

Université de Montréal

**Implications fonctionnelles du PACAP dans la sécrétion
des catécholamines par la médullosurrénale.**

Par

Stéphane Lamouche

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Février 2003

©Stéphane Lamouche, 2003



QV
705
U58
2003
v.012

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Implications fonctionnelles du PACAP dans la sécrétion
des catécholamines par la médullosurrénale.**

Présentée par

Stéphane Lamouche

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:



Président-rapporteur



Directeur de recherche



Membre du jury



Examineur externe



Représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Les médullosurrénales sécrètent des catécholamines en réponse à un stress dans le but de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Il est reconnu que certains neuropeptides sont co-libérés avec l'acétylcholine par les fibres nerveuses splanchniques afin de stimuler ou moduler la sécrétion des catécholamines par les médullosurrénales. Le PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*) est l'un de ces neuropeptides susceptible d'être impliqué dans les fonctions sympatho-surrénales. Dans la médullosurrénale, le PACAP est présent dans les terminaisons nerveuses splanchniques qui innervent les cellules chromaffines, à la surface desquelles on retrouve d'ailleurs une forte densité de récepteurs PAC₁ spécifiques au PACAP. Une perfusion de PACAP dans la glande surrénale augmente la sécrétion des catécholamines dans des conditions *in vitro*. De plus, le PACAP est libéré dans la glande surrénale isolée et perfusée de rat et de porc suite à une stimulation électrique de celle-ci. Collectivement, ces observations antérieures obtenues dans des conditions *in vitro* suggèrent que le PACAP serait à la fois un neurotransmetteur et un neuromodulateur peptidique co-libéré avec l'acétylcholine afin de contrôler localement les fonctions sécrétrices de la médullosurrénale lors d'une véritable activation du système sympatho-surrénalien *in vivo*. Toutefois, une telle implication fonctionnelle du PACAP endogène dans le système sympatho-surrénalien au cours de situations physiologiques ou pathophysiologiques demeure principalement hypothétique étant donné le nombre limité de démonstrations expérimentales dans des conditions *in vivo*. Nous avons donc entrepris d'étudier le rôle fonctionnel du PACAP dans la régulation locale de la sécrétion des catécholamines surrénales chez le chien *in vivo*.

Dans la première partie de ce travail, nous avons voulu déterminer si le PACAP pouvait moduler localement la sécrétion des catécholamines. Les résultats de cette étude montrent que la sécrétion des catécholamines induite soit par une stimulation directe du nerf splanchnique ou soit par une infusion locale d'acétylcholine est amplifiée en présence du PACAP exogène. Ces résultats suggèrent fortement une implication du PACAP en tant que neuromodulateur, facilitant la sécrétion des catécholamines par un mécanisme localisé probablement au niveau des cellules chromaffines. En second lieu, nous avons entrepris des

études similaires afin de vérifier l'implication fonctionnelle du récepteur PAC₁ dans la sécrétion des catécholamines induite par le PACAP. L'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur PAC₁ a diminuée d'environ 95% la réponse des catécholamines au PACAP. Ces résultats ont permis de conclure que les récepteurs PAC₁ sont impliqués de manière importante dans la sécrétion des catécholamines en réponse au PACAP. Par la suite, nous avons tenté de déterminer si le PACAP endogène pouvait bel et bien être libéré dans l'effluent veineux de la glande surrénale durant une stimulation du nerf splanchnique. En réponse à une stimulation directe du nerf splanchnique à des fréquences croissantes de 0,2, 2 et 20 Hz, les concentrations plasmatiques du PACAP ont augmenté de manière fréquence-dépendante. Les résultats de cette étude montrent que le PACAP endogène est libéré dans la glande surrénale particulièrement lorsque le système sympatho-surrénalien est fortement activé. Enfin, nous avons vérifié si la présence du PACAP dans la glande surrénale pouvait influencer localement la sécrétion des catécholamines durant une activation réflexe du système sympatho-surrénalien. L'injection intraveineuse du vasodilatateur nitroprussiate de sodium a provoqué une chute importante de la pression artérielle se traduisant par une augmentation marquée de la sécrétion des catécholamines. En présence de PACAP localement infusé, la sécrétion des catécholamines en réponse à l'hypotension sévère a été amplifiée. Cette étude supporte notre observation de la première étude, renforçant un rôle en tant que neuromodulateur pour le PACAP dans la glande surrénale.

Collectivement, nos études suggèrent que le PACAP est impliqué dans la régulation de la sécrétion des catécholamines surrénaliennes lors d'une activité neuronale intense dans le système sympatho-surrénalien et montrent que le PACAP joue un rôle facilitateur en tant que neuromodulateur dans les fonctions sympatho-surrénaliennes *in vivo*.

SUMMARY

The adrenal medulla releases catecholamines in responses to stress in order to maintain homeostasis. It is acknowledged that various neuropeptides are co-released along with acetylcholine from splanchnic nerve endings to mediate and/or modulate catecholamine secretion from the adrenal medulla. PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) is thought to be one of these neuropeptides involved in sympathoadrenal functions. In the adrenal medulla, PACAP is present in the splanchnic nerve endings innervating the chromaffin cells, on the surface of which the PACAP-specific receptor, PAC₁, is highly expressed. Infusion of PACAP in the adrenal gland increases adrenal catecholamine release in *in vitro* conditions. Furthermore, PACAP is released from the isolated, perfused rat and porcine adrenal glands. Collectively, these previous *in vitro* studies suggest that PACAP may be a peptidergic cotransmitter released along with acetylcholine from splanchnic nerve endings to control locally the adrenomedullary functions during an actual stimulation of the sympathoadrenal system *in vivo*. However, such a functional implication of PACAP in the sympathoadrenal system in physiological and/or pathophysiological situations still remains mostly conjectural considering the limited number of experimental demonstrations under *in vivo* conditions. We have thus undertaken to study in the dog *in vivo* the physiological role of PACAP in the local regulation of adrenal catecholamine secretion.

In the first part of this work, we have investigated if PACAP could modulate locally the catecholamine secretion. The results of this study showed that catecholamine secretion induced by either splanchnic nerve stimulation or locally applied exogenous acetylcholine were potentiated by a local infusion of PACAP. These results strongly suggest that PACAP may play a role as a neuromodulator, facilitating the catecholamine secretion by a mechanism localized presumably at the chromaffin cell level. Secondly, we have undertaken similar experiments to verify the functional implication of the PAC₁ receptor in the PACAP-induced catecholamine secretion. In the presence of a PAC₁ receptor antagonist, we showed that the PACAP-induced catecholamine secretion was attenuated by approximately 95%. It is concluded that the PAC₁ receptor is primarily involved in the catecholamine secretion induced by PACAP. Afterwards, we tried to determine whether endogenous PACAP could

actually be released into the adrenal venous effluent during direct splanchnic nerve stimulation. In response to a direct splanchnic nerve stimulation with increasing frequencies, the plasma concentrations of PACAP increased in a frequency-dependent manner. These results demonstrate that endogenous PACAP can be released in the adrenal gland particularly when the sympathoadrenal system is highly activated. Finally, we have studied whether PACAP in the adrenal gland can modulate the medullary response to sympathoadrenal reflex activation. Intravenous injection of the vasodilator sodium nitroprusside caused a severe hypotension resulting in a marked increase in catecholamine secretion. In the presence of locally infused PACAP, the catecholamine response to severe hypotension was potentiated. This study further supports our early observation, reinforcing the role of PACAP as a neuromodulator in the adrenal facilitating medullary function.

Taken together, a series of our *in vivo* studies suggests that PACAP is involved in the local regulation of adrenal catecholamine secretion during intense neuronal activity in the sympathoadrenal system and that PACAP may play a role as neuromodulator, facilitating the sympathoadrenal functions.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	v
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xv
REMERCIEMENTS.....	xviii
INTRODUCTION	1
I. LE SYSTÈME NERVEUX AUTONOME	2
A. Fonctions générales.....	2
B. Organisation anatomique du système nerveux autonome.....	3
C. La transmission neurohumorale dans le système nerveux autonome	7
D. La transmission cholinergique	11
1. Biosynthèse, emmagasinage, libération et dégradation de l'acétylcholine.....	11
2. Les récepteurs de l'acétylcholine.....	14
E. La transmission adrénergique	21
1. Biosynthèse des catécholamines	22
2. Emmagasinage des catécholamines	26
3. Libération des catécholamines	27
4. Inactivation des catécholamines	32
5. Les récepteurs adrénergiques	39
II. LES GLANDES MÉDULLOSURRÉNALES	49
A. Morphologie générale	49
B. Vascularisation de la médullosurrénale	51
C. Innervation de la médullosurrénale.....	52

D.	Régulation de la sécrétion des catécholamines surrénaliennes	57
1.	Connections centrales	57
2.	Régulation locale	59
E.	Importance physiopathologique des catécholamines circulantes	67
III.	LE PITUITARY ADENYLATE CYCLASE-ACTIVATING POLYPEPTIDE (PACAP).....	70
A.	Distribution du PACAP dans le système nerveux autonome.....	71
B.	Biosynthèse, emmagasinage, libération et dégradation du PACAP	73
C.	Récepteurs du PACAP.....	76
D.	Effets du PACAP sur la médullosurrénale.....	81
IV.	PROBLÉMATIQUES.....	85
V.	OBJECTIFS DE LA PRÉSENTE ÉTUDE.....	87
	MÉTHODOLOGIE.....	89
I.	PRÉPARATION DE L'ANIMAL.....	90
A.	Injection locale des médicaments à la glande surrénale gauche	90
B.	Dénervation chirurgicale de la glande surrénale gauche.	91
C.	Circuit veineux surrénalien extra-corporel	94
D.	Détermination des paramètres biochimiques	96
1.	Dosage des catécholamines plasmatiques.....	96
2.	Dosage du PACAP plasmatique	100
	RÉSULTATS.....	101
	PREMIÈRE PARTIE: <i>MODULATION OF ADRENAL CATECHOLAMINE RELEASE BY PACAP IN</i>	
	<i>VIVO</i>	102
	RÉSUMÉ	103
	SUMMARY	104
	INTRODUCTION	106
	METHODS	107
	RESULTS	113
	DISCUSSION	116
	PERSPECTIVES	123
	REFERENCES	132

DEUXIÈME PARTIE: <i>ROLE OF PAC₁ RECEPTOR IN ADRENAL CATECHOLAMINE SECRETION INDUCED BY PACAP AND VIP IN VIVO</i>	138
RÉSUMÉ	139
SUMMARY	140
INTRODUCTION	142
METHODS	143
RESULTS	148
DISCUSSION	151
PERSPECTIVES	155
REFERENCES	165
TROISIÈME PARTIE: <i>PACAP RELEASE FROM THE CANINE ADRENAL GLAND IN VIVO: ITS FUNCTIONAL ROLE IN SEVERE HYPOTENSION</i>	172
RÉSUMÉ	173
SUMMARY	174
INTRODUCTION	176
METHODS	177
RESULTS	185
DISCUSSION	189
PERSPECTIVES	196
REFERENCES	206
SYNTHÈSE ET DISCUSSION GÉNÉRALE.....	213
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	228
RÉFÉRENCES	232

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Organisation anatomique du système nerveux autonome.	6
Figure 2. Représentation schématique de la synthèse de l'acétylcholine dans les terminaisons nerveuses cholinergiques et de son métabolisme dans la fente synaptique.	13
Figure 3. Structure moléculaire du récepteur cholinergique nicotinique.	15
Figure 4. Mécanismes intracellulaires des récepteurs muscariniques M ₁ et M ₃ (et probablement M ₅).	18
Figure 5. Mécanismes intracellulaires des récepteurs muscariniques M ₂ (et probablement M ₄).	19
Figure 6. Diagramme illustrant les étapes enzymatiques de la biosynthèse des catécholamines.	25
Figure 7. Rôle des protéines SNAREs dans l'exocytose.	31
Figure 8. Étapes du recyclage métabolique des catécholamines.	37
Figure 9. Représentation schématique des voies métaboliques neuronales et extraneuronales pour la norépinéphrine (NE) avant et après l'entrée de la norépinéphrine et de ses métabolites dans la circulation sanguine.	38
Figure 10. Mécanismes intracellulaires des récepteurs β-adrénergiques dans l'activation du muscle lisse.	42
Figure 11. Mécanismes intracellulaires des récepteurs α ₁ -adrénergiques.	45
Figure 12. Mécanismes intracellulaires des récepteurs α ₂ -adrénergiques.	47

- Figure 13. Représentation schématique de l'innervation de la glande surrénale du rat montrant l'origine ainsi que les neurotransmetteurs putatifs des fibres nerveuses pré-ganglionnaires, post-ganglionnaires et sensorielles.56
- Figure 14. Diagramme de la région de la glande surrénale montrant la canulation de la veine surrénalienne et de l'artère lombo-surrénale.93
- Figure 15. Diagramme de l'aménagement expérimental montrant la circulation extra-corporelle du sang veineux surrénalien.95
- Figure. 16. Adrenal epinephrine and norepinephrine output in response to the administration of PACAP27 (0.5, 5 and 50 ng) with A) sham stimulation; B) to repetitive direct splanchnic nerve stimulation and C) to the same stimulation in the group receiving PACAP27 (0.5, 5 and 50 ng).125
- Figure. 17. Maximum net increases (Δ) in epinephrine and norepinephrine output in the group receiving saline, PACAP27 (50 ng), direct splanchnic nerve stimulation (SNS; 2 Hz), and SNS in the presence of PACAP27 (50 ng).126
- Figure. 18. Adrenal epinephrine and norepinephrine output in response to repeated administrations of ACh (0.5 mg) given at 0 and 15 min in the group receiving A): the vehicle (saline, SA) and B): PACAP27 (50 ng).127
- Figure. 19. Maximum net increases (Δ) in epinephrine and norepinephrine output in the group receiving saline, PACAP27 (50 ng), ACh (0.5 mg) and the combined infusion of PACAP27 (50 ng) and ACh (0.5 mg).128
- Figure 20. Adrenal epinephrine and norepinephrine output in response to repeated administrations of PACAP27 (50 ng) given at 3 and 33 min in the control group receiving the vehicle (saline).158
- Figure 21. Adrenal epinephrine and norepinephrine output in response to repeated administrations of PACAP27 (50 ng) given at 3 and 33 min in the group receiving PACAP6-27 (7.5 μ g).159

- Figure 22. Adrenal epinephrine and norepinephrine output in response to repeated administrations of PACAP27 (50 ng) given at 3 and 33 min in the group receiving PACAP6-27 (15 μ g).160
- Figure 23. Percent changes in the net amount of epinephrine and norepinephrine released during the first 5 min after the onset of the second infusion of PACAP27 (50 ng) in presence of PACAP6-27 with the dose of 7.5 μ g and 15 μ g.161
- Figure 24. Net amount of epinephrine and norepinephrine released during the first 5 min after the onset of each infusion of PACAP27 (50 ng) in absence and presence of 15 μ g of VIP10-28.....162
- Figure 25. Net amount of epinephrine and norepinephrine released during the first 5 min after the onset of each infusion of VIP (5 μ g) in the absence and presence of 15 μ g of VIP10-28.....163
- Figure 26. Net amount of epinephrine and norepinephrine released during the first 5 min after the onset of each infusion of VIP (5 μ g) in absence and presence of 15 μ g of PACAP6-27164
- Figure 27. Adrenal epinephrine norepinephrine and PACAP-38-ir output in response to splanchnic nerve stimulation at 0.2, 2, and 20 Hz.201
- Figure 28. Adrenal epinephrine and norepinephrine output and mean arterial pressure in the group receiving the vehicle; a single intravenous bolus dose of SNP; a local infusion of PACAP-27 into the left adrenolumbar artery; and a local infusion of PACAP-27 combined with a bolus injection of SNP.....202
- Figure 29. Maximum net increases in epinephrine and norepinephrine output obtained during the first 5 min following SNP administration and/or PACAP-27 infusion.203

- Figure 30. Adrenal epinephrine and norepinephrine output and mean arterial pressure in response to a single bolus dose of SNP given intravenously in the groups with either normal innervated or acute denervated left adrenal gland.204
- Figure 31. Maximum net increases in epinephrine and norepinephrine output obtained during the first 5 min following SNP administration in the group with either the normally innervated or acutely denervated left adrenal gland205
- Figure 32. Illustration schématique des mécanismes qui sous-tendent l'implication du PACAP dans la sécrétion des catécholamines surrénaliennes.....231

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Principales caractéristiques des sous-types de récepteurs cholinergiques.....	20
Tableau II. Principales caractéristiques des sous-types de récepteurs adrénergiques.	48
Tableau III. Actions de différentes substances endogènes sur la sécrétion basale des catécholamines surrénaliennes.....	69
Tableau IV. Principales caractéristiques pharmacologiques des récepteurs du PACAP.....	79
Tableau V. Actions biologiques du PACAP dans les tissus périphériques.	80
Tableau VI. Composition de la solution préservative.....	98
Tableau VII. Préparation de la solution tampon $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ à 2 M.....	99
Tableau VIII. Composition de la <i>solution A</i>	99
Table IX. Plasma catecholamine concentrations in adrenal venous and aortic blood, adrenal venous blood flow, adrenal venous hematocrit, mean aortic pressure and heart rate in the group receiving PACAP27 during sham-stimulation	129
Table X. Plasma catecholamine concentrations in adrenal venous and aortic blood, adrenal venous blood flow, adrenal venous hematocrit, mean aortic pressure and heart rate in the group receiving PACAP27 during splanchnic nerve stimulation	130
Table XI. Plasma catecholamine concentrations in adrenal venous and aortic blood, adrenal venous blood flow, adrenal venous hematocrit, mean aortic pressure and heart rate in the group receiving PACAP27 during ACh administration	131
Table XII. Initial values for adrenal venous and aortic catecholamines, mean aortic pressure, heart rate, left adrenal venous blood flow and hematocrit, and postmortem wet weight of left adrenal gland in the group receiving either PACAP27 or VIP in presence of various drugs.....	157
Table XIII. Changes in plasma PACAP-38-ir and catecholamine concentrations and hemodynamic parameters before and during direct splanchnic <i>nerve</i> stimulation in dogs.	198
Table XIV. Changes in plasma catecholamine concentrations and hemodynamic parameters in dogs receiving either SNP or PACAP-27 alone or a combination of both treatments. ..	199
Table XV. Changes in plasma catecholamine concentrations and hemodynamic parameters in dogs with left adrenal denervation receiving SNP.....	200

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AChE,	Acétylcholinesthérase
ADN,	Acide désoxyribonucléique
AMPc,	Adénosine monophosphate cyclique 3'5'
ARNm,	Acide ribonucléique messenger
ATP,	Adénosine triphosphate
Ca ²⁺ ,	Calcium
CGRP,	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i> (peptide apparenté au gène de la calcitonine)
CLHP,	Chromatographie liquide à haute pression
COMT,	Catéchol-O-méthyltransférase
DAG,	1,2-diacylglycérol
DHPG,	Alcool 3,4-dihydroxy-phényléthylèneglycol
DMPP,	1,1-diméthyl-4-phénylpipérazinium
DOMA,	Acide 3,4-dihydroxymandélique
DOPA,	Dihydroxyphenylalanine
DOPGAL,	3,4-dihydroxyphénylglyco-aldéhyde
DβH,	Dopamine β-hydroxylase
GABA,	acide γ-aminobutyrique
GMPC,	Guanosine 3'-5'-monophosphate cyclique
GTP,	Guanosine 5'-triphosphate
i.v.,	Intraveineux(se)
IP ₃ ,	Inositol 1,4,5-triphosphate
K ⁺ ,	Potassium
MAO,	Monoamine oxidase
MHPG,	3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol
Na ⁺ ,	Sodium
NEP,	Endopeptidase neutre EC 3.4.24.11
NO,	<i>Nitric oxide</i> (monoxyde d'azote)

NPY,	Neuropeptide tyrosine
PAC ₁ ,	Récepteur au PACAP de type I
PACAP,	<i>Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide</i> (peptide hypophysaire activateur de l'adénylyl cyclase)
PC,	Prohormones-convertases
PGE ₂ ,	Prostaglandine E ₂
PKA,	Protéine-kinase dépendante de l'AMPc
PKC,	Protéine kinase C
PNMT,	Phényléthanolamine-N-méthyltransférase
Protéine G,	Protéine régulatrice liant le GTP
Protéine G _i ,	Protéine G inhibitrice
Protéine G _q ,	Protéine G ubiquitaire
Protéine G _s ,	Protéine G stimulatrice
SNP,	<i>Sodium nitroprusside</i> (nitroprussiate de sodium)
VIP,	<i>Vasoactive Intestinal Polypeptide</i> (peptide intestinal vasoactif)
VMA,	Acide vanillymandélique
VPAC ₁	Récepteur au PACAP et au VIP de type I
VPAC ₂ ,	Récepteur au PACAP et au VIP de type II

*À mes parents, sans eux rien de
tout cela n'aurait été possible.*

*À Stéphanie, ma bien-aimée,
pour son soutien indéfectible.*

REMERCIEMENTS

J'aimerai d'abord exprimer ma profonde gratitude au Dr Nobuharu Yamaguchi, mon mentor mais également un ami. Sa passion contagieuse pour la recherche, ses conseils judicieux et sa très grande disponibilité furent déterminants à ma formation scientifique. Je garde un merveilleux souvenir de mon séjour dans son laboratoire.

Je voudrai remercier sincèrement Madame Sanaë Yamaguchi pour son support technique exceptionnel grandement apprécié au cours de mes travaux.

Je suis très reconnaissant envers Richard Lalande, Jean-Marc Chianetta et Éric Himaya pour leur précieuse collaboration.

Une pensée particulière à tous mes amis et confrères de la Faculté de pharmacie pour l'amitié, les discussions stimulantes, d'aspect scientifique ou non. Merci à Patrick Gosselin, Jean-François Bouchard, Grégoire Leclerc, Richard Quesnel, Thamer Sharkawi, Huy Hao Dao et tous les membres du Groupe de recherche sur le système nerveux autonome (GRSNA).

Mes remerciements aux Instituts de recherche en santé du Canada, au Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche, à la Société québécoise d'hypertension artérielle, au GRSNA, à la Faculté des études supérieures et à la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal pour leur soutien financier.

*...conclusions involving doubts
as to the "ingenuity" of nature
should be drawn with caution,
for fear of underrating her.*

-von Euler (1956)

Try to learn something about everything and everything about something

-Thomas H. Huxley.

INTRODUCTION

I. LE SYSTÈME NERVEUX AUTONOME

A. Fonctions générales

Le système nerveux autonome est la composante du système nerveux qui est responsable du contrôle des fonctions viscérales de l'organisme. Comme son nom l'indique, il intervient indépendamment du contrôle volontaire dans la régulation des fonctions autonomes: ventilation, pression sanguine, rythme cardiaque, digestion, métabolisme, sécrétion de certaines glandes endocrines. Claude Bernard (1878) et Walter Cannon (1929) furent les premiers à mettre en évidence l'importance du système nerveux autonome dans le maintien et la stabilité de l'environnement interne de l'organisme. Le système nerveux autonome est largement distribué à travers l'ensemble du corps où il se divise en deux structures importantes via lesquelles il achemine les signaux efférents autonomes: le système nerveux *sympathique* et le système nerveux *parasympathique* (Fig. 1, page 6). Ces deux systèmes ont des effets physiologiques complémentaires et souvent opposés. Ainsi, le système sympathique est généralement impliqué dans des situations de stress physiologique, psychologique ou physiopathologique. Son activation augmente la fréquence cardiaque et la pression sanguine, les bronches et les pupilles se dilatent, le débit sanguin est redistribué vers les muscles squelettiques, la glycémie et la transpiration augmentent. Ces effets cataboliques contribuent à préserver l'homéostasie du milieu interne et par conséquent, la survie de l'organisme. Selon les termes de Cannon (1939) cet ensemble de réactions prépare l'organisme à mieux «combattre ou fuir» (*fight or flight*) face à une situation de rage ou de peur. Ces effets le distinguent du système parasympathique qui lui, intervient dans des situations visant plutôt à conserver l'énergie et à maintenir la fonctionnalité des organes au repos. L'activation du système parasympathique produit notamment une

diminution de la fréquence cardiaque et de la pression sanguine, un accroissement des sécrétions et des fonctions gastro-intestinales.

