

FERRENDELLI, J.A.; KINSCHERF, D.A. and KIPNIS, D.M. (1972)

Effect of amphetamine, chlorpromazine and reserpine on cyclic GMP and cyclic AMP levels in Mouse cerebellum.

Biochem. Biophys. Res. Commun, 46, 2114-2120.

FERRENDELLI, J.A.; KINSCHERF, D.A. and CHANG, M.M. (1975)

Comparison of the effects of biogenic amines on cyclic GMP and cyclic AMP levels in Mouse cerebellum in vitro.

Brain Res., 84, 67-73

FERRENDELLI, J.A.; STEINER, A.L.; Mc DOUGAL, D.R. and KIPNIS, D.M. (1970)

The effect of oxotremorine and atropine on cGMP and cAMP levels in Mouse cerebral cortex and cerebellum.

Biochim. Biophys. Res. Commun, 41, 1061-1067.

FOLKMAN, J. (1971)

Tumour angiogenesis : Therapeutic applications.

N. Engl. J. Med., 285, 1182-1186.

FRANSEN, E.K. and KRISHNA, G. (1976)

A simple ultrasensitive method for assay of cyclic AMP and cyclic GMP in tissue

Life Sci., 18, 529-542.

GOLDBERG, N.D. ; HADDOX, M.K. ; HARTLE, D.K. and HADDEN, J.W. (1972)

The biological role of cyclic 3',5' guanosine monophosphate.

In Proceedings of the fifth International Congress of Pharmacology, San Francisco (1972), KARGEL, BASEL, 1973, vol. 5, 146.

GOLDBERG, N.D. ; LUST, W.D. ; ODEA, R.F. ; WEI, S. and O'TOOLE, A.G. (1970)

A role of cyclic nucleotides in brain metabolism.

Advanc. Biochem. Psychopharmacol., 3, 67-87.

GOLDBERG, N.D. ; O'DEA, R.F. and HADDOX, M.K. (1973)

Cyclic GMP.

Advanc. Cyclic nucleotide Res., 3, 155-223.

- GOLDSTEIN, G.W.; WOLINSKI, J.S.; CSEJTEY, J. and DIAMOND, I. (1975)
Isolation of metabolically active capillaries from Rat brain.
J. Neurochem., 2, 715-717.
- GOLDMANN, E.E. (1909)
Die aussere und innere Sékrétion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der "vitalen Färbung".
Beitr. Z. Klin. Chir., 64, 192-265.
- GOLDMANN, E.E., (1913)
Vitalfärbung am Zentral Nerven System.
Beitrag zur Physiologie des Plexus Choroïdeus und der Hirnhäute (BERLIN).
- HARDMANN, J.G.; CHRISMAN, T.D.; GRAY, J.P.; SUDDARTH, J.L. and SUTHERLAND, E.W. (1973).
Guanylate cyclase: alterations of apparent subcellular distribution and activity by detergents and cations.
Proc. Intern. Congr. Pharmacol., 5th, San Francisco. Basel, KARGER. 1973, Vol. 5, 143-145.
- HARDMANN, J.G. and SUTHERLAND, E.W. (1969)
Guanylcyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5' monophosphate from guanosine triphosphate.
J. Biol. Chem., 244, 6363-6370.
- HEDLEY-WHYTE, E.T.; LORENZO, A.V. and HSU, D.W. (1977)
Protein transport across cerebral vessels during metrazole induced convulsions.
Am. J. Physiol., 233, C74-C85.
- HOFMANN, M.; SPANO, P.F., TRABUCCI, M. and KUMAKURA, K. (1977)
Guanylate cyclase activity in various brain areas.
J. Neurochem., 29, 395-396.

IGNARRO, L.J. and CECH, R.F. (1976)

Bidirectional regulation of lysosomal enzyme secretion and phagocytosis in human neutrophils by guanosine 3',5' monophosphate and adenosine 3',5' monophosphate.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 151, 448-452.

ISHIKAWA, E.; ISHIKAWA, S.; DAVIS, J.W.; SUTHERLAND, E.W. (1962)

Determination of guanosine 3',5' monophosphate in tissues and guanylcyclase in Rat intestine.

J. Biol. Chem., 244, 6371-6392.

JOHNSON, G.S. ; MORGAN, W.D. and PASTAN, I. (1972)

Regulation of cell mobility by cyclic AMP.

Nature, 235, 54 - 56.

JOO, F. (1972)

Effect of N_6O_2 Dibutyryl-Cyclic 3'- 5' Adenosine Monophosphate on the Pinocytosis of Brain Capillaries of Mice.

Experientia, 28, 1470-1471.

JOO, F. and KARNUSHINA, I. (1973)

A procedure for isolation of capillaries from Rat brain.

Cytobios, 8, 41-48.

JOO, F.; RAKONCZAY, Z. and WOLLEMAN, M. (1975)

cAMP Mediated Regulation of Permeability in brain capillaries.

Experientia, 31, 582-584.

KAKIUCHI, S.; YAMAZAKI, R.; TESSHIMA, Y. UENISHI, K. and MIYAMOTO, E. (1976)

Ca^{++}/Mg^{++} dependant cyclic nucleotide phosphodiesterase and its activators proteines.

Advanc. Cyclic Nucleotide Res., 5 163-178.

KARNOVSKY, M.J. (1962)

Metabolic Basis of Phagocytic Activity.

Physiol. Rev., 42, 143-151.

KARNOVSKY, M.J. (1967)

The ultrastructural basis of capillary permeability studied with per-
oxydase as a tracer.

J. Cell. Biol., 35, 213-236.

KARNOVSKY, M.J. (1968)

The ultrastructural basis of transcapillary exchanges.

J. Gen. Physiol., 52, 645-675.

KARNOVSKY, M.J. and SHEA, S.M. (1970)

Transcapillary Transport by Pinocytosis.

Microvascular Res., 2, 353-360.

KEBABIAN, J.W. (1977)

Biochemical regulation and physiological significance of cyclic nucleo-
tides in the nervous system.

Advanc. Cyclic Nucleotide Res., 8, 421-508.

KHOO, J.C. and GORDON N.G. (1979)

Comparison of cyclic nucleotide specificity of guanosine 3',5' mono-
phosphate dependant protein kinase and adenosine 3',5' monophosphate dependant
protein kinases.

Bioch. Biophys. Acta, 584, 21-32.

KIMURA, H. and MURAD, F. (1974)

Evidence of two different forms of guanylate cyclase in Rat heart.

J. Biol. Chem., 249, 6910-6916.

KOLATA, G.B. (1973)

Cyclic GMP : Cellular Regulatory Agent.

Science, 182, 149-151.

KRISHNA, G.; WEISS, B. and BRODIE, B.B. (1968)

A simple sensitive method for the assay of adenylyl cyclase.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 163, 378-385.

KRUSE, E. and SCHOLZ, H. (1978)

Effect of theophylline on myocardial adenyate cyclase activity.
Experientia, 34, 504-505.

KUO, J.F. and GREENGARD, P. (1972)

An assay method for cyclic AMP and cyclic GMP based upon their abilities to activate cyclic AMP dependant and cyclic GMP dependent protein kinases.
Advanc. Cyclic Nucleotide Res., 2, 423-441.

KUO, J.F.; LEE, T.P.; REYES, P.L.; WAKTON, K.G.; DONNELLY, T.E. and GREENGARD, P. (1972).

Cyclic nucleotide dependent protein kinases. An Assay method for the measurement of guanosine 3',5' monophosphate in various biological materials and a study of agents regulating its levels in brain and heart.
J. Biol. Chem., 247, 16-22.

LAI, F.M.; UDENFRIENDS, S. and SPECTOR, S. (1975)

Presence of norepinephrine and related enzymes in isolated brain microvessels.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4622-4625.