Le système nerveux sympathique est normalement activé en permanence. C'est ce qu'on appelle *le tonus sympathique*. Cette activité constante permet ainsi une adaptation dynamique de l'organisme face à des changements du milieu externe. Toutefois, au repos, l'activité du système parasympathique prédomine dans la plupart des organes.

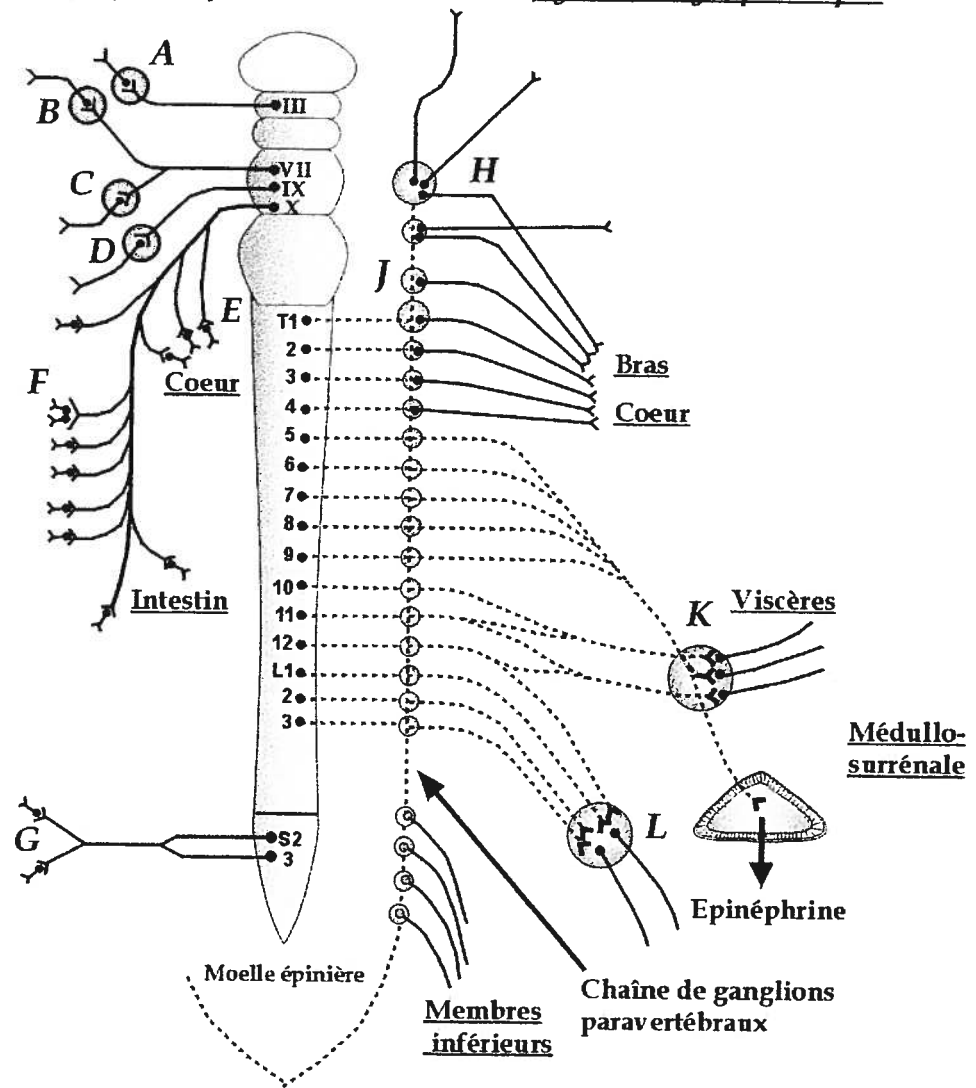
B. Organisation anatomique du système nerveux autonome

Les fibres nerveuses qui composent le système sympathique prennent leur origine au niveau des cordons intermédiaires latéraux de la moelle épinière. Les axones de ces fibres nerveuses que l'on nomme *pré-ganglionnaires*, quittent la moelle épinière par les racines ventrales des nerfs rachidiens depuis le premier segment thoracique (T1) jusqu'au second ou troisième segment lombaire (L2-L3), et effectuent des synapses avec les ganglions sympathiques via le rameau communicant blanc (Landsberg & Young, 1992). Les ganglions sympathiques sont une accumulation de tissus nerveux localisés de part et d'autre de la colonne vertébrale, formant ainsi deux chaînes latérales constituées de 22 paires de ganglions. À partir de ces ganglions sympathiques, des fibres post-ganglionnaires gagnent les nerfs sympathiques qui innervent la plupart des organes. Le principal messenger chimique, ou neuromédiateur, qui assure la transmission synaptique entre les terminaisons sympathiques et les cellules effectrices post-synaptiques est la norépinéphrine (ou noradrénaline) (Lefkowitz *et al.*, 1998). Toutefois, de nombreuses fibres pré-ganglionnaires, du segment thoracique T5 à T12, passent à travers les

ganglions sympathiques pour former les nerfs splanchniques. La majorité des fibres nerveuses splanchniques forment des synapses seulement lorsqu'elles atteignent le ganglion cœliaque alors que d'autres innervent directement les médullosurrénales. Les médullosurrénales sont embryologiquement et anatomiquement identiques aux ganglions sympathiques. Ainsi, les cellules chromaffines qui composent majoritairement les médullosurrénales, sont innervées par des fibres pré-ganglionnaires. Les cellules chromaffines sécrètent principalement l'épinéphrine (ou adrénaline), mais aussi, entre autre, de la norépinéphrine et de la dopamine directement dans la circulation sanguine (Landsberg & Young, 1992). Les cellules chromaffines se comportent donc comme des neurones post-ganglionnaires sympathiques, bien que ces cellules soient dépourvues d'axones ou dendrites de la cellule nerveuse. Nous aurons l'occasion d'aborder la sécrétion de l'épinéphrine et de la norépinéphrine par les médullosurrénales de façon plus détaillée dans les prochains chapitres.

Le système nerveux parasympathique prend son origine au niveau de l'encéphale et de la région craniale de la moelle épinière. Les fibres nerveuses parasympathiques émergent du système nerveux central via les nerfs III, VII, IX, X et sacrés. À l'instar du système sympathique, il est constitué de fibres pré-ganglionnaires et post-ganglionnaires. Toutefois, les axones pré-ganglionnaires s'étendent sans interruption du système nerveux central jusqu'aux structures qu'ils innervent. Là, ils forment des synapses avec des fibres nerveuses post-ganglionnaires situées dans des ganglions parasympathiques se trouvant dans la paroi des organes innervés. Les axones post-ganglionnaires, très courts (1 mm à quelques cm de longueur), font synapse avec des cellules effectrices situées à proximité.

Le neurotransmetteur de toutes les fibres autonomes pré-ganglionnaires, de toutes les fibres parasympathiques post-ganglionnaires ainsi que certaines fibres sympathiques post-ganglionnaires est l'acétylcholine. En fait, la majorité des fibres post-ganglionnaires sympathiques libèrent plutôt de la norépinéphrine. Les fibres nerveuses qui libèrent soit de l'acétylcholine ou de la norépinéphrine sont appelées fibres cholinergiques ou adrénergiques, respectivement, selon la terminologie proposée par Dale (Dale, 1934).



Système nerveux parasympathique
 origine des nerfs crâniens III, VII, IX, X
 et des nerfs sacrés 2 et 3

- A Ganglion ciliaire
- B Ganglion sphéno-palatine
- C Ganglion submandibulaire
- D Ganglion otique
- E Cellules ganglionnaires vagues dans la paroi du coeur
- F Cellules ganglionnaires vagues dans la paroi de l'intestin
- G Ganglions pelviens

Système nerveux sympathique
 origine de T1 à L2

Fibres pré-ganglionnaires
 Fibres post-ganglionnaires ———

- H Ganglion cervical supérieur
- J Ganglions cervicaux moyen et inférieur (stellaire) incluant le ganglion T1
- K Ganglion coeliaque et autres ganglions abdominaux
- L Ganglions mésentériques

Figure 1. Organisation anatomique du système nerveux autonome. Les ganglions sympathiques sont distribués de part et d'autre de la colonne vertébrale, formant ainsi deux chaînes. À partir de ces ganglions sympathiques, des fibres post-ganglionnaires gagnent les nerfs sympathiques qui innervent la plupart des organes. La plupart des ganglions parasympathiques sont situés dans ou sur l'organe cible. *Adapté de Lefkowitz et al. (1998).*

C. La transmission neurohumorale dans le système nerveux autonome

Lorsqu'un neurone reçoit un stimulus, il se produit un potentiel d'action qui se propage sous forme d'influx électrique tout au long de l'axone. L'arrivée de cette impulsion nerveuse au niveau de la terminaison axonale (site présynaptique) déclenche la libération de différentes substances chimiques spécifiques. La transmission de cette substance chimique induit alors une réponse de la part soit des muscles lisses, cardiaques et squelettiques, des glandes exocrines et des neurones post-synaptiques. Ce concept de neurotransmission chimique, ou neurohumorale, est à la base même du fonctionnement du système nerveux .

La première évidence expérimentale démontrant que les neurones libèrent une substance chimique spécifique afin de produire leurs effets sur les cellules cibles est attribuable à Otto Loewi (Loewi, 1922). Au cours de son expérience simple et bien connue qu'il effectua sur un cœur de grenouille isolé et perfusé (donneur), Loewi permit à l'effluent du cœur donneur dont il stimula le nerf vague, d'entrer en contact avec un second cœur de grenouille (receveur). Il observa que la fréquence cardiaque du cœur receveur ralentissait de façon similaire au cœur donneur. Pareillement, Loewi stimula les fibres sympathiques du nerf vague (le nerf vague étant un nerf mixte) du cœur donneur et rapporta une accélération du cœur receveur. Ces expériences suggéraient l'existence d'une substance chimique spécifique qui était libérée par le cœur donneur durant la stimulation nerveuse pour ensuite produire des effets physiologiques semblables à ceux produit par une stimulation nerveuse au niveau du cœur receveur. Loewi désigna le médiateur responsable des effets vagues « *Vagusreizstoff* » (substance vagale), celui des effets sympathiques « *Acceleransreizstoff* » (substance accélératrice), qu'il identifia par la suite comme

étant l'acétylcholine (Loewi & Navratil, 1926) et l'épinéphrine (Loewi, 1936), respectivement. Il est intéressant de noter que Loewi fut particulièrement chanceux concernant cette dernière découverte: la grenouille est l'une des rares espèces dont le principal neurotransmetteur sympathique est l'épinéphrine, et non la norépinéphrine (Holzbauer & Sharman, 1972). Ainsi, l'hypothèse de Loewi ne fit pas l'unanimité sur l'aspect sympathomimétique (i.e. substance reproduisant les effets d'une stimulation nerveuse sympathique) de l'épinéphrine. En effet, dès 1910, Barger et Dale décrivaient que les effets sympathomimétiques étaient plus fidèlement reproduits par l'injection d'épinéphrine déméthylée (« *N Ohne Radikal* », NOR-épinéphrine; Stolz, 1906) que par celle d'épinéphrine ou autres amines secondaires (Barger & Dale, 1910). Von Euler identifia finalement la norépinéphrine, le précurseur de l'épinéphrine, comme étant la substance sympathomimétique qui prédomine dans les nerfs sympathiques chez les mammifères (von Euler, 1946).

Il fut accepté de façon générale durant un certain nombre d'années que chaque cellule nerveuse produisait et relâchait qu'un seul type de neurotransmetteur. Par conséquent, les fibres nerveuses étaient soit du type (nor)adrénergique ou soit du type cholinergique selon la terminologie suggérée par Dale (Dale, 1934). Toutefois, les progrès dans le domaine de la neurobiologie ont mis en évidence une multiplicité de neurotransmetteurs présents dans les terminaisons nerveuses. Ainsi, il fut démontré que certains effets physiologiques ne pouvaient être complètement abolies par des antagonistes classiques des récepteurs cholinergiques et adrénergiques, fournissant des preuves de l'existence d'une co-transmission. Cette substance qui vraisemblablement était autre que l'acétylcholine ou la norépinéphrine, introduisit l'appellation de la neurotransmission non-cholinergique et non-adrénergiques, NANC (Bennett *et al.*, 1966).

Aujourd'hui, il semble maintenant de plus en plus évident que deux ou plusieurs neurotransmetteurs co-existent dans plusieurs, sinon la totalité des neurones. La notion de co-transmission implique qu'une substance doit être co-localisée et co-libérée par la même terminaison nerveuse qu'un neurotransmetteur classique et avoir une action directe sur les cellules cibles sous l'influence des récepteurs qui lui sont propres (Burnstock, 1987).

Les critères essentiels à la considération d'une substance en tant que neurotransmetteur sont: *I*) la présence de cette substance au niveau présynaptique des terminaisons nerveuses; *II*) la substance peut être relâchée des terminaisons nerveuses en réponse à un stimuli dépolarisant via un mécanisme d'exocytose dépendant du Ca^{2+} ; *III*) l'administration exogène de la substance doit reproduire des effets similaires à ceux observés suite à une stimulation nerveuse dans un organe ciblé; *IV*) la présence d'enzymes spécialisées ou d'un mécanisme de recaptage inactivant le transmetteur suivant sa libération; *V*) la démonstration que les effets produits par l'administration exogène de la substance et ceux produits par une stimulation nerveuse peuvent être bloqués par des antagonistes appropriés (Burnstock *et al.*, 1979). Selon ces critères, il a été démontré que certains peptides tels la substance P, le neuropeptide tyrosine (NPY), le *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), le *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP), le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) ainsi que d'autres molécules plus petites, telles l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) et le monoxyde d'azote (NO), agissaient en tant que neurotransmetteurs dans le système nerveux autonome. Bien que plusieurs des neurotransmetteurs énumérés précédemment sont présents dans les mêmes neurones que ceux contenant les neurotransmetteurs classiques (i.e. acétylcholine et norépinéphrine), l'identité de certains neuropeptides à titre de neurotransmetteur « authentique » a fait l'objet de beaucoup de scepticisme. Dans plusieurs cas,

leurs effets biologiques sont moins bien définis ou plus lents à se manifester que ceux produits lors d'une stimulation nerveuse. Il fut suggéré que ces neuropeptides étaient plutôt des neuromodulateurs, pouvant modifier l'efficacité d'un neurotransmetteur classique (Calne, 1979). Sur le plan structural, les neurotransmetteurs classiques et les neuropeptides sont emmagasinés dans des sites différents. Par exemple, les neurotransmetteurs classiques sont confinés exclusivement dans de petites vésicules synaptiques ayant un diamètre de ~50 nm alors que les neuropeptides sont localisés dans des vésicules plus larges (~ 100 nm de diamètre) pouvant contenir aussi les neurotransmetteurs classiques (Fried et al., 1985; Lundberg et al., 1981; Matteoli et al., 1988). Bien que le contenu des petites et larges vésicules de sécrétion soit relâché par un processus appelé « exocytose » que nous aborderons plus en détails ultérieurement, les conditions pour l'exocytose diffèrent entre les deux types de vésicules (Fillenz et Howe, 1975; Thureson-Klein, 1983). À cet effet, les vésicules de large diamètre sont mobilisées de façon préférentielle par de hautes fréquences de stimulation (Fried *et al.*, 1985). Ce principe de libération en fonction de la fréquence est important car il peut être prédit qu'au cours d'une activité nerveuse normale ou basale, aucune libération de neuropeptides se produira. Notons également que les neuropeptides ne possèdent pas de mécanisme de recapture à haute affinité à l'instar des neuromédiateurs classiques. Les neuropeptides sont plutôt éliminés soit par simple diffusion hors de l'espace synaptique ou bien dégradés par des enzymes non-spécifiques (endopeptidases). La dégradation plus ou moins lente des neuropeptides signifie que ceux-ci peuvent persister dans le milieu extracellulaire et agir sur des périodes plus longues (variables de quelques secondes à quelques minutes). On dénote plusieurs cas expérimentaux illustrant les interactions entre les neurotransmetteurs classiques et les neuropeptides co-existant dans un même neurone. Au niveau de la glande salivaire du chat par exemple, il fut démontré par

Lundberg *et al.* (1982) que l'acétylcholine et le VIP étaient relâchés selon un profil fréquence-dépendant. Tandis que l'acétylcholine provoque la sécrétion, le VIP de son côté produit une vasodilatation et par conséquent, facilite la sécrétion. De plus, le VIP agirait aussi sur les fonctions sécrétrices en augmentant l'affinité du récepteur muscarinic envers l'acétylcholine (Lundberg *et al.*, 1982). Dans un autre contexte, le NPY co-existant dans certaines fibres sympathiques vasculaires aurait pour fonction de conserver la noradrénaline durant des périodes d'activités nerveuse sympathique intenses et prolongées. Il fut montré que le NPY inhibait la libération de la noradrénaline via l'activation de récepteurs présynaptiques spécifiques au NPY tout en renforçant la réponse physiologique engendrée par la noradrénaline via la stimulation de récepteurs aux NPY postsynaptiques (Allen *et al.*, 1982; Lundberg *et al.*, 1982). Le principe qui émerge de ces deux exemples est que les neuropeptides exercent leurs effets surtout lors de périodes de stress intenses où le système nerveux est fortement activé afin de soutenir la réponse physiologique et d'éviter la déplétion des réserves de neurotransmetteurs classiques. L'action modulatrice des neuropeptides peut se situer au niveau présynaptique où ils modifient la synthèse, la libération, la recapture ou le métabolisme d'un autre neurotransmetteur mais aussi au niveau postsynaptique, amplifiant ou diminuant l'efficacité des neurotransmetteurs.

D. La transmission cholinergique

1. Biosynthèse, emmagasinage, libération et dégradation de l'acétylcholine

L'acétylcholine est synthétisée au niveau des terminaisons nerveuses cholinergiques (Fig. 2, page 13). La choline acétyltransférase (ChAT) catalyse l'acétylation de la choline par l'acétyl coenzyme A (AcCoA) pour former l'acétylcholine (Parsons *et al.*, 1993). La localisation

immunocytochimique de la choline acétyltransférase est utilisée dans l'identification des axones cholinergiques et les corps cellulaires des nerfs.

Suite à sa synthèse, l'acétylcholine est transportée puis emmagasinée dans des vésicules synaptiques. Une dépolarisation de la terminaison nerveuse déclenche un influx massif de Ca^{2+} dans le cytoplasme de l'axone, facilitant d'une certaine façon la fusion des vésicules avec la membrane plasmique de l'axone. L'acétylcholine ainsi que tout le contenu des vésicules est ainsi relâché dans la fente synaptique lors de l'exocytose. Fait intéressant, les ionophores du Ca^{2+} , qui permettent l'entrée de Ca^{2+} au niveau des terminaisons nerveuses, provoquent également la libération de l'acétylcholine (Lefkowitz *et al.*, 1998). L'acétylcholine diffuse ensuite dans la fente synaptique pour se lier à des récepteurs nicotiniques ou muscariniques situés au niveau de la membrane postsynaptique.

Suivant sa libération des terminaisons nerveuses, l'acétylcholine est presque immédiatement retirée de l'espace synaptique par l'acétylcholinesthérase (AChE). Cette enzyme, qui est présente en forte concentration dans la synapse, hydrolyse l'acétylcholine en choline et en acide acétique. Le temps requis à l'hydrolyse de l'acétylcholine est inférieur à une milliseconde. La plus grande partie de la choline ainsi formée est recaptée au niveau des terminaisons nerveuses cholinergiques par un système de transport dépendant du Na^+ , où elle servira à nouveau dans la synthèse de l'acétylcholine. Le captage de la choline par ce système représente l'étape limitante de la synthèse de l'acétylcholine (Lefkowitz *et al.*, 1998).

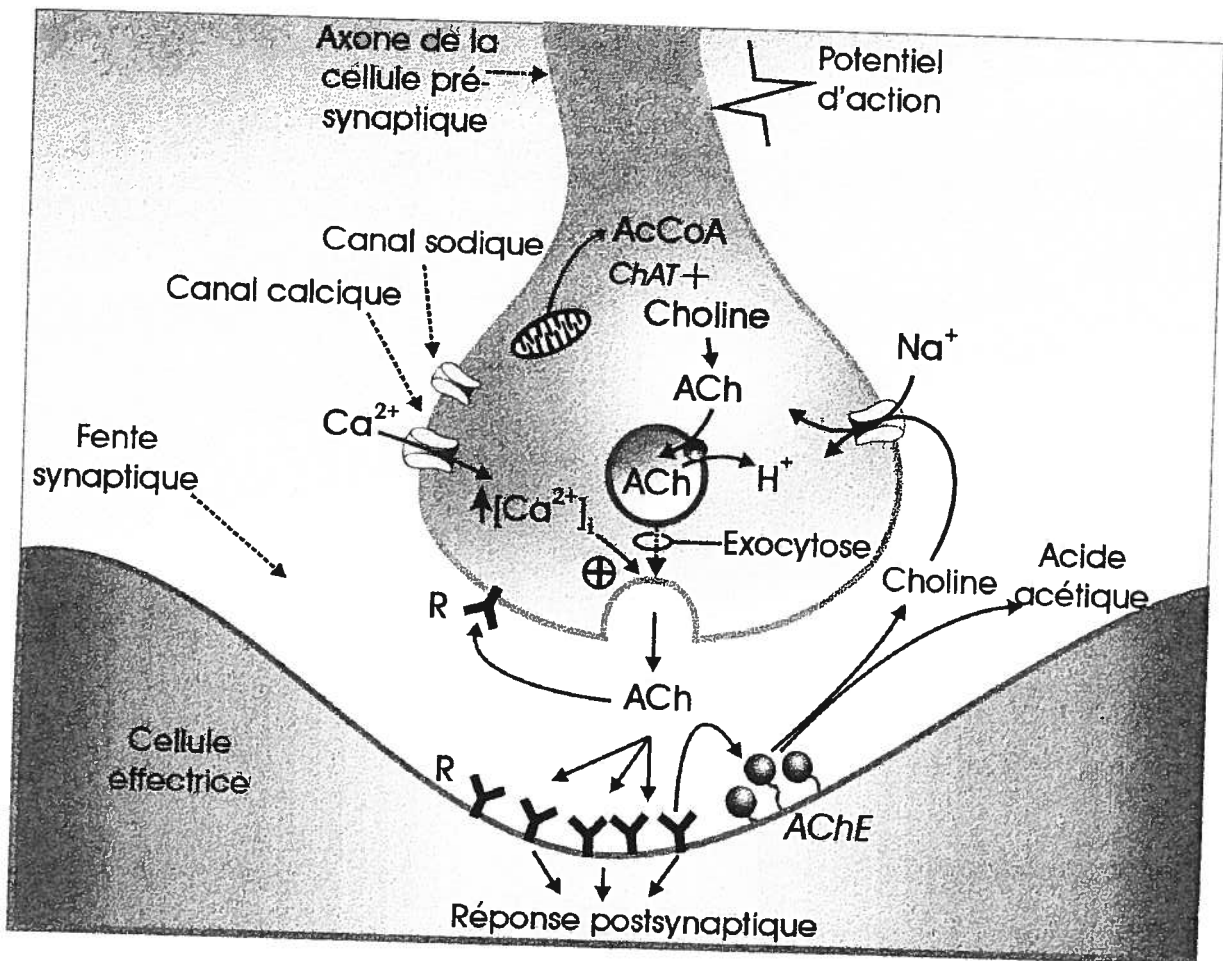


Figure 2. Représentation schématique de la synthèse de l'acétylcholine dans les terminaisons nerveuses cholinergiques et de son métabolisme dans la fente synaptique. L'enzyme choline acétyl transférase (ChAT) catalyse l'acétylation de la choline par l'acétyl coenzyme A (AcCoA) pour former l'acétylcholine (ACh). L'ACh est ensuite emmagasinée à l'intérieur de vésicules de sécrétion. Suite à une stimulation nerveuse, un potentiel d'action se propage le long de l'axone. La dépolarisation de la terminaison de l'axone suivant l'arrivée du potentiel d'action provoque un influx de calcium (Ca^{2+}). L'augmentation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) déclenche la fusion des vésicules par exocytose avec la membrane plasmique et la libération de l'ACh. L'ACh diffuse dans la fente synaptique pour se lier aux récepteurs de l'ACh (R) situés au niveau pré- et postsynaptique. Selon le type de récepteurs présynaptiques stimulés par l'ACh, l'activation de ceux-ci peut soit faciliter ou inhiber la libération de l'ACh. Au niveau postsynaptique, la stimulation des récepteurs produit une réponse effectrice. L'ACh est éliminée de la fente synaptique suite à son hydrolyse par l'acétylcholinestérase (AChE) en choline et en acide acétique. La choline est recaptée dans la terminaison nerveuse par un système de transport dépendant du sodium (Na^+), où elle est recyclée en ACh. D'après Lefkowitz et al. (1998).

2. Les récepteurs de l'acétylcholine

L'acétylcholine produit ses effets physiologiques via deux types distincts de récepteurs nommés d'après les substances exogènes qui, en se liant à eux, reproduisent les effets de l'acétylcholine. Le premier groupe de récepteurs possède une affinité envers de faibles doses de nicotine, un alcaloïde extrait des feuilles du tabac *Nicotiana tabacum*, et se nomme récepteurs nicotiniques. La muscarine, une toxine extraite du champignon *Amanita muscaria*, active un autre groupe de récepteurs, les récepteurs muscariniques.

a) Les récepteurs nicotiniques

Les récepteurs nicotiniques sont des canaux ioniques dont l'ouverture est contrôlée par l'acétylcholine (Fig. 3, page 15). Ils sont divisés en deux sous-types, le type musculaire (N_M) que l'on retrouve au niveau de la jonction neuromusculaire, et le type neuronal (N_N), présent dans le système nerveux central, les ganglions autonomes et la médullosurrénale (Sargent, 1993). Les deux sous-types de récepteurs sont constitués d'un pentamère qui à son tour est composé de quatre sous-unités distinctes (α , β , γ , δ) (Taylor, 1998). Ces sous-unités sont disposées de façon à former un pore central qui traverse la membrane cellulaire (Unwin, 1993). Les deux sous-types de récepteurs nicotiniques sont caractérisés en fonction des sous-unités distinctes qui les composent. Ainsi, le récepteur N_M est généralement composé de la séquence $\alpha_2\beta\gamma\delta$, alors que le récepteur N_N est composé seulement des sous-unités α et β (Karlin, 1993). Le site de liaison à l'acétylcholine serait situé au niveau des sous-unités α , présentes au moins en double (Unwin, 1993). Lorsque deux molécules d'acétylcholine se lient au récepteur nicotinique, le pore central

subit alors un changement de conformation, ce qui permet une entrée massive d'ions Na^+ du milieu externe vers le cytosol. Au niveau des ganglions autonomes, cette action donne naissance alors à un potentiel d'action qui se propage dans le neurone post-synaptique. Les ganglioplégiques tels l'hexaméthonium et la mécamylamine, antagonisent les récepteurs N_N et diminuent ainsi la transmission ganglionnaire, alors que les gangliomimétiques tels que l'iodure de 1,1-diméthyl-4-phénylpipérazinium (DMPP) et la nicotine, stimulent la transmission ganglionnaire en mimant l'action de l'acétylcholine au niveau des récepteurs N_N .

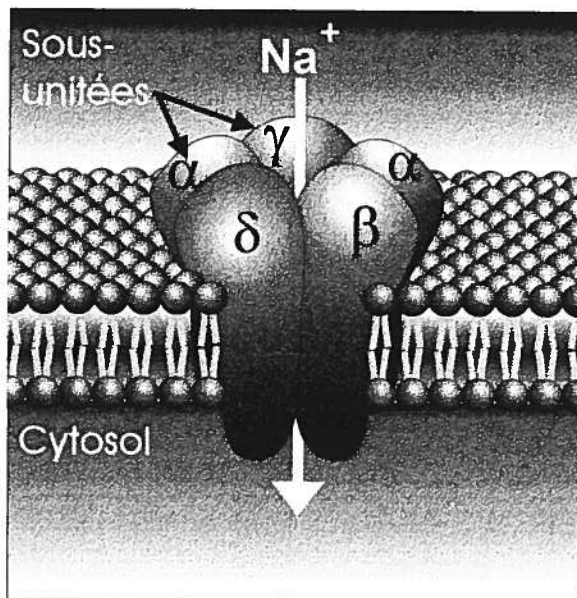
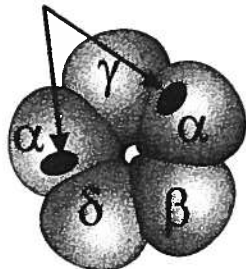


Figure 3. Structure moléculaire du récepteur cholinergique nicotinique. Cinq sous-unités sont disposées de façon à former un pore central qui traverse la membrane cellulaire. La liaison de l'acétylcholine aux sites de liaisons extra-cellulaires provoque un changement de conformation du pore central. Celle-ci se traduit en l'augmentation du diamètre de la lumière du pore central, suffisante pour permettre au sodium (Na^+) de passer du milieu extracellulaire vers le cytosol. *D'après Lefkowitz et al. (1998).*

Sites de liaison de l'acétylcholine



b) Les récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques appartiennent à une superfamille de récepteurs caractérisés par une seule protéine qui traverse sept fois la membrane et qui est couplée à une protéine régulatrice se liant à la guanosine triphosphate (protéine G). On retrouve quatre sous-types de récepteurs muscariniques caractérisés selon une classification pharmacologique (M_1 à M_4). Toutefois, des techniques de clonage (identification de l'ADN complémentaire codant pour chaque sous-type) ont mis en évidence cinq sous-types de récepteurs muscariniques (m_1 - m_5), nommés selon l'ordre de leurs découvertes (Caulfield, 1993). Les trois premiers récepteurs mis en évidence par biologie moléculaire semblent correspondre aux mêmes sous-types pharmacologiques M_1 à M_3 identifiés grâce à de nouveaux ligands hautement sélectifs. La distribution des récepteurs muscariniques est vaste dans l'organisme. Au niveau périphérique, les récepteurs M_1 et M_3 sont présents dans les ganglions et dans différentes glandes sécrétrices (notamment la médullosurrénale), M_2 dans le myocarde et certaines terminaisons nerveuses, M_2 et M_3 dans les muscles lisses, et M_4 localisés dans les poumons (Caulfield, 1993). Seul le récepteur muscarinique m_5 serait absent en périphérie (Levey, 1993), alors que les cinq sous-types ont été identifiés au niveau du système nerveux central (Tableau I, page 20).

Les conséquences physiologiques de l'activation des récepteurs muscariniques dépendent non-seulement du sous-type activé, mais aussi du type de protéine G et autres protéines effectrices couplées à ce récepteur. Ainsi, les sous-types M_1 , M_3 , et M_5 (Fig. 4, page 18) activent une protéine G, appelée $G_{q/11}$, qui stimule l'activité de la phospholipase C bêta ($PLC\beta$); le résultat immédiat est la formation des seconds messagers inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) et

diacylglycérol (DAG) à partir de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, un phospholipide membranaire. L'IP₃ provoque à son tour la libération de Ca²⁺ intracellulaire à partir des réserves contenues dans le réticulum endoplasmique. Le DAG, d'autre part, active la protéine-kinase C, laquelle phosphoryle divers substrats qui interviennent dans la modulation de la réponse fonctionnelle (Nishizuka, 1992; Tanaka & Nishizuka, 1994). Ces récepteurs interviennent ainsi dans des effets dépendants du Ca²⁺ tels que la contraction du muscle lisse et la sécrétion. Par exemple, l'activation du récepteur M₁ situé dans les ganglions autonomes facilite la transmission ganglionnaire suite à une stimulation nicotinique et cette facilitation peut être antagonisée par la pirenzepine, un antagoniste M₁. Le récepteur M₃ est impliqué dans (a) la contraction du muscle lisse dans le système respiratoire, gastro-intestinal et urogénital, (b) la stimulation des sécrétions exocrines de certaines glandes telles les glandes salivaires et dans (c) la stimulation de la production de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (*endothelium-derived relaxant factor, EDRF*), maintenant identifié comme étant le monoxyde d'azote (NO) (Palmer *et al.*, 1987; Goyal, 1989; Duckles & Garcia-Villalon, 1990;).

En revanche, les récepteurs muscariniques M₂ et M₄ interagissent avec une autre classe de protéine G appelées G_i et G_o, sensibles à la toxine pertussis produite par la bactérie *Bordetella pertussis* responsable de la coqueluche, avec comme résultat l'inhibition de l'adénylcyclase, l'activation des canaux-récepteurs au K⁺ et la suppression de l'activité des canaux calciques sensibles au voltage (Felder, 1995) (Fig. 5, page 19). Ainsi, l'activation des récepteurs muscariniques M₂ et M₄ engendre une hyperpolarisation de la membrane cellulaire, produisant par exemple une diminution de la fréquence cardiaque au niveau du myocarde ou un effet inhibiteur sur la neurotransmission dans certains neurones. De façon plus spécifique, les

récepteurs M_2 seraient situés au niveau pré-jonctionnel dans les neurones cholinergiques et adrénergiques. Par exemple, l'activation du récepteur M_2 procure un effet de rétroaction négative sur la libération de l'acétylcholine dans les neurones cholinergiques. Ainsi, un antagoniste M_2 tel la gallamine, amplifie la libération de l'acétylcholine suite à une stimulation nerveuse (Fryer & MacLagan, 1984).

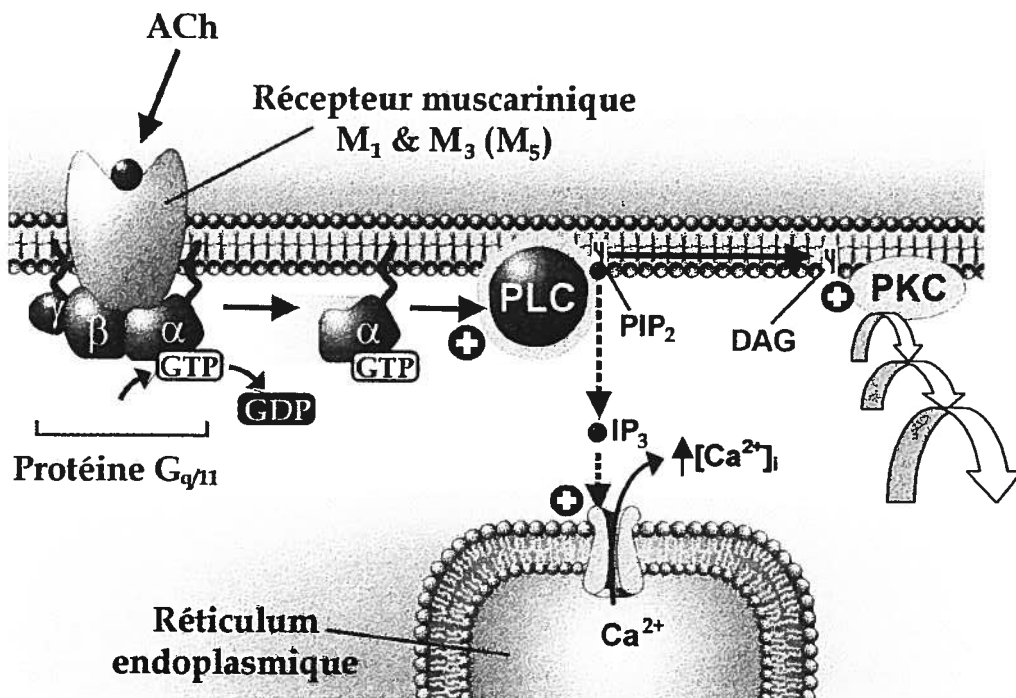


Figure 4. Mécanismes intracellulaires des récepteurs muscariniques M_1 et M_3 (et probablement M_5). L'occupation du récepteur par l'acétylcholine (ACh) permet la liaison du GTP à la sous-unité α de la protéine $G_{q/11}$ qui lui est associée. La liaison du GTP active la sous-unité α de la protéine $G_{q/11}$ qui se dissocie alors du dimère $\beta\gamma$ et va activer la phospholipase C bêta (PLC- β). La PLC- β hydrolyse un lipide membranaire, le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂), générant les seconds messagers inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). L'IP₃ provoque la libération du Ca²⁺ contenu dans le réticulum endoplasmique. De son côté, le DAG active la protéine-kinase C (PKC), laquelle active par phosphorylation diverses enzymes situées en aval. L'augmentation des concentrations de Ca²⁺ intracellulaire ([Ca²⁺]_i) peut contribuer à la régulation de l'activité de la PKC. D'après Lefkowitz et al. (1998).

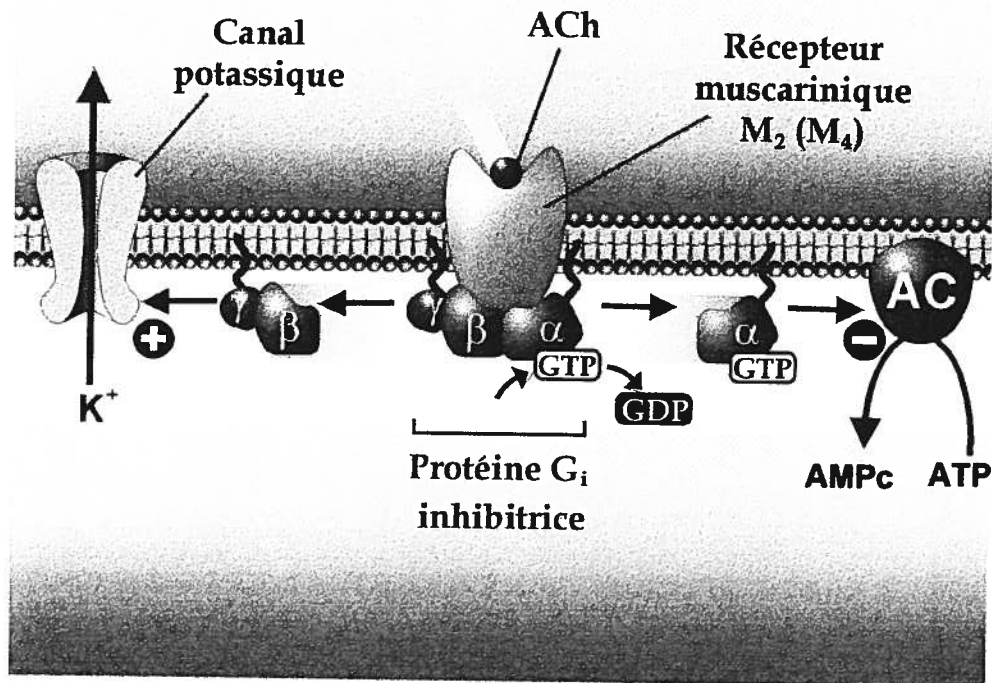


Figure 5. Mécanismes intracellulaires des récepteurs muscariniques M₂ (et probablement M₄). L'occupation du récepteur par l'acétylcholine (ACh) permet la liaison du GTP à la sous-unité α de la protéine G_i qui lui est associée. La liaison du GTP active la sous-unité α de la protéine G_i qui se dissocie alors du dimère $\beta\gamma$ et va inhiber l'adényl cyclase (AC), supprimant la formation d'AMP cyclique (AMPc). Conjointement, les sous-unités $\beta\gamma$ activent les canaux-récepteurs au potassium (K⁺) et suppriment du même coup l'activité des canaux calciques sensibles au voltage (non montrés). D'après Lefkowitz et al. (1998).

Tableau I. Principales caractéristiques des sous-types de récepteurs cholinergiques.

Réc	Agonistes	Antagonistes	Tissu	Réponses	Mécanismes moléculaires
N _M	Phényltriméthylammonium (PTMA)	Tubocurarine α-Bungarotoxines	Jonction neuro-musculaire	Dépolarisation de la plaque motrice Contraction du muscle squelettique	↑ canal Na ⁺ du récepteur N _M
N _N	Diméthylphénylpipérazinium (DMPP)	Hexamethonium Mécamylamine Triméthaphan	Ganglions autonomes	Dépolarisation et activation des fibres post-ganglionnaires	↑ canal Na ⁺ du récepteur N _N
			Médullosurrénale	Dépolarisation des cell. chromaffines et sécrétion des CA	
			SNC	Non défini	
M ₁	McN-A 343 Oxotrémorine	Pirenzépine Atropine	Ganglions autonomes	Dépolarisation (PPSE tardif)	↑ phospholipase C (↑ IP ₃ /DAG; ↑ [Ca ²⁺] _i)
			SNC	Non défini	
M ₂	–	AF-DX 116 Atropine	Cœur -Nœud SA -Oreillette -Nœud AV -Ventricule	Dépolarisation spontanée ralentie; hyperpolarisation ↓ durée du potentiel d'action; ↓ force contractile ↓ vitesse de conduction ~ ↓ force contractile	↑ canaux K ⁺ ↓ adénylcyclase
M ₃	–	Hexahydro-siladifénidol	Muscle lisse	Contraction	Similaire à M ₂
			Glandes sécrétrices	↑ sécrétion	
M ₄	–	Himbacine	–	–	Similaire à M ₂
M ₅	–	–	–	–	Similaire à M ₁

SNC: système nerveux centrale; CA: catécholamines; IP₃: inositol-1,4,5-triphosphate; DAG: diacylglycérol; [Ca²⁺]_i: concentration du Ca²⁺ intracellulaire; PPSE: potentiel post-synaptique d'excitation; ↑ : stimulation; ↓ : inhibition. *Adapté de Lefkowitz et al. (1998).*

E. La transmission adrénergique

Abel et Crawford furent les premiers à identifier l'épinéphrine, à partir d'extraits de glande surrénale, comme étant la substance produisant les effets marqués sur le système cardiovasculaire (Abel & Crawford, 1897). Presque simultanément, Takamine isola aussi l'épinéphrine de la glande surrénale (Takamine, 1901). La littérature médicale américaine utilise depuis l'appellation utilisée par Abel: épinéphrine et norépinéphrine; alors que la littérature médicale britannique utilise le terme utilisé par Takamine: adrénaline et noradrénaline. Ainsi, le terme « adrénergique » proposé par Dale en 1934 pour identifier les fibres post-ganglionnaires sympathiques, origine de la croyance de l'époque qui identifiait l'adrénaline (i.e. l'épinéphrine) comme étant le neurotransmetteur prédominant dans ces fibres nerveuses. De nos jours, ce terme englobe plutôt la transmission nerveuse soutenue par les diverses catécholamines endogènes en périphérie, soit la norépinéphrine, l'épinéphrine et la dopamine.

Une « catécholamine » se définit par un noyau catéchol (i.e. un cycle aromatique benzène possédant deux groupes hydroxyles adjacents) et une courte chaîne hydrocarbonée se terminant par un groupe amine. La norépinéphrine est le neurotransmetteur des fibres post-ganglionnaires sympathiques et de certains neurones du système nerveux central; l'épinéphrine est la principale hormone sécrétée dans la circulation systémique par les médullosurrénales; la dopamine est la catécholamine natriurétique, agissant localement au niveau des reins mais aussi au niveau central en tant que neurotransmetteur.

1. Biosynthèse des catécholamines

En 1939, Blaschko proposa que l'épinéphrine endogène était synthétisée dans un processus comportant quatre étapes, chaque étape étant catalysée par une enzyme différente (Blaschko, 1939). La biosynthèse des catécholamines, illustrée sur la Figure 6 (page 25), débute par l'incorporation de la tyrosine dans le cytoplasme des terminaisons nerveuses sympathiques, cellules chromaffines de la médullosurrénale, et certains centres spécifiques au niveau du cerveau (Nagatsu *et al.*, 1964). Dans des conditions normales, l'acide aminé tyrosine se retrouve en quantité abondante dans la circulation. Elle est soit dérivée de sources alimentaires ou synthétisée au niveau du foie suite à l'hydroxylation de la phénylalanine (Wurtman *et al.* 1981).

La tyrosine hydroxylase

La tyrosine hydroxylase catalyse la conversion de la tyrosine en dihydroxyphénylalanine (DOPA). L'hydroxylation de la tyrosine est considérée comme étant l'étape enzymatique limitante de la biosynthèse des catécholamines (Nagatsu *et al.* 1964). Étant donné le rôle important de la tyrosine hydroxylase dans la biosynthèse des catécholamines, son activation est sujette à de multiples mécanismes de contrôle qui permettent de maintenir un niveau constant de catécholamines. Les composés catéchols (i.e. la DOPA, la dopamine, la norépinéphrine et l'épinéphrine) exercent un effet inhibiteur sur l'activité de la tyrosine hydroxylase par un mécanisme de rétro-inhibition (Nagatsu *et al.*, 1964). Inversement, l'exposition à des situations de stress activant le système nerveux sympathique augmente la synthèse et les concentrations de tyrosine hydroxylase dans les ganglions sympathiques et les médullosurrénales (Thoenen, 1970; Sabban *et al.*, 1992).

L'activation de la tyrosine hydroxylase se produit via une phosphorylation catalysée par une protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique, la protéine-kinase A (Joh *et al.* 1978). Une altération dans les charges au niveau du site catalytique et de la sous-unité régulatrice produirait un changement structural de l'enzyme, ce qui augmenterait l'affinité de celle-ci envers la tyrosine et la tétrahydrobioptérine (un cofacteur essentiel), mais diminuerait aussi l'effet rétro-inhibiteur en réduisant l'affinité de la tyrosine hydroxylase envers les catéchols (Lovenberg *et al.*, 1982). On estime à six le nombre de protéines-kinases différentes pouvant phosphoryler la tyrosine hydroxylase *in vitro*: la protéine-kinase A; la protéine-kinase sensible au complexe calcium-calmoduline; la protéine-kinase C; la protéine-kinase G; la protéine-kinase N (présente dans les cellules de phéochromocytomes; PC12); et la tyrosine hydroxylase kinase (Porter *et al.*, 1992). Ainsi, ces mécanismes représentent une réponse immédiate dans la synthèse des catécholamines suite à une stimulation nerveuse. Des mécanismes agissant à plus long terme existent également. Ceux-ci sont encore peu compris, agissant probablement au niveau de l'expression génique de la tyrosine hydroxylase après une stimulation nerveuse.

La décarboxylase des acides L-aminés aromatiques

La décarboxylase des acides L-aminés aromatiques, aussi appelée DOPA décarboxylase, catalyse la conversion rapide de la DOPA en dopamine au niveau du cytoplasme neuronal. Elle est largement distribuée dans divers tissus, notamment dans les reins, l'intestin, le foie et le cerveau. Son activité enzymatique dépend du cofacteur phosphate de pyridoxine.

La dopamine β -hydroxylase

La dopamine formée à l'étape précédente est transportée de façon active dans des vésicules de stockage pour y être convertie en norépinéphrine par l'enzyme dopamine β -hydroxylase. À l'instar de la tyrosine hydroxylase, la dopamine β -hydroxylase est localisée dans les tissus synthétisant les catécholamines, tels les fibres sympathiques post-ganglionnaires et les cellules chromaffines de la médullosurrénale. Toutefois, contrairement à la tyrosine hydroxylase qui est présente dans le cytoplasme, la dopamine β -hydroxylase est confinée dans les vésicules de stockage. En plus de la norépinéphrine, ces vésicules contiennent également de l'ATP, de l'acide ascorbique, certaines protéines spécifiques telles les chromogranines, et certains neuropeptides, notamment le NPY. L'acide ascorbique est essentielle à l'activité de la dopamine β -hydroxylase en lui fournissant les électrons nécessaires à la réaction d'hydroxylation. Cette réaction est associée à la formation d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$), lesquelles peuvent contribuer à l'induction d'un stress oxydatif (Nedeljkovic *et al.*, 2003).