LAURSEN, H. and WESTERGAARD, E. (1977)

Enhanced permeability to horseradish peroxydase across cerebral vessel in the Rat after portacaval anastomosis.

Neuropath. Appl. Neurobiol., 3, 29-43.

LE BEUX, Y.J. and WILLEMOT, J. (1978)

Actin like filaments in the endothelial cells of adult Rat brain capillaries.

Exptl. Neurol., 58, 446-454.

LEWANDOWSKY, M. (1900)

Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit

Z. Klin. Med., 40, 480-484.

LIMBIRD, L.E. and LEFKOWITZ, R.J. (1975)

Myocardial Guanylate cyclase : Properties of the enzyme and effects of cholinergic agonists in vitro.

Biochim. Biophys. Acta, 377 , 186-196.

LOWRY, O.R.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDAL, R.J. (1951)

Protein measurements with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193 , 265-275.

LUFT, J.H. (1961)

Improvement in epoxy resin embedding methods.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 9 , 409-412.

MAJNO, G. (1965)

Ultrastructure of the vascular membrane

In W.F. HAMILTON and P. DOW (Eds), Handbook of Physiol., Sect. 2, Circulation, Am. Physiol. Soc., Washinton, 3 , 2293-2375.

MANGANIELLO, V.; EVANS, W.H.; STOSSEL, T.P.; MASON, R.J. and VAUGHAN, N.M. (1971)

The effect of Polystyrene Beds on Cyclic 3',5' Adenosine Monophosphate Concentration in Leukocytes.

J. Clin. Invest., 50 , 2741-2744.

MARINETTI, G.V.; RAY, R. and TOMASI, V. (1969)

Glucagon and epinephrine stimulation of adenylcyclase in isolated Rat liver plasma membranes.

Biochem. Biophys. Res. Commun, 36 , 185-191.

MARKS, F. (1973)

The second messenger of Mouse epidermis.

Biochem. Biophys. Acta, 304 , 349-354.

MASER, S.K.; HOLTZMAN, E.; SCHWARTZ, I.L. and WALTER, R. (1971)

Correlation between pinocytosis and hydroosmosis induced by neurohypophysial hormones and mediated by adenosine 3',5' cyclic monophosphate.

J. Cell. Biol., 49 , 582-594.

MASON, R.J.; STOSSEL, T.P. and VAUGHAN, N.M. (1973)

Quantitative studies of phagocytosis by alveolar macrophages.

Biochem. Biophys. Acta, 304 , 864-870.

MEEZAN, E.; BRENDEL, K. and CARLSON, E.C. (1974)

Isolation of a purified preparation of metabolically active retinal blood vessels.

Nature, 251 , 65-67.

MOSES, V. (1976)

Concerning cyclic AMP.

Sci. Prog. Oxf., 63 , 503-520.

MRSULJA, B.B.; MRSULJA, B.J.; FUJIMOTO, T.; KLATZO, I. and SPAT, M. (1976)

Isolation of brain capillaries: a simplified technique.

Brain Res., 110 , 361-365.

NAHORSKI, S.R. and ROGERS, K.J. (1976)

Inhibition of 3'-5' nucleotide phosphodiesterase and the stimulation of cerebral cyclic AMP formation by biogenic amines in vitro and in vivo.

Neuropharmacology, 15 , 609-612.

NATHANSON, J.A. (1977)

Cyclic nucleotides and nervous system function.

Physiol. Rev., 57 , 158-233.

NATHANSON, J.A. and GRENGAARD, P. (1976)

Cyclic nucleotides and synaptic function.

In J. SIEGEL, R.W. ALBERS, R. KATZMAN and B.W. AGRANOFF (Eds), Basic Neurochemistry, Little Brown, Boston, 1976, 246-262.

NEMECEK, G. M. (1980)

Properties of adenylate cyclase and cyclic phosphodiesterase in Hamster isolated capillary preparations.

Biochim. Biophys. Acta, 628 , 125-135.