La phényléthanolamine-N-méthyltransférase

Dans certaines cellules chromaffines de la médullosurrénale, la norépinéphrine, ayant été synthétisée dans les vésicules, quitte ces structures par diffusion pour rejoindre le cytoplasme. L'enzyme cytosolique phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT) catalyse ensuite la conversion de la norépinéphrine par la N-méthylation pour former l'épinéphrine (Axelrod, 1966). Enfin, l'épinéphrine retourne à nouveau dans les vésicules où elle y sera entreposée jusqu'à sa libération. Cette étape finale ne se produit que dans la médullosurrénale et le cerveau étant donné l'absence de la PNMT dans les varicosités sympathiques.

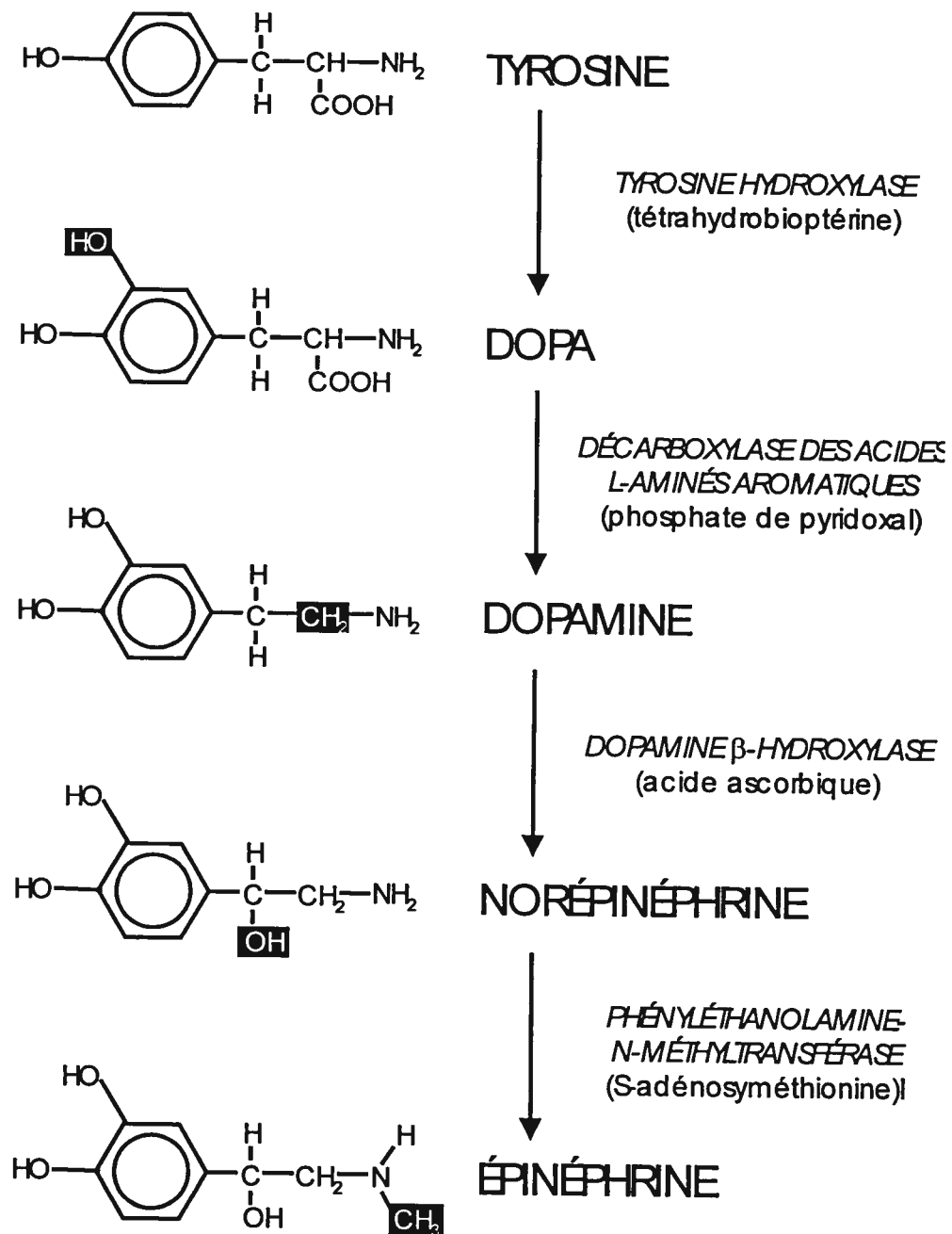


Figure 6. Diagramme illustrant les étapes enzymatiques de la biosynthèse des catécholamines. Les enzymes impliquées sont représentées en caractères italiques, les cofacteurs essentiels entre parenthèses. L'étape finale se produit uniquement dans les médullosurrénales et dans certains neurones du tronc cérébral. *D'après Lefkowitz et al. (1998).*

2. Emmagasinage des catécholamines

Afin d'assurer une libération contrôlée et aussi de limiter la dégradation intraneuronale, les catécholamines contenues dans les terminaisons nerveuses sympathiques et dans les cellules chromaffines des médullosurrénales sont emmagasinées à des concentrations très élevées (environ 600 mM pour les cellules chromaffines) dans des vésicules de stockage, dont le diamètre varie entre 50 et 350 nm (Landsberg & Young, 1992). Le transport des catécholamines à l'intérieur de ces vésicules s'effectue via l'action des transporteurs des monoamines, situés au niveau de la membrane vésiculaire. Selon le modèle proposé par Philippu et Matthaei (1988), une translocase à protons, dépendante de l'ATP, contribue à maintenir un gradient électrochimique (l'intérieur de la vésicule étant chargé positivement), ainsi qu'un pH vésiculaire acide par rapport au cytosol. Les catécholamines, complexées avec un transporteur de monoamines, traversent la membrane vésiculaire où elles y seront emprisonnées sous forme protonisée, prévenant ainsi une re-diffusion de celles-ci vers le cytosol. La dissociation de l'ion hydrogène du transporteur des monoamines permet à celui-ci de se lier à une autre molécule de catécholamine. La réserpine, un médicament utilisé pour traiter l'hypertension, inhibe le transporteur des monoamines vésiculaire, provoquant une déplétion en catécholamines au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques et cérébrales.

3. Libération des catécholamines

Les cellules chromaffines isolées ou en culture, étant un modèle expérimental plus facile à étudier que les nerfs sympathiques, ont contribué à la majorité des études sur les mécanismes de libération des catécholamines. Comme les récepteurs nicotiques N_N sont impliqués dans la neurotransmission ganglionnaire, les chercheurs ont supposé que les résultats obtenus avec des préparations de cellules chromaffines, où les récepteurs N_N sont aussi présent, s'appliquaient probablement aux terminaisons nerveuses sympathiques post-ganglionnaires. Au niveau de la médullosurrénale, la libération de l'acétylcholine par les fibres splanchniques pré-ganglionnaires et son action sur les récepteurs nicotiques N_N induit une dépolarisation de la cellule chromaffine en augmentant la perméabilité au Na^+ . L'augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ augmente directement ou indirectement l'influx de Ca^{2+} via l'ouverture des canaux calciques sensibles au voltage, possiblement de type L. Par contre, ce sont plutôt les canaux calcique de type N qui seraient responsables de l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses sympathiques post-ganglionnaires (Hirning *et al.*, 1988). L'augmentation des concentrations de Ca^{2+} cytoplasmique déclenche une cascade d'événements biochimiques menant à la translocation des vésicules de sécrétions ainsi qu'à leur fusion avec la membrane cytoplasmique et finalement l'expulsion du contenu dans l'espace extracellulaire. Tel que prédit par ce modèle, toute manipulation expérimentale dépolarisant la cellule chromaffine, comme une stimulation électrique ou une augmentation des concentrations extracellulaires de K^+ , activera aussi les canaux calciques sensibles au voltage et provoquera une exocytose. La libération simultanée des catécholamines et des divers constituants solubles des vésicules de stockage (ATP, chromogranines, enképhalines, et DBH) au court de l'activation cellulaire sans toutefois provoquer une libération similaire des enzymes cytoplasmiques, ont fourni des

évidences biochimiques renforçant la théorie de l'exocytose pour expliquer la sécrétion des catécholamines (Slotkin & Kirshner, 1971; Smith 1973).

L'exocytose contrôlée

Les cellules eukaryotes sécrètent diverses substances, habituellement de façon simultanée, dans l'espace extracellulaire grâce à un mécanisme d'exocytose constitutive (Palade, 1975). Au cours de ce processus, des vésicules membranaires sont continuellement incorporées dans la membrane plasmique de la cellule. Par contre, les cellules nerveuses et endocriniennes accomplissent une exocytose beaucoup plus spécialisée et hautement régulée survenant au cours de la libération de neurotransmetteurs ou d'hormones. La notion d'exocytose contrôlée implique que le matériel à être sécrété est accumulé de façon stable dans des vésicules de sécrétion et que la fusion de celles-ci avec la membrane plasmique de la terminaison nerveuse fait l'objet d'une régulation étroite. En effet, l'exocytose de ces vésicules de sécrétion est arrêtée à une étape tardive, générant un état partiel de fusion: l'amorçage (Gerber & Südhof, 2002). La fusion de la vésicule n'est complétée que lorsque le stimulus approprié, généralement le Ca^{2+} , est appliqué. Dans les cellules chromaffines, cette population de vésicules de sécrétion qui est ancrée à la membrane plasmique forme un réservoir dit « compétent » pour une exocytose rapide en réponse à une augmentation du Ca^{2+} (Heidelberger *et al.*, 1994). On estime cette population de vésicules compétentes à environ 200 (sur un nombre total de 10 000 par cellule) et elles seraient localisées dans une région située à moins de 50 nm de la membrane plasmique (Aunis & Langley, 1999).

L'hypothèse des « *SNAREs* » (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors*) offre un mécanisme général de la machinerie impliquée dans l'ancrage spécifique et de la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique, malgré que certains détails importants restent à être précisés, notamment par rapport aux étapes menant à la fusion avec les phospholipides membranaires et la formation d'un pore de fusion (Lledo, 1997). Selon ce modèle (Fig. 7, page 31), un complexe est formé par trois protéines SNAREs au court de l'étape d'amorçage des vésicules de sécrétion: deux originaires de la membrane plasmique, la syntaxine et la « SNAP-25 » (*Soluble NSF Attachment Protein*) et l'autre de la vésicule de sécrétion (synaptobrevine). Ce complexe forme une ancre pour une cascade d'interactions protéine-protéine requises pour l'exocytose. Lorsque ce complexe trimérique est assemblé, celui-ci agit à titre de récepteur pour les « *SNAPs* » (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Adapter Protein*; aucune relation avec la protéine synaptique SNAP-25) et la NSF (*N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion protein*). La NSF est une ATPase avec une fonction universelle dans la fusion des membranes. Les SNAPs sont des protéines solubles nécessaires au recrutement de la NSF, via un mécanisme dépendant de l'ATP, du cytosol vers la membrane plasmique. La synaptobrevine, la syntaxine et la SNAP-25 ont une très faible affinité individuelle envers les SNAPs. Seul leur assemblage en un complexe trimérique génère un site de haute affinité pour les SNAPs, lesquelles forment ensuite un site de liaison de haute affinité pour la NSF. La NSF catalyse probablement par la suite l'hydrolyse du complexe trimérique, convertissant la syntaxine, la SNAP-25 et la synaptobrevine en forme libre et permettant ainsi la réinitialisation du cycle.

La fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique en réponse à une élévation du Ca^{2+} intracellulaire est un mécanisme extrêmement rapide (environ 60 microsecondes) (Gerber & Südhof, 2002). La rapidité de la réaction d'exocytose des vésicules déclenchée par le Ca^{2+} indique que le Ca^{2+} doit agir localement au site d'exocytose en médiant un léger changement conformationnel ou un débalancement électrostatique (Gerber & Südhof, 2002). La synaptotagmine, une protéine distribuée à la surface cytoplasmique de la membrane des vésicules de stockage, semble jouer un rôle primaire dans le déclenchement de l'exocytose en agissant tel un détecteur du Ca^{2+} . En effet, la synaptotagmine possède un domaine liant les ions de Ca^{2+} et lorsque les concentrations de Ca^{2+} intracellulaire augmentent suivant un potentiel d'action, la protéine change de conformation et celle-ci se dissocie des protéines SNAREs, permettant à la SNAP-25 de s'y lier et d'initier le processus de fusion avec la membrane plasmique (Lledo, 1997).

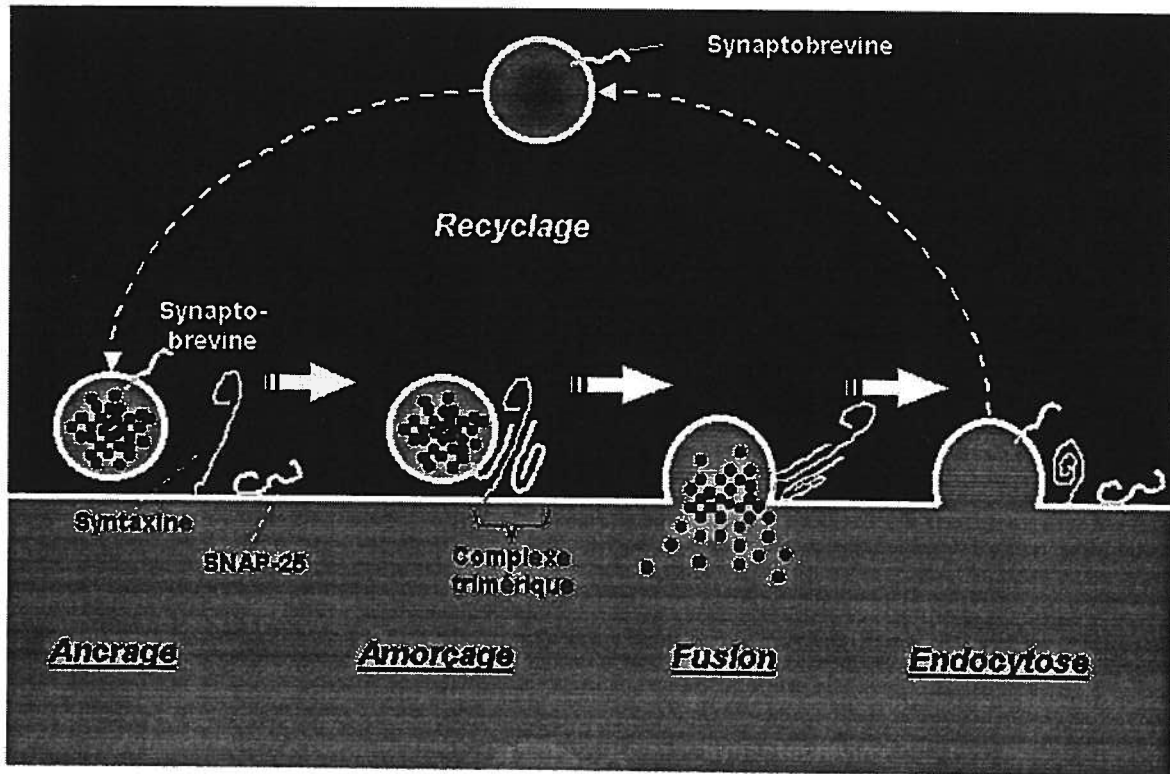


Figure 7. Rôle des protéines SNAREs dans l'exocytose. Les vésicules de sécrétions contenant les neurotransmetteurs sont ancrées à la membrane plasmique par un mécanisme inconnu (gauche), amenant la synaptobrevine en étroite proximité avec la syntaxine et la SNAP-25 sur la membrane plasmique. Selon le présent modèle, suite à l'ancrage, les vésicules de sécrétions sont préparées pour la fusion au cours d'une étape appelée *amorçage*. Durant cette étape, un complexe est formé par trois protéines SNAREs: la syntaxine et la SNAP-25 originaires de la membrane plasmique et la synaptobrevine de la vésicule de sécrétion. Lorsque ce complexe trimérique est assemblé, celui-ci agit à titre de récepteur pour les SNAPs, celles-ci permettant à leur tour le recrutement de la NSF. L'hydrolyse de l'ATP par la NSF est essentielle pour la fusion des bi-couches membranaires. La NSF catalyse conjointement l'hydrolyse du complexe trimérique, convertissant la syntaxine, la SNAP-25 et la synaptobrevine en forme libre et permettant ainsi la réinitialisation du cycle. La présence de protéines additionnelles nécessaires à la fusion complète des vésicules reste à être confirmé. *D'après Gerber & Südhof (2002).*

4. Inactivation des catécholamines

a) Voies de métabolisation des catécholamines

La monoamine-oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) sont les deux principales enzymes impliquées dans le métabolisme des catécholamines. D'autres enzymes telles l'aldéhyde réductase et l'aldéhyde déshydrogénase, agissent en séquences avec la MAO dans la production des métabolites glycols et acides désaminés. De plus, l'alcool déshydrogénase contribue à la formation de produits finaux du métabolisme des catécholamines. La multiplicité des voies métaboliques assure une redondance dans les mécanismes d'inactivations des catécholamines et mène à divers métabolites finaux (Fig. 8, page 37).

La MAO, bien que présente en grande quantité dans le foie, est surtout située dans les terminaisons nerveuses sympathiques périphériques et centrales, où elle est associée à la membrane externe des mitochondries (Fontaine *et al.*, 1986). La norépinéphrine et l'épinéphrine sont désaminées de façon oxydative par la MAO neuronale en 3,4-dihydroxyphénylgycoaldéhyde (DOPGAL). Les produits désaminés sont des aldéhydes qui sont aussitôt convertis en acide carboxylique (l'acide 3,4-dihydroxymandélique, DOMA) ou en alcool (l'alcool 3,4-dihydroxy-phényléthylèneglycol, DHPEG) sous l'action respective de l'aldéhyde déshydrogénase et de l'aldéhyde réductase. Le DOMA et le DHPEG sont les deux principaux métabolites d'origine intraneuronale (Kopin, 1985).

La seconde voie primaire dans le métabolisme des catécholamines implique la *O*-méthylation par la COMT, laquelle catalyse le transfert d'un groupement méthyl sur l'un des

groupements phénoliques des catécholamines, convertissant la norépinéphrine en normétanéphrine et l'épinéphrine en métanéphrine (Axelrod, 1966). Ceux-ci peuvent être ensuite désaminés par la MAO (Fontaine *et al.*, 1986). On a dénoté l'existence de deux isoenzymes pour la COMT, l'une soluble et l'autre ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique (Lotta *et al.*, 1995). La COMT ancrée à la membrane serait la forme minoritaire de l'enzyme dans la plupart des tissus, mais elle serait toutefois la plus importante dans la *O*-méthylation des catécholamines (Lotta *et al.*, 1995). Des études d'immunohistochimies ont révélé une localisation exclusive de la COMT au niveau des tissus extraneuronaux (Kaplan *et al.*, 1979), en concentration élevée notamment dans le foie et les reins (Graefe & Henseling, 1983).

Les métabolites produits par la MAO peuvent être métabolisés davantage par la COMT (Fig. 8, page 37). Le DHPG est métabolisé par la COMT en 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol (MHPG). Le MHPG peut aussi être produit dans une faible mesure par la désamination de la normétanéphrine et de la métanéphrine. Chez l'humain, l'acide vanillymandélique (VMA), produit largement par l'oxydation du MHPG catalysée par l'alcool déshydrogénase, représente le métabolite final dans la dégradation de la norépinéphrine et de l'épinéphrine (Blombery *et al.*, 1980). À l'exception du VMA, la totalité des catécholamines ainsi que leurs métabolites subissent une sulfo- ou glucurono-conjugaison. Le foie et l'appareil digestif représentent deux des sites les plus importants de conjugaison. Les catécholamines ingérées dans l'alimentation se retrouvent dans le plasma et dans l'urine principalement sous forme conjuguée.

b) Capture neuronal et extraneuronal des catécholamines

Étant donné que les diverses enzymes responsables du métabolisme des catécholamines ont une localisation intracellulaire, le mécanisme primaire limitant l'activité biologique des catécholamines dans l'espace synaptique est leur capture par transport actif, et non le métabolisme par les enzymes. Les fibres sympathiques ont en effet la capacité de capter les catécholamines présentes dans les liquides extracellulaires (Axelrod, 1966). Cette capture s'effectue grâce à un processus appelé « captage-1 » (*uptake-1*), représentant la voie prédominante par laquelle la norépinéphrine présente dans l'espace synaptique est retirée (Iversen, 1973). Le captage-1 est un mécanisme médié par un transporteur membranaire dépendant du Na^+ , qui est saturable, et possédant une plus grande affinité envers la norépinéphrine que pour l'épinéphrine (Iversen, 1973). Son activité peut être inhibée par certaines drogues, dont la cocaïne et les antidépresseurs tricycliques (Graefe & Bonisch, 1988). Bien que le transporteur impliqué dans le captage-1 soit différent de celui impliqué dans la capture de la dopamine et de la norépinéphrine aux niveaux des vésicules de stockage, ces transporteurs semblent néanmoins partager quelques caractéristiques structurales, suggérant l'existence d'une famille de protéines transporteuses de neurotransmetteurs (Landsberg & Young, 1992). Chez l'humain, la protéine formant le transporteur de la norépinéphrine est composée de 12 passages transmembranaires, avec l'extrémité amine et carboxyle terminale située du côté cytoplasmique (Pacholczyk *et al.*, 1991).

La norépinéphrine captée par les terminaisons nerveuses peut soit être réincorporée dans les vésicules de stockage ou être métabolisée par la MAO. La combinaison de la dégradation enzymatique et de la réincorporation vésiculaire de la norépinéphrine contribue à maintenir la

concentration cytoplasmique de celle-ci très basse, tout en maintenant un niveau constant des stocks de norépinéphrine en dépit d'une activité neuronale soutenue.

Les tissus extraneuronaux contribuent aussi au retrait actif des catécholamines par un processus appelé « captage-2 » (*uptake-2*; Iversen, 1973). Le captage-2 de la norépinéphrine neuronale s'effectue principalement par les cellules situées au niveau post-synaptique (Landsberg & Young, 1992). La norépinéphrine qui entre dans ces cellules est rapidement inactivée par la COMT. Ainsi, la *O*-méthylation de la norépinéphrine nécessite une capture extraneuronale. Le mécanisme de captage-2 se distingue du captage-1 par sa plus grande affinité envers l'épinéphrine que pour la norépinéphrine (Osswald & Guimarães, 1983). Il semblerait que le captage-2 et la COMT soient plus importants dans le retrait et le métabolisme des catécholamines circulantes que dans la récupération des amines libérées par les terminaisons nerveuses sympathiques (Trendelenburg, 1988) (Fig. 9, page 38). Environ 5 à 20% de la norépinéphrine libérée par l'ensemble du système nerveux sympathique échappe aux mécanismes de captage-1 et 2 et diffuse alors hors de l'espace synaptique pour se retrouver dans la circulation générale où elle sera rapidement dégradée, son temps de demi-vie étant de 1 à 2 minutes (Silverberg *et al.*, 1978).

c) Inactivation des catécholamines circulantes

Chez l'homme, les concentrations plasmatiques basales de norépinéphrine et d'épinéphrine se situent aux environs de 100 à 350 pg/mL et de 20 à 50 pg/mL, respectivement (Cryer *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1981). Chez l'homme adulte, plus de 90% de l'épinéphrine

circulante provient des médullosurrénales alors que la norépinéphrine provient conjointement des fibres nerveuses sympathiques et des médullosurrénales. Lorsqu'elles se retrouvent dans la circulation sanguine, près de 50% des catécholamines sont conjuguées à des protéines plasmatiques telles l'albumine, les globulines, et les lipoprotéines (Fontaine *et al.* 1986). Les catécholamines plasmatiques sont inactivées par la COMT majoritairement au niveau du foie et des reins, et par la MAO aussi dans le foie (Eisenhofer *et al.*, 1995). On observe d'ailleurs plus de 70% du métabolisme total des catécholamines plasmatiques seulement au niveau de ces deux organes. La circulation pulmonaire représente toutefois un autre site important d'inactivation des catécholamines circulantes. Les catécholamines seraient captées par les cellules endothéliales de la microcirculation des poumons suivi d'une *O*-méthylation à l'intérieure de ces cellules (Nicholas *et al.*, 1992).