NEMOZ, G.; PRIGENT, A.F. and PACHECO, H. (1978)

Inhibition of heart and brain cyclic adenosine 3'-5' monophosphate phosphodiesterase by new non steroidal compounds structurally related to natural cardenolides.

Biochem. Pharmacol., 27, 2769-2774.

OSNES, J.B.; CHRISTOFFERSEN, T.; MORLAND, J. and OYE, I. (1972)

Paper chromatography combined with phosphodiesterase treatment in the determination of radioactively labelled cyclic 3',5' adenosine monophosphate.

J. Chromatogr., 67, 139-147.

OWMAN, Ch.; EDVINSSON, L.; HARDEBO, J.E.; GROSCHEL-STEWART, U.; UNSIKER, K. and WALLE, B. (1977)

Immunohistochemical demonstration of actin and myosin in brain capillaries.

Acta Physiol. Scand., Suppl., 452, 69-71.

PALADE, G.E. (1953)

Fine structure of blood capillaries.

J. Appl. Phys., 24, 1424 (Abstract).

PANNBACKER, J.L. and BREVARD, M. (1972)

Cyclic nucleotide phosphodiesterase : High activity in a mammalian photoreceptor.

Science, 175, 757-758.

PARK, B.H.; GOOD, R.A.; BECK, N.B. and DAVIES, B.B. (1971)

Concentration of cyclic adenosine 3',5' monophosphate in Human Leukocytes during phagocytosis.

Nature New Biology, 229, 126-139.

PHILLIS, J.W. (1977)

The role of cyclic nucleotides in the CNS

J. Can. Sci. Neurol., 4, 153-195.

PRICE, T.D., ASCHMAN, D.F., MELICOW, M.M. (1967)

Organophosphates of urine including adenosine 3',5' monophosphate and guanosine 3',5' monophosphate.

Biochem. Biophys. Acta, 138 , 452-463.

RAO, G.J.S.; DELMONTE, M. and NADLER, H.L. (1971)

Adenylcyclase activity in cultivated human skin fibroblasts

Nature New Biology, 232 , 253-259.

REESE, T.S. and KARNOVSKY, M.J. (1967)

Fine structural localization of blood brain barrier to exogenous peroxidase.

J. Cell. Biol., 34 , 207-217.

REYNERS, H.; GIANFELICI de REYNERS, E.; JADIN, J.M. and MAIJIN, J.R. (1975)

An ultrastructural quantitative method for the evaluation of the permeability of horseradish peroxidase of cerebral cortex endothelial cells of Rat.

Cell Tiss. Res., 57 , 93-99.

REYNOLDS, E.S. (1963)

The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.

J. Cell. Biol., 17 , 208-212.

ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W. and SUTHERLAND, E.W. (1971)

Cyclic AMP.

New-York, Academic Press. (1971)

RODBELL, M. (1975)

Method for the isolation of Rat liver membranes and fat cells "ghosts"; An assay method for adenylate cyclase.

In Methods in Molecular Biology, Eds by Chassin, 3 , 103-124.

- RODESCH, F.R.; NEVE, P. and DUMOND, J.E. (1970)
Phagocytosis of Latex Beads by isolated Thyroid Cells.
Exp. Cell. Res., 60 , 354-360.
- ROUX, E. and BORREL, A. (1898)
Tétanos cérébral et immunité contre le tétanos.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 4 , 225-239.
- RYAN, J. and STORM, D.R. (1974)
Solubilization of glucagon and epinephrine sensitive adenylate cyclase
from Rat liver plasma membranes.
Biochem. Biophys. Res. Commun, 60 , 127-135.
- SANDLER, J.A.; CLYMAN, R.I.; MANGANIELLO, V.C. and VAUGHAM, M. (1975)
The effect of serotonin (5-Hydroxytryptamine) and derivatives on guanosine
3',5' monophosphate in Human Monocytes.
J. Clin. Invest., 55 , 431-435.
- SCHMIDT-GAYK, N.E.; JAKOBS, K.M. and HACKENTHAL, E. (1975)
Cyclic AMP and Phagocytosis in Alveolar Macrophages: Influence of hormones
and Dibutyryl Cyclic AMP.
J. Reticuloendothelial Soc., 17 , 251-261.
- SCOTT, R.E. and DOUSA, T.P. (1978)
Plasma Membrane Cyclic AMP Dependent Protein Phosphorylation System in
L₆ Myoblasts.
Biochim. Biophys. Acta, 509 , 499-509.
- SESSA, G.; ORLOWSKI, M. and GREEN, J.P. (1970)
Isolation from bovine brain of a fraction containing capillaries and a
fraction containing membrane fragments of the choroïd plexus.
J. Neurobiol., 7 , 51-61.