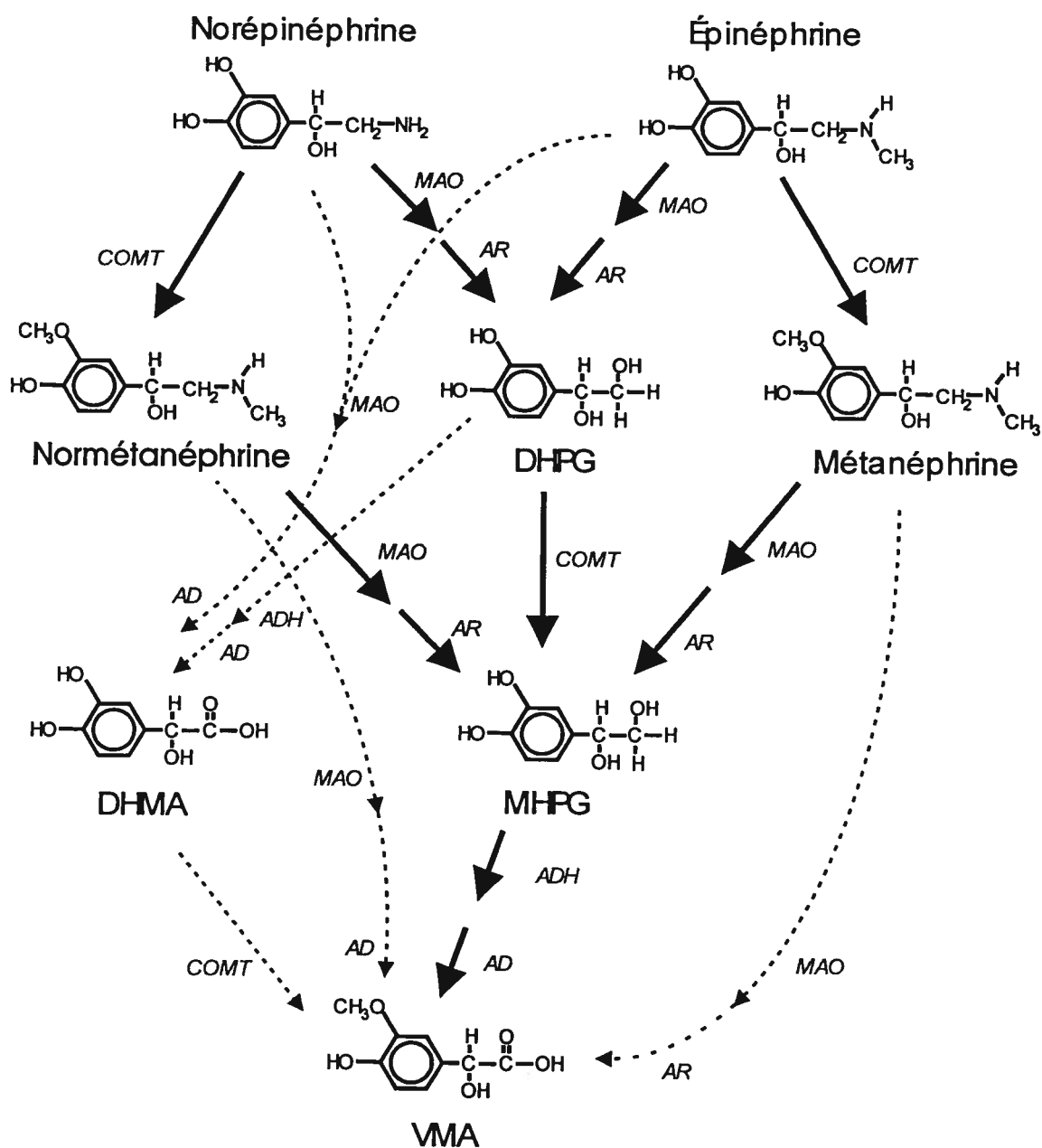


Figure 8. Étapes du recyclage métabolique des catécholamines. Les enzymes impliquées dans chaque voie sont indiquées près de la tête des flèches. Les flèches à traits solides représentent les voies majeures alors que les traits pointillés indiquent les voies d'importance négligeable. MAO: monoamine oxydase; COMT: catéchol-*O*-méthyltransférase; AR: aldéhyde réductase; AD: aldéhyde déshydrogénase; ADH: alcool déshydrogénase; DHPG: 3,4-dihydroxyphénylglycol; MHPG: 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol; DHMA: acide 3,4-dihydroxymandélique; VMA: acide 3-méthoxy-4-hydroxymandélique. *D'après Eisenhofer et al. (2001).*

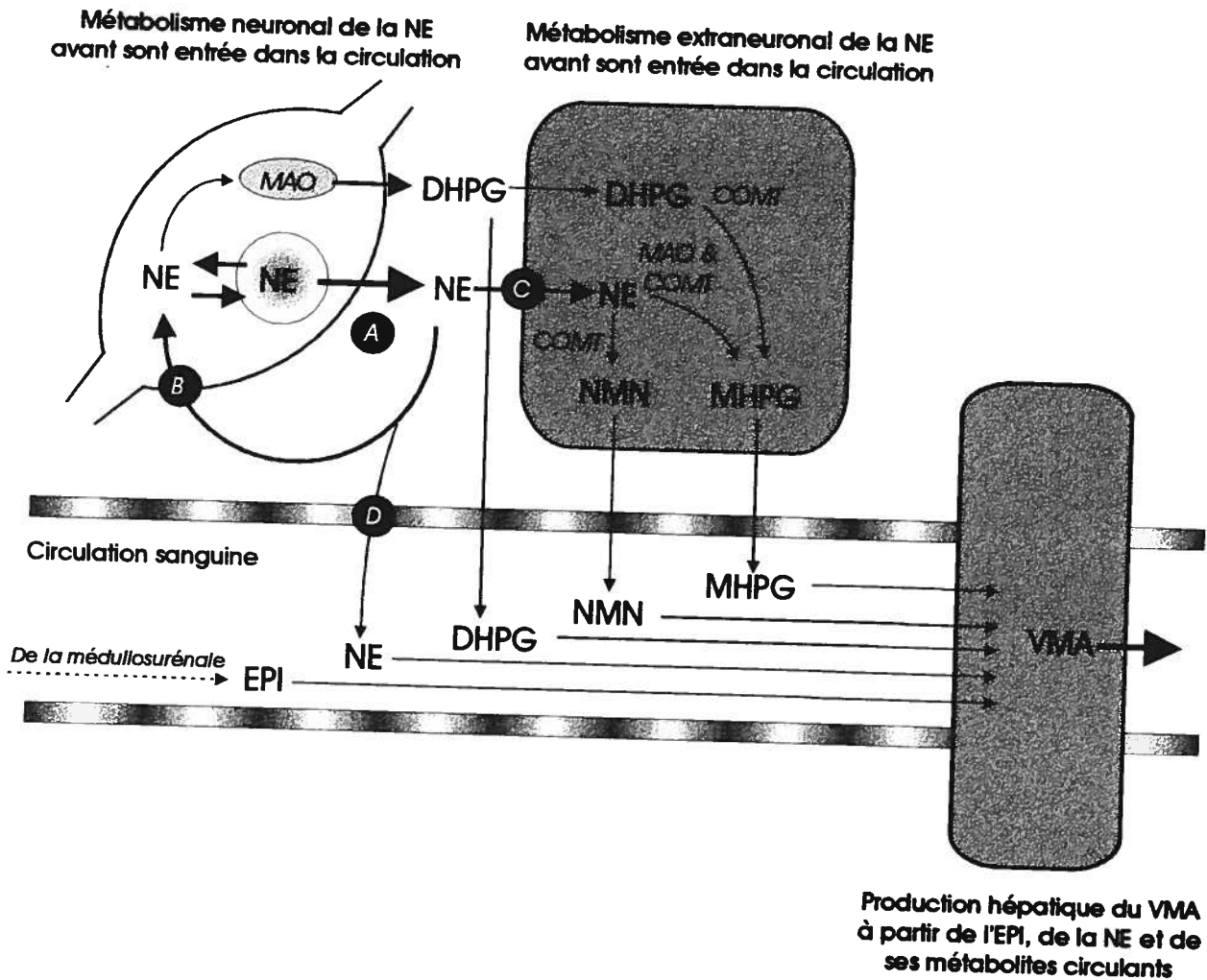


Figure 9. Représentation schématique des voies métaboliques neuronales et extraneuronales pour la norépinéphrine (NE) avant et après l'entrée de la norépinéphrine et de ses métabolites sympathiques dans la circulation sanguine. La majeure partie de la norépinéphrine relâchée par les varicosités sympathiques (A) est retirée par le mécanisme de captage-1 (B), alors qu'une plus petite portion est retirée par les tissus extraneuronaux (captage-2; C), de sorte que seulement de très faibles quantités s'échappent et atteignent la circulation sanguine (D). Le diagramme ne montre pas l'incorporation par les varicosités sympathiques, via le captage-1, d'une portion de l'épinéphrine circulante (EPI). D'après Eisenhofer et al. (2001)

5. Les récepteurs adrénergiques

Les effets physiologiques et métaboliques des catécholamines sont déterminés par des récepteurs spécifiques, dénommés récepteurs adrénergiques, insérés dans la membrane des cellules effectrices. Ahlquist (1948) fut le premier à proposer l'existence de deux types de récepteurs adrénergiques, α et β , pour expliquer les différents effets physiologiques médiés par l'épinéphrine et la norépinéphrine. Ahlquist détermina les effets attribuables aux récepteurs α - ou β -adrénergiques selon un ordre de puissance des agonistes suivants: *épinéphrine* > *norépinéphrine* > *isoprotérénol* définissant les récepteurs α -adrénergiques, alors que *isoprotérénol* > *épinéphrine* >> *norépinéphrine* pour les récepteurs β -adrénergiques. De ce fait, l'épinéphrine stimule les deux types de récepteurs adrénergiques, alors que la norépinéphrine stimule de façon préférentielle les récepteurs α -adrénergiques.

a) Sous-types de récepteurs β -adrénergiques

En 1967, Lands et al. ont classifié sur une base d'évidences pharmacologiques les récepteurs β -adrénergiques en deux sous-types, soit les récepteurs β_1 et β_2 (Lands *et al.*, 1967). Ces derniers démontrèrent que l'épinéphrine et la norépinéphrine ont la même efficacité au niveau du myocarde (β_1), alors que l'épinéphrine est environ de 10 à 50 fois plus puissante que la norépinéphrine au niveau du muscle lisse des vaisseaux et des bronches (β_2). La découverte d'antagonistes sélectifs envers ces deux sous-types de récepteurs a permis de confirmer cette distinction pharmacologique. Ultérieurement, des études de liaisons à l'aide de ligands radioactifs ont démontré l'existence simultanée des deux sous-types de récepteurs β -

adrénergiques dans le myocarde et autres tissus, réfutant la notion selon laquelle différents tissus ne peuvent contenir qu'un seul sous-type de récepteur β -adrénergique (Minneman *et al.*, 1979). La distinction entre ces deux sous-types de récepteurs fut renforcée à l'aide de techniques de clonages moléculaires qui ont démontré une homologie d'à peine 54% dans la séquence primaire en acide aminé des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques (Frielle *et al.*, 1987). Un gène humain codant pour un troisième récepteur β -adrénergique (β_3) a aussi été isolé (Emorine *et al.*, 1989). Les récepteurs β_3 -adrénergiques seraient impliqués principalement dans la lipolyse des tissus adipeux blancs et dans la thermogénèse des tissus adipeux bruns.

Les récepteurs β -adrénergiques sont membres d'une grande famille de récepteurs possédant sept segments hydrophobes traversant la membrane plasmique. Ces régions transmembranaires sont essentielles à la fixation du ligand et semblent créer une sorte de poche pour la fixation de celui-ci (Hutchins, 1994). Les trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques sont couplés à une protéine G stimulante (G_s), localisée près du récepteur dans la face interne de la membrane plasmique (Fig. 10, page 42). La liaison de l'agoniste avec le récepteur β -adrénergique active la protéine G_s via l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP). La protéine G_s activée stimule à son tour l'adénylcyclase, laquelle catalyse la synthèse de l'AMP cyclique à partir de l'ATP (Murad *et al.*, 1962). L'AMP cyclique, un second messenger intracellulaire (le premier messenger étant l'hormone se liant au récepteur), active la protéine-kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA). La PKA existe sous la forme d'un tétramère constitué de deux sous-unités régulatrices et catalytiques. La liaison de l'AMP cyclique avec la sous-unité régulatrice de la PKA provoque sa dissociation (Taylor *et al.*, 1992), avec comme résultat la phosphorylation de diverses protéines conduisant à des changements de l'activité

cellulaire tels une contraction ou une sécrétion. Par exemple, au niveau des cardiomyocytes, la phosphorylation de la phospholompane localisée au niveau du réticulum sarcoplasmique, augmente l'influx de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol. L'élévation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} augmente la sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} , augmentant la force de contraction du myocarde. D'autre part, la phosphorylation dépendante de l'AMP cyclique d'une composante membranaire active les canaux calciques sensibles au voltage situés dans la membrane plasmique du muscle squelettique et du myocarde (Brown & Birnbauner, 1988). Bien que l'activation des récepteurs β_2 -adrénergiques situés sur les cellules musculaires lisses cardiaques provoque une contraction de la cellule, l'activation des récepteurs β_2 -adrénergiques situés au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires cause une relaxation. Les bases exactes de cette différence demeurent à ce jour encore indéterminées. Une hypothèse avancée suggère que l'augmentation de la production d'AMPc dans les cellules musculaires lisses vasculaires, suivant la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques, accroîsserait la séquestration du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique ainsi qu'une augmentation de l'efflux du Ca^{2+} à travers la membrane cellulaire (Beamish et Dhalla, 1985). Il est également possible que la PKA activée, suite à la production d'AMPc dans la cellule musculaire lisse vasculaire, inhiberait à son tour par phosphorylation diverses protéines contractiles (Beamish et Dhalla, 1985).

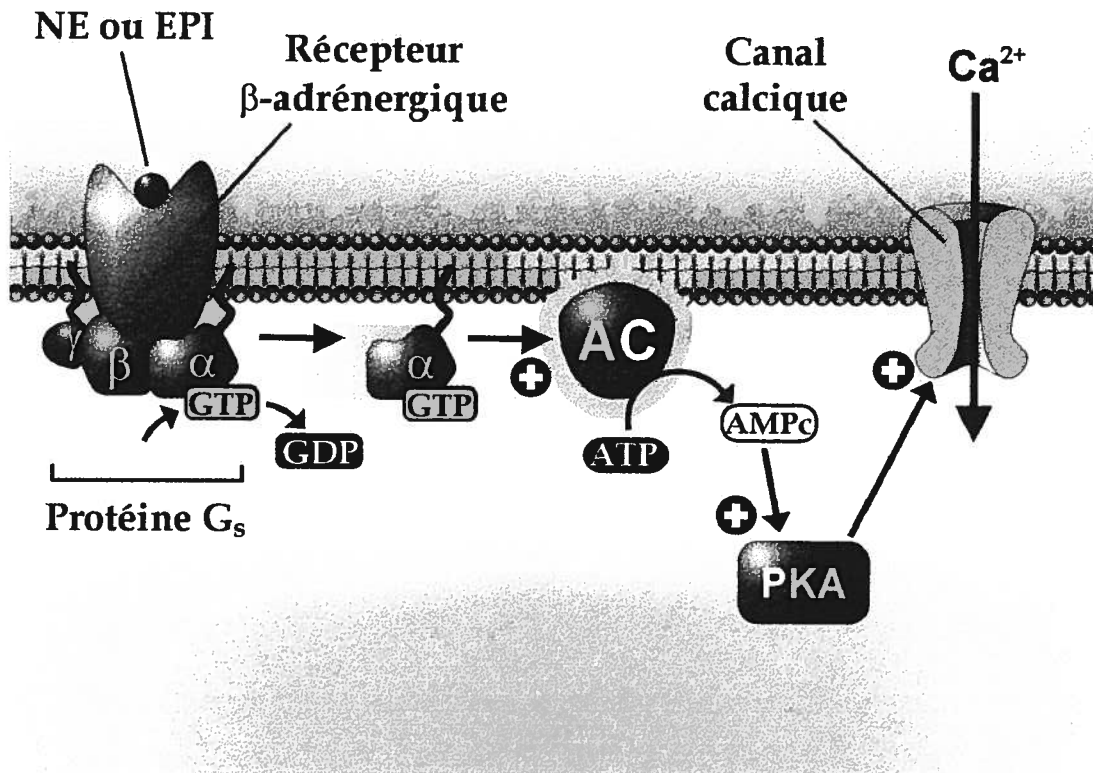


Figure 10. Mécanismes intracellulaires des récepteurs β-adrénergiques dans l'activation du muscle cardiaque. L'occupation du récepteur par la norépinéphrine (NE) ou l'épinéphrine (EPI) permet la liaison du GTP à la sous-unité α de la protéine G_s qui lui est associée. La liaison du GTP active la sous-unité α de la protéine G_s qui se dissocie alors du dimère βγ et va activer l'adénylcyclase (AC). L'activation de l'adénylcyclase augmente la génération d'AMP cyclique (AMPc) à partir de l'ATP, provoquant l'activation de la protéine-kinase dépendante de l'AMPc (PKA). La PKA phosphoryle à son tour les canaux calciques sensibles au voltage, augmentant le flux de Ca²⁺ transmembranaire. L'augmentation des concentrations intracellulaires de Ca²⁺ mène à une activation cellulaire. *D'après Lefkowitz et al. (1998)*

b) Sous-types de récepteurs α -adrénergiques

Des évidences pharmacologiques ont aussi procurées des indications envers l'existence de différents types de récepteurs α -adrénergiques. En effet, il fut constaté qu'un nouveau type de récepteurs α -adrénergique étaient responsable de l'inhibition de la relâche de norépinéphrine par les neurones sympathiques et que ceux-ci différaient de ceux produisant une vasoconstriction ainsi que des effets inotropes positifs dans le cœur (Starke, 1972; Langer 1974). Par conséquent, ces récepteurs α -adrénergiques « pré-synaptiques » furent dénommés α_2 , alors que les récepteurs excitateurs α -adrénergiques « post-synaptiques » furent désignés α_1 (Wikberg *et al.*, 1975). Des évidences suggérant que des structures autres que les terminaisons nerveuses sympathiques pouvaient posséder des récepteurs α_2 -adrénergiques post-synaptiques ont forcé l'abandon de cette classification basée sur une localisation anatomique au profit d'une classification pharmacologique et fonctionnelle (Tableau II, page 48). Par exemple, la stimulation des récepteurs α_2 -adrénergiques post-synaptiques au cerveau est associée à une baisse de l'activité du système nerveux sympathique, ce qui constituerait le mécanisme d'action principal de certains médicaments antihypertenseurs telle la clonidine (Lefkowitz *et al.*, 1998). Des données récentes basées sur les propriétés pharmacologiques, structurales et de liaison avec des radioligands suggèrent un degré d'hétérogénéité supplémentaire des récepteurs α_1 -et α_2 -adrénergiques (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{1B} , α_{2C}). Toutefois, les rôles fonctionnels de chaque sous-type de récepteur n'ont pas été complètement clarifiés.

Les récepteurs α_1 -adrénergiques (Fig. 11, page 45) sont liés à une protéine G_q . L'occupation du récepteur par l'agoniste mène à l'activation de la protéine G_q par l'hydrolyse du

GTP. La protéine G_q activée stimule à son tour la $PLC\beta$, laquelle catalyse l'hydrolyse du PIP_2 pour former deux sous-unités actives, soit l' IP_3 et le DAG (Summers & McMartin, 1993). Le DAG stimule la PKC, conduisant à une activation cellulaire particulièrement par la phosphorylation de nombreux substrats et, parmi eux, des protéines membranaires telles que des canaux, des pompes et des protéines échangeuses d'ions (ATPase transportant le Ca^{2+}). De son côté, l' IP_3 se lie à son récepteur spécifique situé sur le réticulum endoplasmique, provoquant une libération de Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires (Berridge, 1993), activant aussi la cellule. L' IP_3 et le DAG semblent aussi activer la cellule en inhibant les canaux K^+ transitoires activés par le voltage, provoquant ainsi une dépolarisation de la membrane (Fedida *et al.*, 1989). Les récepteurs α_1 -adrénergiques sont situés principalement au niveau post-synaptique, à proximité immédiate des terminaisons nerveuses sympathiques dans les organes cibles périphériques. La norépinéphrine, étant le principal neurotransmetteur des neurones sympathiques, est l'agoniste le plus susceptible d'activer ces récepteurs lors de la stimulation de ces neurones. Les récepteurs α_1 -adrénergiques sont aussi présents en quantités importantes dans le cerveau des mammifères.