SEYBERTH, H.W., SCHMIDT-GAYK, H., JAKOBS, K.N. and HACKENTHAL, E. (1973)
Cyclic adenosine monophosphate in phagocytizing granulocytes and
alveolar macrophages.

J. Cell. Biol., 57 , 567-571.

SHEPPARD, H. and WIGGAN, G. (1971)

Analogues of 4-(3,4-dimethoxybenzyl)-2-imidazolidinone as potent inhibitors of Rat erythrocyte adenosine cyclic 3',5' phosphate phosphodiesterase.

Mol. Pharmacol., 7 , 111-115.

SIAKOTOS, A.N. and FLEISCHER, S. (1969)

Isolation of highly purified human and bovine brain endothelial cells and nuclei and their phospholipid composition.

Lipids, 4 , 234-239.

SIMON, G. (1966)

Ultrastructure des capillaires.

In M. COMEL and L. LASZT (Eds), Morphologie et histochimie de la paroi vasculaire, Karger, Bâle, 370-434.

SNYDER, F.F. and DRUMMOND, G.J. (1978)

Activation and stabilisation of cardiac adenylate cyclase by GTP analog and fluoride.

Arch. Bioch. Biophys., 185 , 116-125.

SPRUILL, A.W.; STEINER, A.L. and EARP, H.S. (1978)

Tissue Guanosine 3',5' Cyclic Monophosphate Levels and Soluble Guanylate Cyclase Activity.

J. Clin. Invest., 21 , 568-576.

STEINER, A.L.; FERRENDELLI, J.A. and KIPNIS, D.M. (1972)

Radioimmunoassay for cyclic nucleotides/III- Effect of ischemia, changes during development and regional distribution of adenosine 3',5' monophosphate and guanosine 3',5' monophosphate in Mouse brain.

J. Biol. Chem., 247 , 1121-1124.

STEFANOVICH, V. (1979)

Influence of theophylline on concentration of cyclic 3'-5' adenosine monophosphate and cyclic 3',5' guanosine monophosphate of Rat brain.

Neurochem. Res., 4 , 587-594.

STEINER, A.L., PARKER, C.W. and KIPNIS, D.M. (1970)

Adenosine 3',5' monophosphate in mammalian tissues and body fluids.

J. Clin. Invest., 49 , 43-49.

STERN, L.S. et GAUTIER, R. (1922)

Les rapports entr le liquide céphalorachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal.

Arch. Intern. Physiol., 17 , 391-488.

St LOUIS, P.J. and SULAKHE, P.V. (1976)

Isolation of sarcolemmal membranes from cardiac muscle.

Int. J. Biochem., 7 , 547-558.

STOCKEN, W. and KLEIN, H.P. (1979)

Pinocytosis and Locomotion in Amoebae

XV. Demonstration of Ca^{++} - Binding Sites During Induced Pinocytosis in Amoebae proteus.

Protoplasma, 100 , 33-43.

STOSSEL, T.P. (1977)

Endocytosis

In P. CUATRECASAS and M.F. GREAVES (Eds), Receptors and recognition, Chapman and Hall, London, 4 , 103-141.