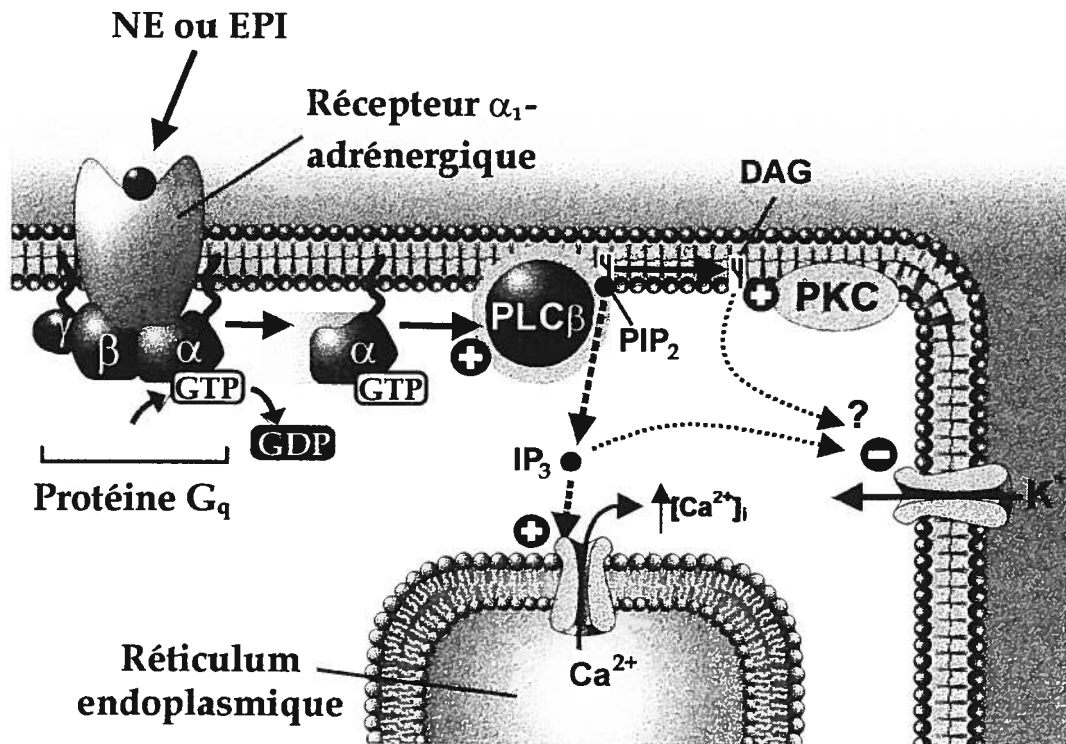


Figure 11. Mécanismes intracellulaires des récepteurs α_1 -adrénergiques. L'occupation du récepteur par la norépinéphrine (NE) ou l'épinéphrine (EPI) permet la liaison du GTP à la sous-unité α de la protéine G_q qui lui est associée. La liaison du GTP active la sous-unité α de la protéine G_q qui se dissocie alors du dimère $\beta\gamma$ et va activer la phospholipase C bêta (PLC- β). La PLC- β hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (IP $_2$), générant l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP $_3$) et le diacylglycérol (DAG). L'IP $_3$ provoque la libération du Ca $^{2+}$ contenu dans le réticulum endoplasmique, augmentant les concentrations intracellulaires de calcium libre ([Ca $^{2+}$] $_i$), menant à une activation cellulaire. L'IP $_3$ et le DAG semblent aussi activer la cellule en inhibant les canaux potassiques (K $^+$) transitoires activés par le voltage. *D'après Lefkowitz et al. (1998)*

L'occupation par un agoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques conduit à une cascade d'évènements intracellulaires distincts des récepteurs α_1 -adrénergiques (Fig. 12, page 47). La stimulation du récepteur α_2 -adrénergique inhibe l'activité de l'enzyme adénylcyclase via l'interaction avec une protéine G inhibitrice (G_i) (Lefkowitz *et al.*, 1998). Cette inhibition enzymatique diminue la formation intracellulaire d'AMP cyclique et par conséquent, diminue aussi l'activité de la PKA. Le mécanisme précis de l'inhibition de l'adénylcyclase par la protéine G_i n'est pas bien connu, et il est possible que G_i agisse indirectement en interférant avec l'activation de l'adénylcyclase induite par la protéine G_s . Le mécanisme de vasoconstriction médié par l'activation des récepteurs α_2 -adrénergiques n'est pas encore établi de façon définitive. Il semblerait que la diminution des concentrations intracellulaires d'AMP cyclique atténuerait la séquestration du Ca^{2+} cytosolique. La protéine G_i peut aussi activer directement les canaux K^+ , provoquant une hyperpolarisation de la cellule et une inhibition subséquente des canaux sensibles au voltage. L'ouverture des canaux K^+ via l'activation des récepteurs α_2 -adrénergiques situés sur les terminaisons nerveuses sympathiques semble être responsable de l'effet inhibiteur de la relâche de norépinéphrine médié par ces récepteurs (Zimanyi *et al.*, 1988).

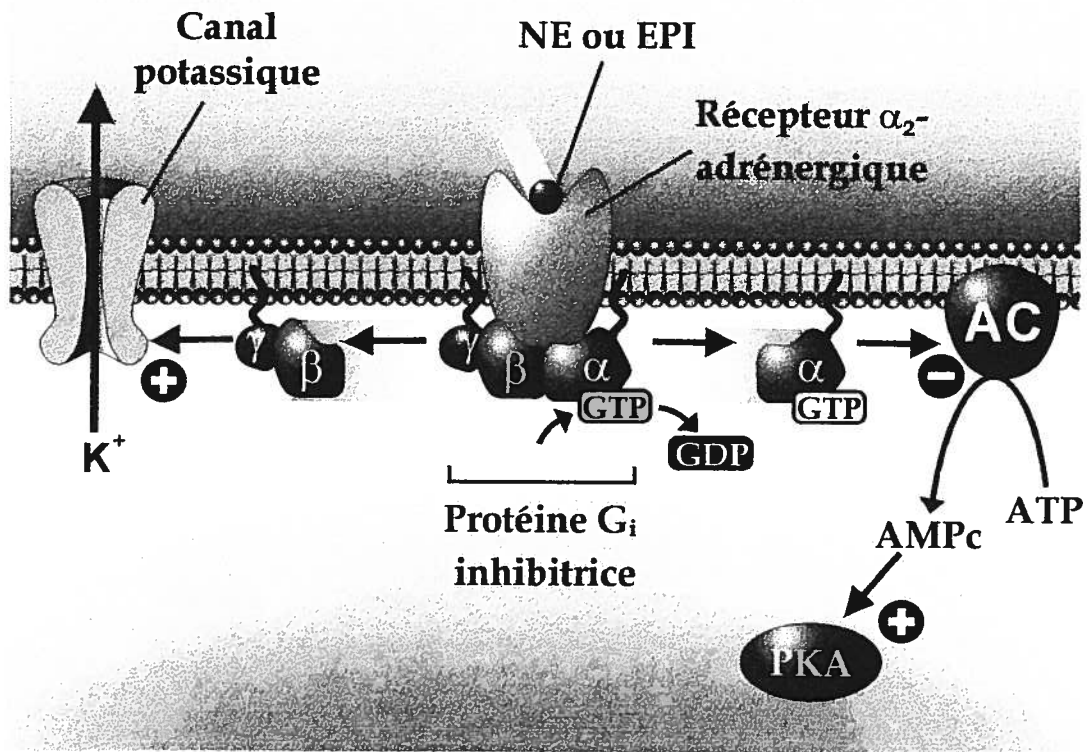


Figure 12. Mécanismes intracellulaires des récepteurs α_2 -adrénergiques. L'occupation du récepteur par la norépinéphrine (NE) ou l'épinéphrine (EPI) permet la liaison du GTP à la sous-unité α de la protéine G_i qui lui est associée. La liaison du GTP active la sous-unité α de la protéine G_i qui se dissocie alors du dimère $\beta\gamma$ pour inhiber l'adénylcyclase (AC), supprimant la formation d'AMP cyclique (AMPc) et conjointement l'activité de la protéine-kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Simultanément, les sous-unités $\beta\gamma$ activent les canaux-récepteurs au potassium (K^+) provoquant une hyperpolarisation de la cellule, supprimant du même coup l'activité des canaux calciques sensibles au voltage (non montrés). *D'après Lefkowitz et al. (1998)*

Tableau II. Principales caractéristiques des sous-types de récepteurs adrénergiques.

Réc	Agonistes	Antagonistes	Tissus	Réponses	Mécanismes moléculaires
α_1	Épi \geq NE \gg Iso Phényléphrine	Prazosine Terazosine	Muscle lisse -vasculaire -génito-urinaire	Contraction	Formation d'IP ₃ et de DAG \uparrow canaux K ⁺ dépendants du Ca ²⁺
			Foie	Glycogénolyse; néoglucogénèse	
			Muscle lisse intestinal	Hyperpolarisation et relaxation	
			Cœur	\uparrow force de contraction arrhythmies	
α_2	Épi \geq NE \gg Iso Clonidine	Yohimbine	Îlots pancréatiques (cell. β)	\downarrow sécrétion d'insuline	\downarrow adénylcyclase \uparrow canaux K ⁺ \downarrow canaux Ca ²⁺ (type L et N) \uparrow phospholipase C \uparrow phospholipase A ₂
			Plaquettes	Agrégation	
			Terminaisons nerveuses	\downarrow libération de NE	
			Muscle lisse vasculaire	Contraction	
			Endothélium vasculaire*	Relaxation	
β_1	Iso $>$ Épi = NE Dobutamine	Métoprolol	Cœur	\uparrow vitesse & force de contraction \uparrow vitesse de conduction du nœud AV	\uparrow adénylcyclase \uparrow canaux Ca ²⁺ (type L)
			Cell. juxtaglomérulaires	\uparrow sécrétion de rénine	
β_2	Iso $>$ Épi \gg NE Terbutaline Albuterol Métaprotérénol	ICI 118551 Butoxamine	Muscle lisse -vasculaire -bronchique -gastro-intestinal -génito-urinaire	Relaxation	\uparrow adénylcyclase
			Muscle squelettique	Glycogénolyse; captage de K ⁺	
			Foie	Glycogénolyse; néoglucogénèse	
			Terminaisons nerveuses sympathiques	\uparrow libération de NE	
β_3	Iso = NE $>$ Épi BRL 37344	ICI 118551 CGP 20712A	Tissu adipeux	Lipolyse	\uparrow adénylcyclase

Épi: épinéphrine; NE: norépinéphrine; Iso: isoprotérénol; \uparrow : stimulation; \downarrow : inhibition. *Adapté de Lefkowitz et al. (1998); * Vanhoutte & Miller (1989).*

II. LES GLANDES MÉDULLOSURRÉNALES

A. Morphologie générale

Les glandes surrénales des mammifères, localisées immédiatement au-dessus du rein, sont constituées de deux glandes endocrines. Au niveau de la portion externe ou corticale, se retrouve la corticosurrénale, laquelle est responsable de la synthèse et de la libération de plusieurs hormones stéroïdiennes (glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes). Dans la portion interne de la glande surrénale se retrouve la médullosurrénale, laquelle représente environ 10 à 20 % de la glande (Brenner, 1982) et qui synthétise une mixture complexe d'hormones, dont la principale est l'épinéphrine. Malgré leur organisation anatomique en une glande unique, la corticosurrénale et la médullosurrénale sont deux glandes endocrines fonctionnellement distinctes, et elles possèdent une origine embryonnaire différente. Ainsi, la corticosurrénale se développe à partir du mésoderme (Rhodin, 1971). À l'inverse, la médullosurrénale dérive de l'ectoderme neuronal (crête neuronale) et elle est constituée de cellules chromaffines, dont l'étymologie est fondée sur une affinité au marquage de sel de chrome (Kohn, 1902). Les cellules chromaffines sont homologues aux neurones sympathiques post-ganglionnaires, étant toutefois dépourvues d'axones, elles partagent néanmoins plusieurs propriétés biochimiques et mécanismes de sécrétion. C'est ce qui explique que les cellules chromaffines ont servi de modèle afin d'élucider les mécanismes impliqués dans la synthèse et la sécrétion des catécholamines dans les terminaisons nerveuses adrénérgiques. D'un point de vue fonctionnel, la médullosurrénale est considérée comme une partie intégrante du système nerveux sympathique. La valeur adaptative, s'il en est, de la coexistence de la corticosurrénale et de la médullosurrénale dans un même organe n'est pas évidente à priori. Dans certaines espèces, les amphibiens et certains poissons notamment, on retrouve deux organes séparés.

À l'intérieur de la médullosurrénale, les cellules chromaffines sont distribuées de façon à former des groupes homogènes de cellules en fonction de leur phénotype, lequel est déterminé par la présence d'épinéphrine ou de norépinéphrine dans les granules de sécrétions. Tout comme les vésicules des varicosités sympathiques, ces granules possèdent la capacité de synthétiser, d'emmagasiner et de libérer les catécholamines. Chaque cellule chromaffine peut contenir jusqu'à 30 000 de ces granules, alors qu'une stimulation dite optimale peut provoquer la libération du contenu d'environ 30% de celles-ci dans la circulation sanguine (Phillips 1982). Généralement, environ 80% des cellules chromaffines chez l'homme sont du phénotype EPI (épinéphrine), le 20% restant étant constitué de cellules chromaffines du phénotype NE (norépinéphrine; von Euler, 1972). Des analyses du contenu total en épinéphrine et de norépinéphrine dans la médullosurrénale indiquent que le ratio d'épinéphrine/norépinéphrine est en accord avec le nombre de cellules chromaffines de chaque type (Verhofstad *et al.*, 1985). Comme le nombre total de cellules EPI dans la médullosurrénale dépasse le nombre de cellules NE chez l'humain ainsi que dans plusieurs espèces étudiées à ce jour (rat, chien, chat, bœuf), cette particularité implique que les effets physiologiques prédominant de la médullosurrénales sont médiés essentiellement par l'épinéphrine. Les cellules EPI diffèrent des cellules NE par la présence de la PNMT, l'enzyme cytosolique responsable de la méthylation de la norépinéphrine en épinéphrine et qui est un marqueur permettant de différencier les deux phénotypes de cellules à l'aide d'outils immunocytochimiques. La différence phénotypique entre les cellules EPI et NE ne se limite pas simplement par la présence ou l'absence de la PNMT. Il existe aussi d'autres différences morphologiques entre ces deux cellules. Par exemple, les cellules NE sont plus petites (Tomlinson *et al.*, 1987), le type et le nombres de récepteurs exprimés à la surface

membranaire sont différents (Serk-Hanssen & Sovik, 1987; Marley *et al.*, 1989). Cette distribution différentielle des récepteurs pourrait expliquer certains résultats d'études où diverses hormones, neuropeptides et neurotransmetteurs démontraient une capacité à stimuler de façon préférentielle la sécrétion des cellules EPI ou NE.

B. Vascularisation de la médullosurrénale

Les glandes surrénales sont des organes hautement vascularisés, recevant environ 0,15% du débit cardiaque total et ce malgré une surface corporelle représentant à peine 0,02% de la surface corporelle totale (Sapirstein & Goldman, 1959). La partie céphalique de chaque glande surrénale est irriguée par un embranchement artérielle dérivant de l'aorte, l'artère surrénalienne supérieure qui est une ramification de l'artère phrénique inférieure. L'apport du sang artériel vers les régions restantes est légèrement différent pour chaque glande. La partie inférieure de la glande surrénale gauche est alimentée par l'artère surrénalienne inférieure laquelle provient de l'artère rénale gauche alors que la partie médiane de la glande est irriguée par l'artère surrénale propre qui prend son origine directement de l'aorte. Quand à la glande surrénale droite, la vascularisation des régions médianes et inférieures de celle-ci est maintenue essentiellement par l'entremise de l'artère phrénique inférieure (Harrison & Hoey, 1960; Vinson *et al.*, 1985). En ce qui concerne la médullosurrénale, elle est desservie principalement par une artère médullaire (*l'arteria medullæ*) provenant des artères du plexus sous-capsulaire. Quatre à six vaisseaux de ce type traversent le cortex surrénalien en longeant la veine centrale sans faire d'embranchements. Ils ne se divisent que lorsqu'ils atteignent la médullosurrénale, de manière à former un lit

capillaire entourant les cellules chromaffines pour ensuite être drainés vers les radicules périphériques de la veine centrale (Idelman *et al.*, 1970; Vinson *et al.*, 1985).

Malgré la multiplicité d'artères approvisionnant la glande surrénale, le drainage surrénalien est accompli par une seule veine centrale. Ce vaisseau relativement important prend son origine dans la région centrale de la médullosurrénale de chaque glande et se déverse directement dans un vaisseau majeur: la glande surrénale droite dans la veine cave inférieure et la glande surrénale gauche dans la veine rénale chez la plupart des mammifères, incluant l'humain (Harrison & Hoey, 1960; Vinson *et al.*, 1985). Chez le chien, par contre, le sang des veines surrénales droite et gauche se jette directement dans la veine cave inférieure dans la majorité des cas (Yamaguchi, 1993). Nous prendrons avantage de cette disposition anatomique de la veine surrénale gauche dans notre modèle expérimental afin de recueillir l'effluent veineux de la médullosurrénale.

C. Innervation de la médullosurrénale

La première description de l'origine des fibres nerveuses innervant la médullosurrénale revient à Elliott (1913). Celui-ci trouva que le principal apport nerveux de la médullosurrénale du chat provient des nerfs splanchniques supérieurs et inférieurs, lesquels quittent la moelle épinière par les racines antérieures, du cinquième segment thoracique (T5) au premier segment lombaire (L1) (Elliott 1913; Fig. 1, page 6). Une étude ultérieure chez le chien démontra effectivement qu'une stimulation électrique de la racine ventrale de la moelle épinière à partir du segments T5 jusqu'au segment L1 provoquait une augmentation de la sécrétion des

catécholamines de la médullosurrénale (Waki 1971). Dans la même étude, la section unilatérale des racines ventrales de T5 à L1 a aboli la sécrétion des catécholamines surréaliennes durant un choc hypoglycémique (Waki 1971). Elliot identifia également des fibres nerveuses en provenance du ganglion lombaire de la chaîne paravertébrale sympathique et se dirigeant soit directement à la glande surrénale, ou bien seulement après avoir passé par le ganglion cœliaque sans toutefois faire de synapses (Elliot 1913). L'importance fonctionnelle de ces fibres pré-ganglionnaires dans la sécrétion des catécholamines par la médullosurrénale fut démontrée par Maycock et Heslop (1939). Ceux-ci observèrent, chez le chat, que l'apport nerveux à la médullosurrénale dérive essentiellement des projections sympathiques thoraco-lombaires ipsilatérales. Selon toute vraisemblance, il semblerait que le nerf vague ne contribuerait pas à l'innervation de la glande surrénale (Hollinshead, 1936; Swinyard, 1937). Bien que l'innervation de la médullosurrénale soit majoritairement ipsilatérale, on retrouve quelques voies suggérant une certaine innervation croisée. En effet, il a été démontré que durant certaines situations, un apport minime à la médullosurrénale provient du nerf splanchnique supérieur et du ganglion prévertébral supérieur contralatéraux (Marley & Prout, 1968). Après avoir pénétré au travers de la région capsulaire, les fibres nerveuses contenues dans le nerf splanchnique forment de multiples embranchements de façon à créer un vaste réseau sous-capsulaire. De là, ces fibres se dirigent surtout vers la médullosurrénale et dans une moindre mesure vers la corticosurrénale, pour former un réseau supplémentaire entourant les cellules de ces régions. Des études plus récentes effectuées chez le rat ont démontrées que chaque cellule chromaffine est innervée en moyenne par 5,4 fibres nerveuses, attestant ainsi de l'innervation substantielle des médullosurrénales (Tomlinson & Coupland, 1990).

Les cellules chromaffines contenues dans la médullosurrénale sont innervées essentiellement par des fibres sympathiques pré-ganglionnaires voyageant dans les nerfs splanchniques, et ces fibres se terminent directement au niveau des cellules médullaires sans interposition de neurones post-ganglionnaires (Hollinshead 1936; Swinyard 1937). Durant plusieurs années, il fut reconnu que l'acétylcholine était le principal neurotransmetteur de ces fibres sympathiques pré-ganglionnaires innervant la médullosurrénale (Feldberg *et al.*, 1934). Toutefois, au cours des dernières années, plusieurs études ont contribué à générer une liste toujours plus longue de substances pouvant jouer un rôle en tant que messenger chimique, co-existant avec l'acétylcholine dans ces fibres pré-ganglionnaires. Ces substances comprennent non seulement des peptides tels les enképhalines et le PACAP mais aussi le radical libre monoxyde d'azote (NO), démontré par la présence de l'enzyme NO synthase (NOS) responsable de la conversion de l'arginine en NO (Fig. 13, page 56) (Holgert *et al.*, 1998).

La glande surrénale reçoit aussi une innervation de type sensorielle prenant son origine à partir des segments T3 à L2 de la racine dorsale de la moelle épinière (Fig. 13, page 55). Ces fibres nerveuses parviennent à la glande majoritairement par la voie du nerf splanchnique et sont intimement associées aux cellules chromaffines ainsi qu'au réseau vasculaire de la médullosurrénale (Mohamed *et al.*, 1988). Ces fibres nerveuses sensorielles sont des afférences de type C, caractérisées par leur sensibilité à la capsaïcine, et dont leurs terminaisons renferment le CGRP et la substance P (Linoila *et al.*, 1980). La capsaïcine est l'agent piquant présent dans bon nombres de piments rouges du genre *Capsicum*, et qui est reconnue pour activer de façon sélective les neurones des afférences sensorielles de type C, s'en suivant une neurotoxicité causée par la déplétion des neuropeptides CGRP et substance P (Buck & Burk, 1986). C'est ainsi

que chez des rats ayant reçu un traitement à la capsaïcine avant leur naissance, l'expression du CGRP et de la substance P avait disparue des terminaisons splanchniques chez l'animal adulte, démontrant la nature sensorielle de ces fibres peptidiques (Pelto-Huikko 1989; Khalil *et al.*, 1986a). Il est probable que certaines fibres nerveuses sensorielles contiennent également les peptides galanine et PACAP (Bauer *et al.*, 1986; Shiotani *et al.*, 1995).

La présence de ganglions intrinsèques a aussi été démontré dans la glande surrénale du rat, ainsi que dans plusieurs autres espèces (Fig. 13, page 55). Toujours chez le rat, on dénombre l'existence d'au moins deux types de ganglions: le type I, exprimant la norépinéphrine et le NPY; et le type II, exprimant le VIP et la NOS. Les ganglions de type I sont localisés au centre de la médullosurrénale alors que les ganglions de type II sont localisés en périphérie, dans la région capsulaire de la glande. Les neurones post-ganglionnaires de ces ganglions se projettent dans la médullosurrénale, le cortex surrénalien et aussi dans le nerf splanchnique (Dagerlind *et al.*, 1995). Le niveau d'innervation post-ganglionnaire de la médullosurrénale est par contre relativement faible et il faut être prudent avant d'associer un rôle direct de ces fibres dans la sécrétion des catécholamines. Toutefois, le niveau d'innervation est suffisant pour être impliqué dans le contrôle du réseau vasculaire des régions médullaires et corticales (Parker *et al.* 1993).

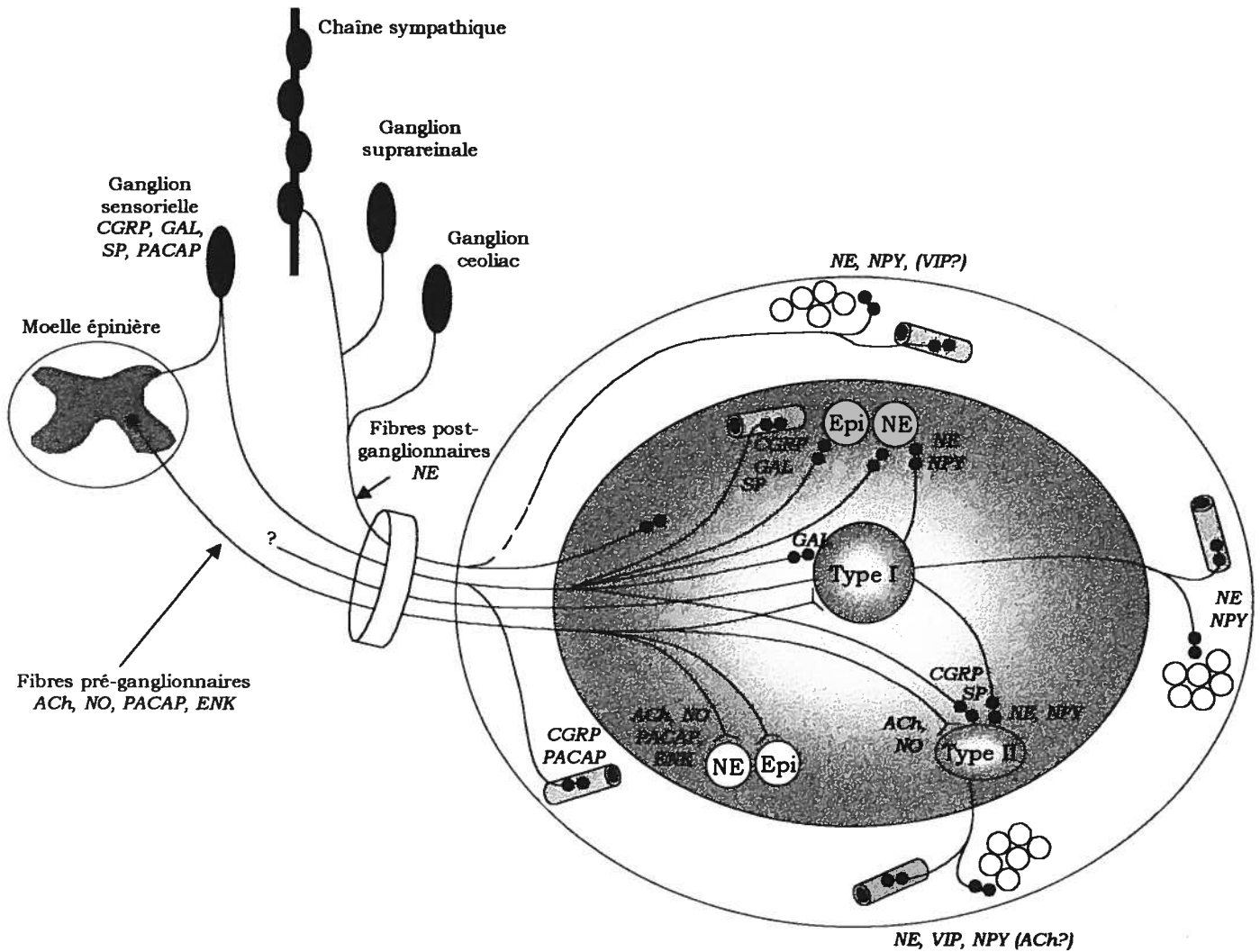


Figure 13. Représentation schématique de l'innervation de la glande surrénale du rat montrant l'origine ainsi que les neurotransmetteurs potentiels des fibres nerveuses pré-ganglionnaires, post-ganglionnaires et sensorielles. Les ganglions intrinsèques sont du type I ou II. Les cellules chromaffines (Epi et NE), corticales ainsi que les vaisseaux sanguins sont illustrés. Le phénotype des divers neurotransmetteurs est indiqué au niveau des terminaisons nerveuses. Les fibres pré-ganglionnaires innervant les ganglions de type I possèdent probablement l'ACh, le NO et l'enképhaline comme neurotransmetteurs (non-indiqués). Le point d'interrogation indique une cible inconnue. Les termes « pré-ganglionnaires » et « post-ganglionnaires » réfèrent aux fibres sympathiques. *Adapté de Holgert et al., (1998)*

D. Régulation de la sécrétion des catécholamines surrenaliennes

1. Connexions centrales

La sécrétion des catécholamines par les cellules chromaffines est gouvernée essentiellement par la variation dans la fréquence des influx nerveux dans les fibres sympathiques pré-ganglionnaires innervant la médullosurrénale (Holets & Elde, 1982; Marley & Prout, 1965). Des évidences expérimentales indiquent qu'une partie de ce contrôle exercé par l'activité nerveuse proviendrait du système nerveux central (Strack *et al.*, 1989). En effet, plusieurs études ont démontré des réponses distinctes de la médullosurrénale obtenues en stimulant différentes régions centrales. Depuis un certain temps, il est bien connu que la sécrétion d'épinéphrine ou de norépinéphrine surrenaliennes en réponse à une stimulation électrique de l'hypothalamus varie selon la position de l'électrode de stimulation (Folkow & von Euler, 1954). De plus, chez certaines espèces animales (le chat notamment), il a été démontré que la proportion d'épinéphrine et de norépinéphrine libérée durant une activation réflexe de la médullosurrénale pouvait varier en fonction du type de stimulation employée (von Euler, 1956). Par exemple, une hémorragie provoquée chez le chat induit une libération préférentielle de norépinéphrine (Feuerstein & Gutman, 1971), alors qu'une hypoglycémie chez le rat entraîne une libération préférentielle d'épinéphrine (Khalil *et al.*, 1986b). Les mécanismes précis par lesquels des régions spécifiques du cerveau ou de la moelle épinière peuvent régler de façon précise les divers phénotypes de cellules chromaffines est encore mal compris. Durant l'embryogenèse, les chromoblastes destinés à être des cellules de phénotype EPI ou NE migrent indépendamment en petits groupes homogènes vers la glande surrénale le long de fibres nerveuses non-myélinisées, présentes au moment de la migration, avec les conséquences inévitables d'une innervation séparée pour chaque phénotype de cellules chromaffines (Leon *et*

al., 1992). En lien avec cette dernière observation, une étude récente a fait la démonstration d'une population distincte de neurones pré-ganglionnaires innervant de façon sélective soit les groupes de cellules de phénotype EPI ou NE (Edwards *et al.*, 1996). Ainsi, il apparaît évident que l'épinéphrine et la norépinéphrine peuvent être libérées dans des proportions différentes seulement en alternant l'activation de voies d'innervations efférentes distinctes. Chez le veau éveillé, la stimulation électrique du nerf splanchnique à l'aide d'une électrode provoque généralement une sécrétion d'épinéphrine et de norépinéphrine qui augmente de façon proportionnelle avec la fréquence de stimulation (de 2 à 10 Hz) (Edwards & Jones, 1993). Lorsque les concentrations plasmatiques des catécholamines libérées sont exprimées en rapport épinéphrine/norépinéphrine, celui-ci semble être généralement aux environs de 4 (Lhoste, 1985). Cependant, dans la même étude, Edwards & Jones (1993) ont démontré qu'une réponse sécrétrice différentielle de la médullosurrénale pouvait être obtenue simplement en appliquant de façon intermittente une stimulation électrique au nerf splanchnique. Également, depuis un certain nombre d'années, il était connu que la composition des catécholamines sécrétées suite à une stimulation du nerf splanchnique dépendait de la fréquence de stimulation utilisée; une fréquence élevée provoquant une libération préférentielle d'épinéphrine (Mirkin, 1961). Collectivement, ces résultats démontrent que les fonctions sécrétrices de la médullosurrénales peuvent être contrôlées de façon sélective à un niveau supérieur ou central via des circuits nerveux spécifiques.

2. Régulation locale

a) Contrôle cholinergique

Lorsqu'un influx nerveux se propage le long du nerf splanchnique, l'excitation des terminaisons nerveuses déclenche la libération de l'acétylcholine, laquelle active ensuite les récepteurs cholinergiques situés sur les cellules chromaffines et provoquant la sécrétion des catécholamines surrénaliennes (Dale, 1914; Feldberg *et al.*, 1934). La contribution des récepteurs cholinergiques impliqués dans la sécrétion des catécholamines dépend de l'espèce animale et de la concentration d'acétylcholine utilisée (Livett, 1984). Le poulet et le hamster ne semblent posséder que des récepteurs muscariniques ou nicotiniques, respectivement, alors que le bœuf, le chat, le chien, le rat et l'humain possèdent les récepteurs nicotiniques et muscariniques (Livett & Marley, 1993). La stimulation du récepteur nicotinique (N_N) par l'acétylcholine provoque un influx rapide d'ions Na^+ dans la cellule chromaffine (Wada *et al.*, 1985). Cette entrée massive d'ions Na^+ dépolarise la cellule, stimulant un influx de Ca^{2+} via les canaux calciques sensibles au voltage, qui sont surtout du type L, suivie d'une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et de l'exocytose des catécholamines surrénaliennes (Cardenas *et al.*, 1988). À l'opposé, la stimulation du récepteur muscarinique par l'acétylcholine augmente la sécrétion des catécholamines de façon plus modeste et par un mécanisme encore incomplètement élucidé. Dans des conditions *in vitro*, il a été démontré que la stimulation du récepteur muscarinique augmentait les concentrations de Ca^{2+} dans le cytosol malgré l'absence de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire (Malhotra *et al.*, 1988). Cette augmentation des concentrations de Ca^{2+} proviendrait de la mobilisation du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires suite à la formation d' IP_3 (Malhotra *et al.*, 1988). L'activation des récepteurs muscariniques pourrait également produire des changements dans la conductance membranaire, notamment par l'entremise des canaux potassiques dépendant du Ca^{2+} (Inoue *et*

al., 1995). Par contre, ces différents effets médiés par les récepteurs muscariniques n'ont pas encore été associés à un sous-type particulier, d'autant plus que les sous-types M_1 à M_4 ont tous été identifiés au niveau des cellules chromaffines (Fernando *et al.*, 1991; Bönisch *et al.*, 1990; Ballesta *et al.*, 1989; Delmendo *et al.*, 1989). Une étude récente suggère toutefois que les sous-types M_3 et M_4 seraient fonctionnellement impliqués dans la glande surrénale du rat (Barbara *et al.*, 1998). Il est intéressant de noter qu'une exposition à des concentrations élevées d'acétylcholine ($10^{-5}M$) engendre une désensibilisation des récepteurs nicotiques (Livett & Marley, 1993). À l'inverse, l'activation des récepteurs muscariniques par l'acétylcholine libérée des terminaisons splanchniques requiert apparemment une activité nerveuse intense (Barbara *et al.*, 1998). Les auteurs de cette étude ont suggéré une localisation extra-synaptique pour les récepteurs muscariniques de la cellule chromaffine, ce qui pourrait expliquer certains résultats expérimentaux confondants (Barbara *et al.*, 1998).

L'influx de Ca^{2+} dans la cellule chromaffine suite à la stimulation du récepteur nicotinique demeure le mécanisme prédominant par lequel les catécholamines surrénaliennes sont sécrétées. Toutefois, une exposition prolongée des cellules chromaffines à la nicotine active la PKC et augmente les niveaux d'ARNm codant pour les enzymes impliqués dans la synthèse des catécholamines (Tuominen *et al.*, 1992). Des effets à court et à long terme de la PKC sur les voies de signalisations dans les cellules chromaffines ont été proposés: à court terme, la PKC aurait un effet permissif sur la sécrétion initiée par les récepteurs nicotiques (TerBush & Holz, 1990); à long terme, la PKC est susceptible d'avoir un effet rétro-actif sur les canaux calciques sensibles au voltage (Shearman *et al.*, 1989) ainsi que sur la réponse des récepteurs nicotiques (Huganir & Greengard, 1989). Tuominen *et al.* (1992) ont proposé que la PKC agirait à titre de

second messenger « tampon », favorisant la réponse sécrétrice dans un premier temps, mais protégeant la cellule d'une sur-stimulation, de l'autre. On croit que le mécanisme moléculaire responsable de l'activation à court terme de la PKC serait l'influx de Ca^{2+} (TerBush & Holz, 1990) alors que celui responsable de l'activation à long terme serait probablement via la formation de diacylglycérol médiée par le récepteur nicotinique (Tuominen *et al.*, 1992). *In vitro*, la stimulation du récepteur muscarinique augmente aussi le métabolisme du phosphatidylinositol et provoque une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, mais peu ou pas la sécrétion des catécholamines (Schneider, 1987). L'importance physiologique de l'activation des récepteurs muscariniques dans la sécrétion des catécholamines surrénaliennes *in vivo* est encore controversée mais elle pourrait être reliée à des effets à long terme médiés par la PKC.

b) Régulation non-cholinergique

La sécrétion des catécholamines a été attribuée de façon traditionnelle à l'acétylcholine et à son action sur les récepteurs nicotiniques situés à la surface des cellules chromaffines. Pourtant, un nombre important de neuropeptides libérés par les terminaisons nerveuses splanchniques, des hormones circulantes de-même que celles produites localement, et certains facteurs tissulaires aussi produits localement, ont la capacité de provoquer *et/ou* de moduler localement la sécrétion des catécholamines (Burgoyne, 1991). Pour certains de ces agents, il existe maintenant un nombre impressionnant d'évidences qui suggèrent leur implication directe dans le contrôle de la sécrétion des catécholamines. En raison du nombre important de facteurs non-cholinergiques possédant des propriétés stimulantes sur la sécrétion des catécholamines, seulement les mécanismes les plus importants seront abordés dans cette section. Le lecteur est prié de se référer

au Tableau III (page 68) où les effets de diverses substances endogènes sur la sécrétion des catécholamines y sont résumés.

(1) Automodulation

La notion d'automodulation implique qu'un neurotransmetteur, lorsqu'il est libéré, peut moduler la libération subséquente de ce même neurotransmetteur en activant un récepteur présynaptique, c'est-à-dire situé au niveau de la terminaison nerveuse, constituant ainsi une boucle de rétro-contrôle (Rand *et al.*, 1990). L'existence de récepteurs α_2 - et β_2 -adrénergiques présynaptiques modifiant la libération de norépinéphrine au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques est bien fondée (Starke *et al.*, 1989). Malgré les nombreuses similitudes tant fonctionnelles que structurales entre les neurones sympathiques et les cellules chromaffines, l'existence de ces récepteurs sur les terminaisons nerveuses splanchniques ou sur les cellules chromaffines de la médullosurrénale est encore controversée (Yamaguchi, 1992). En effet, des études effectuées dans des conditions *in vitro* ou *in vivo* ont fourni des résultats contradictoires. Par exemple, certaines observations effectuées dans la médullosurrénale du bœuf *in vitro* (Boonyaviroj & Gutman, 1979) et chez le chien anesthésié (Foucart *et al.*, 1987, Foucart *et al.*, 1988a) appuient l'hypothèse selon laquelle les cellules chromaffines, à l'instar des terminaisons nerveuses sympathiques, possèdent des récepteurs α_2 -adrénergiques inhibant la sécrétion des catécholamines par un mécanisme de rétroaction négative. Cependant, des travaux effectués sur la glande isolée et perfusée de rat (Sharma *et al.*, 1987), de lapin (Collet *et al.*, 1984) et chez le chien anesthésié (Yamaguchi & Brassard, 1988; Briand *et al.*, 1990) n'ont pu valider cette hypothèse. La nature de la stimulation utilisée dans ces différentes études pour activer la

médullosurrénale (p. ex. stimulation directe du nerf splanchnique versus activation par réflexe) pourrait expliquer la divergence des résultats obtenus (Yamaguchi, 1992). En effet, il est possible que des stimulations d'intensités différentes aient masqué l'effet des récepteurs α_2 -adrénergiques sur les réponses sécrétrices de la médullosurrénale.

En contre-partie, il a été démontré chez le chien *in vivo* que la réponse médullaire pouvait être bloquée en présence de ICI 118551, un antagoniste sélectif β_2 -adrénergique (Foucart *et al.*, 1988b; Foucart *et al.*, 1991). De façon similaire, Koganei *et al.* (1995) ont démontré également chez le chien *in vivo* qu'une activation des récepteurs β_2 -adrénergiques dans la médullosurrénale facilitait la sécrétion des catécholamines induite par une stimulation du nerf splanchnique. Ensemble, ces études suggèrent l'existence d'un mécanisme facilitateur soutenu par des récepteurs β_2 -adrénergiques au niveau de la glande surrénale. Toutefois, l'existence d'un tel mécanisme facilitateur dans des conditions *in vitro* demeure encore controversée (Greenberg & Zinder, 1982; Collett *et al.*, 1984). Comme on peut le constater, les mécanismes inhibiteurs α_2 - et facilitateurs β_2 -adrénergiques agissant localement sur la sécrétion des catécholamines surrénaliennes semblent fonctionner différemment de ceux situés au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques. Il est possible toutefois que le mécanisme β_2 -facilitateur n'intervienne qu'à de faibles stimulations de la médullosurrénale alors que le mécanisme α_2 -inhibiteur prévale lors d'une stimulation de plus forte intensité (Foucart *et al.*, 1988b).

(2) Modulation humorale

Il est maintenant bien établi que la sécrétion des catécholamines est contrôlée par divers mécanismes neuronaux et non-neuronaux se complétant mutuellement selon la nature du stress (Marley *et al.*, 1985). Ces mécanismes non-neuronaux incluent des substances endogènes telles les hormones endocriniennes, libérées dans le sang au cours d'une situation pathophysiologique, et qui possèdent la capacité de moduler ou d'induire une réponse sécrétrice de la médullosurrénale. En fait, l'identité de l'une de ces substances, soit l'histamine (qui est relâchée durant un choc d'hypersensibilité allergique), fut établie avant-même que l'acétylcholine soit identifiée comme le neurotransmetteur dans les fibres sympathiques pré-ganglionnaires innervant la médullosurrénale (Kellaway & Cowell, 1923). Une autre hormone circulante, l'angiotensine II, produite durant un choc circulatoire, possède aussi la capacité d'induire une sécrétion des catécholamines par les cellules chromaffines (Peach, 1971). En plus de ces deux hormones qui sont les mieux caractérisées, le lecteur est prié de se référer au Tableau III (page 69) pour une description plus détaillée de l'action d'autres substances circulantes sur la sécrétion des catécholamines. La puissance et les voies de signalisations impliquées dans leurs effets sécréteurs sont complexes et varient d'une substance à l'autre. De plus, il a été démontré que certains récepteurs spécifiques à ces hormones ont une distribution différentielle au niveau des divers phénotypes de cellules chromaffines. Par exemple, les récepteurs à l'histamine de type H₁ seraient plus abondant dans les cellules de phénotype EPI (Choi *et al.*, 1993). De façon similaire, les récepteurs à l'angiotensine II seraient plus abondant au niveau des cellules de phénotype EPI que NE (Livett & Marley, 1993). Les conséquences immédiates d'une telle distribution inégale de certains récepteurs entre les différents phénotypes de cellules chromaffines sont qu'un agoniste donné, présent dans la circulation en réponse à une situation pathophysiologique

particulière, celui-ci aura la capacité d'induire une sécrétion préférentielle soit d'épinéphrine ou soit de norépinéphrine, selon leur affinité pour ces récepteurs.

Les glucocorticoïdes, hormones très importantes dans la régulation du métabolisme de l'organisme et synthétisées par la corticosurrénale, sont présents localement dans la médullosurrénale en concentrations élevées à cause de la direction de la circulation sanguine cortico-médullaire. Des études biochimiques effectuées par Wurtman & Axelrod (1966) ont procuré des évidences convaincantes de la régulation de l'activité de la PNMT par les glucocorticoïdes. Depuis, des études additionnelles ont démontré que la synthèse des principales enzymes médullaires impliquées dans la synthèse des catécholamines (tyrosine hydroxylase, dopamine β -hydroxylase et PNMT) était régulée en partie par les divers stéroïdes produits par la corticosurrénale (Axelrod & Reisine, 1984). Cette association phylogénique de la médullosurrénale et du cortex surrénalien contribuerait à maintenir une sécrétion appropriée d'hormones de la médullosurrénale lors de stress persistants suffisant pour provoquer une hausse de la sécrétion de corticostéroïdes (essentiellement le cortisol).

(3) Modulation peptidique

Conjointement à l'acétylcholine et certaines hormones, un nombre important de neuropeptides est impliqué dans la régulation de la sécrétion des catécholamines en tant que neurotransmetteurs ou neuromodulateurs (Livett, 1990). Tel que mentionné précédemment, la médullosurrénale contient un nombre important de neuropeptides présents dans les cellules chromaffines, dans les ganglions intrinsèques et dans les terminaisons nerveuses splanchniques.

Ces neuropeptides sont susceptibles d'être relâchés lors d'une stimulation nerveuse afin d'agir localement sur la sécrétion des catécholamines. Le VIP fut le premier de ces neuropeptides à être identifié de façon positive dans la médullosurrénale (Said, 1976). Depuis, le nombre n'a cessé d'augmenter: substance P (Linnoila *et al.*, 1980), neurotensine (Lundberg *et al.*, 1982), NPY (Allen *et al.*, 1983), galanine (Bauer *et al.*, 1986), CGRP (Kuramoto *et al.*, 1987), et plus récemment, le PACAP (Shiotani *et al.*, 1995). Beaucoup de ces neuropeptides sont capables d'induire une sécrétion de catécholamines via l'activation de leurs récepteurs respectifs présents sur la cellule chromaffine. D'autres agiront plutôt sur les mécanismes impliqués dans la transmission cholinergique médiant la sécrétion des catécholamines. La substance P, qui a été étudiée de façon intensive, potentialise la sécrétion des catécholamines surréaliennes induite par une stimulation transmurale de la glande, sans toutefois modifier la sécrétion basale (Zhou & Livett, 1990). Il fut proposé suite à cette observation que la substance P était un neuromodulateur, prévenant la désensibilisation des récepteurs nicotiniques et contribuant ainsi à maintenir une sécrétion adéquate des catécholamines au cours de situations de stress. De plus, de multiples évidences suggèrent que le débit sanguin de la glande surrénale serait contrôlé, du moins en partie, par des neuropeptides possédant des propriétés vasoactives tels le VIP, la substance P, le NPY. Ces neuropeptides sont en effet libérés de la région capsulaire/sous-capsulaire de la glande surrénale en réponse à une stimulation du nerf splanchnique (Hinson *et al.*, 1994). Par conséquent, ces neuropeptides peuvent influencer les fonctions sécrétrices de la glande surrénale soit directement ou indirectement, introduisant un niveau additionnel de complexité dans le contrôle de la sécrétion des catécholamines. Le PACAP semble jouer un rôle de plus en plus déterminant dans la sécrétion des catécholamines par la médullosurrénale et, de ce fait, sera traité de façon plus approfondie dans la prochaine section.

E. Importance physiopathologique des catécholamines circulantes

La sécrétion des catécholamines par les médullosurrénales est importante pour le maintien de l'homéostasie en réponse à un stress (Axelrod & Reisine, 1984). Bien que les catécholamines influencent pratiquement tous les tissus de l'organisme, celles-ci ne constituent pas les seuls mécanismes régulateurs mais participent plutôt, avec d'autres systèmes hormonaux et neuronaux, à la régulation d'une multitude de fonctions physiologiques afin de préserver l'homéostasie. Habituellement, l'épinéphrine et la norépinéphrine circulantes sont relâchées par les médullosurrénales en même temps que les fibres nerveuses sympathiques stimulent les différents organes. La stimulation des divers organes s'effectue via deux voies différentes agissant simultanément, l'une directe par les nerfs sympathiques et l'autre indirecte par les hormones des médullosurrénales. De façon générale, les deux voies de stimulation se supportent mutuellement et peuvent se substituer l'une à l'autre. Toutefois, les hormones des médullosurrénales ont la capacité unique d'affecter des fonctions de l'organisme indépendamment de l'innervation par des neurones sympathiques. Cette propriété découle du fait que les catécholamines circulantes libérées par les médullosurrénales peuvent atteindre certaines cellules qui ne sont pas innervées par les fibres sympathiques, notamment les plaquettes et leucocytes présents dans le sang (Lefkowitz *et al.*, 1998). Aussi, il est probable qu'une population de récepteurs α_2 - et β_2 -adrénergiques postsynaptiques serait située à l'extérieur des jonctions nerveuses ou au niveau de sites relativement éloignés des terminaisons nerveuses sympathiques et par conséquent, généralement inaccessibles à la norépinéphrine neuronale. Ces récepteurs sont donc plus susceptibles d'être stimulés par les catécholamines circulantes.

L'épinéphrine produite par les médullosurrénales possède une plus grande affinité que la norépinéphrine envers les récepteurs β_2 -adrénergiques. Ainsi, la stimulation de ces récepteurs par l'épinéphrine circulante peut engendrer des effets vasculaires, respiratoires et métaboliques importants (Tableau II, page 48). Également, les fibres nerveuses sympathiques ont la capacité, via le mécanisme de captage-1, d'incorporer l'épinéphrine qui leur est apportée par la circulation (Majewski *et al.*, 1981). L'épinéphrine ainsi emmagasinée peut être libérée simultanément avec la norépinéphrine durant une stimulation sympathique et se lier aux récepteurs β_2 -adrénergiques situés au niveau présynaptique, augmentant encore plus la libération de norépinéphrine des terminaisons nerveuses.

Tableau III. Actions de différentes substances endogènes sur la sécrétion basale des catécholamines surrénaliennes.