SULAKHE, S.J.; LEUG, N.L.K.; SULAKHE, P.V. (1976a)

Properties of particulate membrane associated and soluble guanylate cyclase from cardiac muscle, skeletal muscle, cerebral cortex and liver.

J. Biol. Chem., 157 , 713-719.

SULAKHE, P.V.; SULAKHE, S.J.; LEUG, N.L.K., S^t LOUIS, P.J.; HICKIE, R.A. (1976b)
 Guanylate cyclase : Subcellular distribution in cardiac muscle, skeletal muscle, cerebral cortex and liver.

J. Biol. Chem., 157 , 705-712.

SUTHERLAND, E.W.; RALL, T.W. and MENON, T. (1962)

Adenyl cyclase : I- Distribution, Preparation and Properties.

J. Biol. Chem., 237 , 1220-1227.

SWISLOCKI, N.I. and TIERNEY, J. (1973)

Solubilization, Stabilization, and Partial Purification of brain Adenylate cyclase from Rat.

Biochemistry, 12 , 1862-1870.

TURBA, F. und TURBA, M. (1951)

Trennung von Abkömmlingen der Adenosin Triphosphorsäure (ATP) durch Verteilungschromatographie in Filterpapier.

Naturwissenschaften, 4 , 186-190.

VERBERT, A. et CACAN, R. (1972)

Description d'un procédé électrophorétique de séparation de l'AMPc de ses métabolites. Application à la détermination de l'activité adénylcyclasique.

Biochimie, 54 , 1491-1492.

VESELY, D.L.; CHOWN, J. and LEVEY, G.S. (1976)

Guanylate cyclase activity in fetal, neonatal and adult Rat heart.

J. Mol. Cell Cardiol., 8 , 909-913.

WALTER, F.K. (1933)

Die allgemeinen grundlagen des Stoffaustauscher zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper.

Arch. Psychiat. Nervenkr., 101 , 195-230.

WATSON, M.L. (1958)

Staining of tissue for electron microscopy with heavy metals.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 4 , 475-478.

WEISS, B. (1973)

Selective regulation of the multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase by norepinephrine and other agents.

In *Frontiers in Catecholamine Research*, Eds E. Usdin and S.H. Snyder, New-York, Pergamon press, 327-333.

WEISS, B. and COSTA, E. (1968)

Regional and subcellular distribution of adenylyl cyclase and 3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase in brain and pineal gland.

Biochem. Pharmacol., 17, 2107-2116.

WELLS, J.N.; WU, Y.J.; BAIRD, C.E. and HARDMAN, J.G. (1975)

Phosphodiesterase from porcine coronary arteries: Inhibition of separated forms by xanthines, papaverines and cyclic nucleotides.

Mol. Pharmacol., 11, 775-783.

WESTERGAARD, E. (1975)

The effect of serotonin, norepinephrine and cyclic AMP on the blood brain barrier.

J. Ultrastruct. Res., 50, 383-391.

WESTERGAARD, E. (1977)

The blood brain barrier to horseradish peroxidase under normal and experimental conditions.

Acta Neuropath. (Berl.), 39, 181-187.

WESTERGAARD, E.; GO, G.; KLATZO, I. and SPATZ, M. (1976)

Increased permeability of cerebral vessels to horseradish peroxidase induced by ischemia in mongolian Gerbils.

Acta Neuropath. (Berl.), 35, 307-325.

WESTERGAARD, E.; VAN DEURS, B. and BRONSTED, H.E. (1977)

Increased vesicular transfert of horseradish perowidase across cerebral endothelium evoked by acute hypertension.

Acta Neuropath. (Berl.), 37, 141-152.

WETZEL, B.K.; SPICER, S.S. and WOLLEMAN, S.H. (1965)

Changes in fine structure and acid phosphate localization in Rat thyroid cells following thyrotropin administration.

J. Cell. Biol., 25 , 593-599.

ZWILLER, J. et MANDEL, P.

Purification de la guanylate cyclase du cerveau de Rat.

C. R. Acad. Sci., Paris, 286 , 423-425.