Substances endogènes	Récepteur	Sécrétion basale	Influx de Ca ²⁺	Production d'IP ₃	[Ca ²⁺] _i	réponse nicotinique
ACh	via N _N	↑↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	
	via M ₁ (M ₃ & M ₄ ?)	↑↑	0	↑	↑	0
Adénosine	?	↓*	?	?	?	↓
Angiotensine II	AT ₁	↑	↑	↑↑	↑	0
	AT ₂ **	?/0	?	?	?	?/0
ANP	ANP-A	0	?	?	?	↑
ATP	P _{2Y}	↓ [†]	↓	?	?	↓
Bradykinine	B ₂	↑	↑	↑↑	↑	?
Dopamine	D ₂	0	↓	?	?	↓
Endothéline 1	ET _A	↑	↑	↑/?	↑	↑
	ET _B	?	?	?	?	↓
GABA _A	?	↑↑	↑↑	?	↑↑	?
GABA _B	?	↓	↓	?	?	↓
Histamine	H ₁	↑↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	?
Opiacés endogènes	μ, δ, κ	0	↓	0	?	↓
PGE ₂	?	↑	↑	↑↑	0/↑	↓
Substance P	(NK ₁ ?)	0	?	?	?	↓
PACAP [‡]	PAC ₁	↑↑↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑
VIP [‡]	PAC ₁	↑	?	↑↑	↑↑	↑

Les flèches symbolisent une évaluation semi-quantitative des effets: ↑↑↑, stimulation importante; ↑↑, stimulation modérée; ↑, stimulation faible; ↓, inhibition; 0, aucun effet; ?, inconnu. [Ca²⁺]_i: concentration intracellulaire de Ca²⁺; IP₃: inositol-1,4,5-triphosphate. * Tseng *et al.*, 2001; ** Martineau *et al.*, 1999 (chien in vivo); † Harkins & Fox, 2000, ‡ Vaudry *et al.*, 2000.. Adapté et actualisé de Burgoyne (1991).

III. Le Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)

En 1989, Miyata *et al.* ont isolé un peptide à partir d'extraits d'hypothalamus de moutons exerçant une forte activité stimulatrice de l'adénylcyclase sur des cellules hypophysaires de rat en culture primaire (Miyata *et al.*, 1989) et qui, de ce fait, fut nommé *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* ou PACAP. Le PACAP a été caractérisé initialement sous la forme d'un peptide comportant 38 acides aminés, α -amidé à son extrémité C-terminale, dénommé PACAP-38 (Miyata *et al.*, 1989). Il s'avéra que le PACAP-38 renfermait une séquence interne (Gly²⁸-Lys²⁹-Arg³⁰) qui constitue un signal de clivage pour les prohormones-convertases (PC) (Mains *et al.*, 1990) et d'amidation (Eipper *et al.*, 1992). En accord avec cette dernière observation, Miyata *et al.* ont isolé et caractérisé un peptide α -amidé de 27 acides aminés correspondant à la région N-terminale du PACAP-38, nommé par conséquent PACAP-27 (Miyata *et al.*, 1990). Le PACAP est relié structurellement au *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP), dès lors faisant partie de la famille de peptides glucagon/VIP qui inclut également la sécrétine. En fait, la séquence du PACAP-27 présente 68 % d'analogie avec celle du VIP entier (Miyata *et al.*, 1990). Depuis, le PACAP a été identifié dans plusieurs espèces, incluant l'homme, les oiseaux, et les amphibiens. On le retrouve aussi dans un prochordé ancien, le tunicier (invertébré marin). La séquence d'acides aminés du PACAP est très bien conservée parmi ces espèces, une différence de seulement 1 à 3 acides aminés existant entre l'homme et le tunicier, suggérant qu'il s'est exercé une pression évolutive considérable afin de conserver le PACAP depuis l'instant où la ligne évolutive des prochordés et de l'homme s'est séparée il y a environ 700 millions d'années. Malgré cette extrême conservation de la région biologiquement active du PACAP au cours de la phylogenèse, le rôle physiologique précis du PACAP demeure encore aujourd'hui mal connu (Skøtt, 2003).

A. Distribution du PACAP dans le système nerveux autonome

Bien que le PACAP ait été isolé originalement dans la glande pituitaire (Miyata *et al.*, 1989), on le retrouve maintenant de façon omniprésente dans les systèmes nerveux central et périphérique. Dans la majorité des tissus étudiés, le PACAP-38 est la forme prédominante du PACAP, le rapport PACAP-38/PACAP-27 pouvant varier d'un organe à l'autre (Arimura *et al.*, 1991). Cette différence dans la proportion des deux peptides dans les divers tissus peut être attribuée à la présence d'un assortiment différent de l'enzyme prohormone-convertase. En effet, on a identifié à ce jour six isoformes de cette endopeptidase chez les mammifères (Seidah *et al.*, 1998).

Dans le système nerveux périphérique, la présence du PACAP a été démontrée dans les neurones des ganglions cervicaux, spinaux, trigéminaux, cardiaques ainsi que dans les neurones des ganglions parasympathiques comme les ganglions otiques et sphéno-palatins (Vaudry *et al.*, 2000). On retrouve également le PACAP dans plusieurs glandes endocrines, en particulier dans la parathyroïde, les gonades, le pancréas endocrine et les glandes surrénales (Vaudry *et al.*, 2000). Des quantités importantes de PACAP ont aussi été détectées dans la plupart des régions du tractus gastro-intestinal (Vaudry *et al.*, 2000). Des corps cellulaires exprimant le PACAP ont été observés dans les ganglions myentériques à travers le tractus gastro-intestinal, et l'existence de neurones intrinsèques a aussi été confirmée (Shen *et al.*, 1992; Hannibal *et al.*, 1998). De nombreuses fibres nerveuses contenant le PACAP ont été signalées le long des fibres musculaires circulaires et dans les couches de muscles lisses longitudinaux de l'œsophage (Uddman *et al.*, 1991a; Köves *et al.*, 1993; Olsson & Holmgren, 1994). Le PACAP a aussi été localisé dans diverses glandes exocrines du canal alimentaire, par exemple dans les glandes

salivaires (glandes parotides et submandibulaires), le foie, et le pancréas exocrine (Arimura *et al.*, 1991; Fridolf *et al.*, 1992; Moller *et al.*, 1993; Luts & Sundler, 1994). Dans les voies respiratoires, des fibres nerveuses contenant du PACAP innervent des amas de muscles lisses, des vaisseaux sanguins situés dans la trachée ainsi que de petites bronchioles dans les poumons (Cardell *et al.*, 1991; Uddman *et al.*, 1991b; Hausser-Kronberger *et al.*, 1992; Shigyo *et al.*, 1998). Enfin, le PACAP est aussi présent dans le système immunitaire au niveau des tissus lymphoïdes (Gaytan *et al.*, 1994). Notons que dans plusieurs organes périphériques, le PACAP est co-localisé avec le VIP. Ainsi, les deux peptides coexistent dans le système digestif au niveau de l'œsophage, de la muqueuse gastrique et du tractus gastro-intestinal (Uddman *et al.*, 1991b; Sundler *et al.*, 1992). Les deux peptides sont également co-localisés dans diverses structures telles que les vaisseaux sanguins cérébraux, les voies respiratoires et les glandes parathyroïdes (Jansen-Olensen *et al.*, 1994; Uddman *et al.*, 1991b; Luts & Sundler, 1994).

Il apparaît donc que le PACAP est en fait largement distribué dans l'ensemble de l'organisme, tant au niveau du système nerveux central que périphérique. L'existence d'une riche innervation PACAPergique dans les tissus musculaires lisses suggère que le PACAP agit sur la motricité vasculaire, respiratoire et digestive. La présence de nombreuses fibres exprimant le PACAP dans la plupart des glandes endocrines indique que le PACAP pourrait également participer au contrôle neuroendocrinien de diverses sécrétions hormonales.

B. Biosynthèse, emmagasinage, libération et dégradation du PACAP

La synthèse des neuropeptides, dont celle du PACAP, est un processus complexe et différent de celui des neurotransmetteurs classiques. La majorité des neuropeptides sont compris initialement dans un large peptide précurseur inactif qui, suivant sa synthèse dans le réticulum endoplasmique au niveau du corps cellulaire du neurone, est transféré dans l'appareil de Golgi pour empaquetage, suivi d'un transport centrifuge vers les terminaisons nerveuses et d'une libération par exocytose. Les peptides précurseurs sont entreposés, avec les diverses enzymes de transformation responsables du clivage des peptides bioactifs, dans de grosses vésicules (ou granules) de sécrétion à noyaux denses. La majeure partie des clivages endoprotéolytiques se produisent dans ces vésicules de sécrétions. De plus, des modifications post-traductionnelles enzymatiques importantes du peptide final peut s'y opérer, telles une glycosilation, une amidation C-terminale, une phosphorylation, une acétylation et une sulfatation (Hökfelt *et al.*, 2000). Ainsi, contrairement à la biosynthèse des neurotransmetteurs classiques qui se produit dans la terminaison axonale à cause de la présence des diverses enzymes impliquées dans cette biosynthèse, les neuropeptides sont plutôt synthétisés dans le corps cellulaire. Conséquemment, le taux de réapprovisionnement des réserves de neuropeptides dans la terminaison nerveuse est dépendant de la vitesse du transport axonal et du taux de biosynthèse. Le transport axonal des neuropeptides semble effectivement être l'étape limitante autant au niveau des neurones noradrénergiques que cholinergiques (Lundberg *et al.*, 1981). Ce réapprovisionnement restreint en neuropeptides signifie que leur libération sera plus facilement épuisée (comparée aux neurotransmetteurs classiques) suite à des stimulations répétées ou prolongées (Lundberg, 1996).

En ce qui concerne le PACAP, le gène humain codant pour celui-ci est localisé sur le chromosome 18p11 et est composé de 5 exons (Hosoya *et al.*, 1992). La traduction du gène donne naissance à un peptide précurseur de 176 acides aminés, le pré-proPACAP, qui comprend un peptide signal de 24 acides aminés ainsi que 7 sites de clivage pour les PC. Suite au retrait du peptide signal sur le pré-proPACAP au niveau du réticulum endoplasmique, le proPACAP est sujet à une intense activité enzymatique par les PC afin de générer les formes mature de PACAP-38 et PACAP-27. Le PACAP-38 correspond au fragment [131-169] du pré-proPACAP et résulte du clivage d'un doublet basique Lys¹²⁹-Arg¹³⁰ à son extrémité N-terminale et Arg¹⁷⁰-Arg¹⁷¹ à l'extrémité C-terminale; le résidu Gly¹⁶⁹ permet l'amidation de la lysine C-terminale. Finalement, le PACAP-38 peut être clivé au niveau d'une séquence Gly¹⁵⁸-Lys¹⁵⁹-Arg¹⁶⁰, donnant naissance au PACAP-27, amidé sur la leucine C-terminale (Vaudry *et al.*, 2000).

Il existe présentement très peu d'information sur les mécanismes menant au relâchement du PACAP par les terminaisons nerveuses. Il fut démontré, du moins au niveau de l'hypothalamus, que le PACAP était localisé dans de grosses vésicules de sécrétion à noyaux denses contenues dans les fibres nerveuses (Kimura *et al.*, 1994). Conséquemment, le PACAP ne peut être libéré que lors de l'activation des ces grosses vésicules de sécrétions. Il est bien connu que le signal entraînant l'exocytose de ces grosses vésicules de sécrétion est différent de celui pour les vésicules, plus petites, contenant les neurotransmetteurs classiques. Dans le système nerveux périphérique et central, les potentiels d'actions individuels opérant à de basses fréquences ne provoquent pas une libération de neuropeptides (Hökfelt, 1991). Le principe de libération fréquence/dépendance des neuropeptides est important car il peut être prédit que durant une activité nerveuse normale, ou basale, les neuropeptides ne sont probablement pas

libérés. Cette différence réside probablement dans une sensibilité différentielle au Ca^{2+} , selon laquelle la libération des neuropeptides est déclenchée par l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} dans l'ensemble du cytoplasme, alors que la sécrétion des neurotransmetteurs classiques contenus dans les petites vésicules nécessite plutôt une élévation locale telle que produite à proximité des canaux calciques, par conséquent près des zones actives de la synapse (Verhage *et al.*, 1991). Cette particularité peut expliquer pourquoi, dans plusieurs cas, une libération substantielle des neuropeptides survient essentiellement à des fréquences élevées de stimulation, bien que ce ne soit pas une règle générale (Lundberg *et al.*, 1994). Des évidences morphologiques indiquent aussi que les neuropeptides entreposés dans les dites grosses vésicules de sécrétion peuvent être relâchés dans l'espace extrasynaptique, permettant ainsi aux neuropeptides de diffuser sur une plus grande étendue afin d'exercer leurs effets de longue durée (Hökfelt *et al.*, 2000).

Une fois libéré, le PACAP est probablement scindé par une endopeptidase non spécifique localisée près du site de libération ou dans le plasma. Notons que la dégradation du VIP s'effectue majoritairement par l'endopeptidase neutre EC 3.4.24.11 (NEP) présente en grande quantité dans le système respiratoire, système nerveux central, et les reins (Gourlet *et al.*, 1997). Étant donné le haut degré d'homologie partagé entre le VIP et le PACAP, il est possible que la NEP soit impliquée à un quelconque niveau dans la dégradation du PACAP. Les concentrations plasmatiques circulantes du PACAP sont, comme c'est le cas pour d'autres neuropeptides, très basses et probablement inférieures à 10 pmol/L (Filipsson *et al.*, 1997). De plus, la forte liaison du PACAP-38 circulant (mais non le PACAP-27) à la ceruloplasmine semble nuire à sa détection de façon précise (Tams *et al.*, 1999). Par conséquent, jusqu'à ce que cet obstacle technique ne

soit surmonté, l'importance du PACAP circulant demeure inconnue. Néanmoins, la demi-vie plasmatique du PACAP-27 appliqué de façon exogène dans la circulation a été estimée à un temps inférieur à 1 min (Filipsson *et al.*, 1997), suggérant un système de dégradation avide et rapide pour le PACAP circulant, ce qui peut être prévisible pour un neuropeptide actif localement.

C. Récepteurs du PACAP

Deux types de sites de liaisons pour le PACAP ont été caractérisés sur les bases de leurs affinités relatives au PACAP ou au VIP. Les sites de liaisons de type I démontrent une haute affinité pour le PACAP ($K_d \sim 0,5$ nM) avec une affinité beaucoup plus faible pour le VIP ($K_d \sim 500$ nM), alors que les types II possèdent une affinité équivalente au PACAP et au VIP ($K_d \sim 1$ nM). Trois sous-types de récepteurs au PACAP/VIP ont été clonés à ce jour et sont nommés PAC₁, VPAC₁ et VPAC₂ (Harmar *et al.*, 1998). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Plusieurs mécanismes de signalisations ont été identifiés jusqu'à maintenant, et ceux-ci comprennent notamment l'activation de l'adénylcyclase, la PLC, et le Ca²⁺ (Spengler *et al.*, 1993; Pisegna & Wank, 1993). Toutefois, il a été démontré que divers ligands étaient efficaces à des degrés variables à activer ces voies de signalisations en fonction du récepteur activé. Le récepteur VPAC₁ semble activer la voie de l'adénylcyclase et de la PLC, alors que l'activation du récepteur VPAC₂ conduit essentiellement à l'activation de l'adénylcyclase (Vaudry *et al.*, 2000). L'activation du récepteur PAC₁ a révélé une induction des mécanismes de signalisations ci-haut mentionnés à divers degrés. Ceci peut s'expliquer par la découverte, chez le rat, d'un épissage alternatif de

l'ARNm du récepteur PAC₁, générant six isoformes qui présentent un couplage différentiel aux systèmes de signalisations (Arimura, 1998). Six des variantes du récepteur sont générées par un épissage alternatif de l'exon codant la troisième boucle intracellulaire (Spengler *et al.*, 1993), domaine impliqué dans les interactions avec les protéine G (Okamoto *et al.*, 1991). Deux différentes « cassettes », ou insertions, de 28 acides aminés nommée hip et hop1 ou de 27 acides aminés appelée hop2 (se distinguant de hop1 par la délétion d'une sérine), sont insérées singulièrement, ensembles (générant cinq variantes différentes), ou simplement absentes (la variante courte ou *short*, PAC_{1-s}). De plus, deux autres variantes **peuvent être** générées par la délétion d'un résidu de 21 acides aminés dans le domaine extracellulaire N-terminal du récepteur (la forme très courte ou *very short*, PAC_{1-vs}) ou par la délétion et la substitution de deux acides aminés au niveau du quatrième domaine transmembranaire (la variante PAC_{1-TM4}) (Vaudry *et al.*, 2000). Contrairement aux autres variantes d'épissage, le récepteur PAC_{1-TM4} n'est pas couplé à l'adénylcyclase ni à la PLC, mais augmente les concentrations intracellulaires de Ca²⁺ en activant directement l'ouverture des canaux calciques membranaires sensibles au voltage de type L (Chatterjee *et al.*, 1996). À l'opposé, aucune variante d'épissage ne semble exister pour les récepteurs VPAC₁ et VPAC₂.

Pour l'étude de la pharmacologie et de la physiologie des récepteurs du PACAP, divers outils qui consistent en des formes modifiées du PACAP ont été générés. Actuellement, le meilleur effet antagonistique est obtenu avec des analogues du PACAP tronqués en région NH₂-terminale, le PACAP6-38 et le PACAP6-27. Ces fragments peptidiques interagissent avec les récepteurs PAC₁ et VPAC₂, alors que le récepteur VPAC₁ ne démontre aucune affinité pour les formes raccourcies du PACAP (Robberecht *et al.*, 1991; Vandermeers *et al.*, 1992). De façon

intéressante, un agoniste naturel hautement spécifique au récepteur PAC₁ a été isolé à partir d'extraits de glandes salivaires de la mouche de sable, *Lutzomia longipalpis*, un vecteur du protozoaire causant la leishmania (Lerner *et al.*, 1991). Le peptide aide l'insecte à se nourrir de sang en raison de son activité vasodilatatrice. Cet agoniste, le maxadilan, est un peptide de 61 acides aminés ne possédant aucune similitude avec le PACAP dans sa séquence (Moro & Lerner, 1997). Récemment, il a été démontré que le M65, un fragment modifié du maxadilan (avec une délétion des acides aminés 24-41), était un antagoniste spécifique du récepteur PAC₁ sans affecter les récepteurs VPAC₁ et VPAC₂ (Moro *et al.*, 1999).

Tableau IV. Principales caractéristiques pharmacologiques des récepteurs du PACAP.

Sites de liaison	Sous-type de récepteurs	Agonistes	Antagonistes	Variante d'épissage	Mécanismes de signalisations
Type I	PAC ₁	PACAP38 = PACAP27 >> VIP Maxadilan	M65 PACAP6-38 ^a PACAP6-27	S Hop1 Hop2 Hip-Hop	↑ adénylcyclase ↑ formation d'IP ₃ ↑ [Ca ²⁺] _i
				Hip	↑ adénylcyclase ↑ [Ca ²⁺] _i
				V _s	↑ adénylcyclase ↑ formation d'IP ₃ ↑ [Ca ²⁺] _i
				TM4	↑ canaux Ca ²⁺ (type L)
Type II	VPAC ₁	PACAP38 = PACAP27 = VIP > sécrétine	VIP10-28 VIP6-28 [LPAT]VIP	?	↑ [Ca ²⁺] _i
	VPAC ₂	Hélodermine > PACAP38 = PACAP27 = VIP Ro 25-1553 Ro 25-1392	—		↑ [Ca ²⁺] _i

[Ca²⁺]_i: concentration du calcium intracellulaire; IP₃: inositol-1,4,5-triphosphate; ↑: stimulation. *Adapté et actualisé de Vaudry et al. (2002).*

Tableau V. Actions biologiques du PACAP dans les tissus périphériques.

Structures		ActionS biologiques
Système cardiovasculaire	Artères	Vasodilatation
	Cœur	Chronotrope & inotrope positif
Système gastro-intestinal	Œsophage	Relaxation du muscle lisse
	Iléon	Contraction du muscle lisse
	Côlon	Relaxation du muscle lisse
	Vésicule biliaire	Contraction du muscle lisse
Système respiratoire	Trachée	Relaxation du muscle lisse
	Poumon	
Système urogénital	Vessie	Relaxation du muscle lisse
	Prostate	
	Pénis	
	Myomètre	
	Trompe de Fallope	
Médullosurrénales		Stimule la synthèse et la sécrétion des catécholamines
Pancréas	Endocrine	Augmente les sécrétions de glucagon et d'insuline
	Exocrine	Stimule la libération d'amylase, de lipase, de protéines et de bicarbonates
Glandes salivaires		Stimule les sécrétions salivaires
Foie		Stimule la production de glucose (effet indirect médié par la sécrétion de glucagon et/ou les catécholamines ?)
Système immunitaire		Inhibe la production d'interleukine-10 par les lymphocytes T Stimule la libération d'histamine par les mastocytes

Adapté et actualisé de Vaudry et al. (2002).

D. Effets du PACAP sur la médullosurrénale

Le PACAP s'est révélé comme étant l'un des plus puissants peptides à induire la sécrétion des catécholamines surrénaliennes autant dans des conditions *in vitro* (Watanabe *et al.*, 1992; Isobe *et al.*, 1993) que *in vivo* (Watanabe *et al.*, 1995). Le mécanisme précis par lequel le PACAP augmente la sécrétion des catécholamines surrénaliennes n'est pas encore complètement élucidé. Il est établi que l'effet sécréteur en réponse à une application de PACAP exogène est régulée par le récepteur spécifique au PACAP, le récepteur PAC₁, présent dans la médullosurrénale (Shivers *et al.*, 1991; Moller & Sundler, 1996). Une augmentation des concentrations intracellulaires de Ca²⁺ libre est essentielle, de façon générale, pour la sécrétion des catécholamines surrénaliennes par divers agents sécréteurs. Dans des cellules chromaffines isolées du bœuf, il a été démontré que le PACAP augmente les concentrations de Ca²⁺ dans les cellules chromaffines; une élévation initiale brusque suivie d'une hausse soutenue (Tanaka *et al.*, 1996). Il a été rapporté que l'incubation de cellules chromaffines de porcs (Isobe *et al.*, 1993) et de rats (Przywara *et al.*, 1996) dans un milieu de culture dépourvu de Ca²⁺ inhibait l'élévation soutenue des concentrations intracellulaires de Ca²⁺ ainsi que la sécrétion des catécholamines en réponse au PACAP. Cependant, l'élévation initiale rapide du Ca²⁺ intracellulaire produite par le PACAP est demeurée intacte (Isobe *et al.*, 1993; Przywara *et al.*, 1996). Ainsi, cette élévation initiale brusque du Ca²⁺ intracellulaire traduit essentiellement une mobilisation rapide du Ca²⁺ à partir de réserves intracellulaires, alors que l'élévation soutenue serait due à un influx de Ca²⁺ dans la cellule chromaffine, lequel est essentiel à la sécrétion des catécholamines en réponse au PACAP. Il a été démontré que les canaux calciques sensibles au voltage de type L participaient dans la sécrétion des catécholamines induite par le PACAP *in vitro* chez le porc (Isobe *et al.*, 1993), le bœuf (O'Farrel & Marley, 1997), le rat (Fukushima *et al.*, 2001b) ainsi que dans la

glande surrénale du chien *in vivo* (Geng *et al.*, 1997). En revanche, des évidences expérimentales ont montré que la phase initiale d'élévation du Ca^{2+} intracellulaire induite par le PACAP proviendrait de la mobilisation du Ca^{2+} à partir de réserves intracellulaires sensibles à la ryanodine et à la caféine (Houchi *et al.*, 1995, Tanaka & Nishizuka, 1994). Dans des cellules chromaffines humaines fœtales, l'augmentation des concentrations intracellulaires du Ca^{2+} suite à l'application du PACAP est d'autre part exclusivement médiée par la mobilisation du Ca^{2+} des réserves sensibles à la ryanodine et à la caféine (Payett *et al.*, 2003). Cette voie unique de mobilisation du Ca^{2+} est médiée par l'activation du récepteur PAC_1 spécifique au PACAP situé à la surface des cellules chromaffines et de la phosphorylation subséquente du récepteur à la ryanodine par la PKA suite à la formation d'AMP cyclique (Payett *et al.*, 2003). Bien que le PACAP soit capable d'augmenter de façon substantielle les niveaux intracellulaires d'AMPc dans des cellules chromaffines du rat, l'addition seule de forskoline (un activateur de l'adényl cyclase) dans le milieu d'incubation n'a exercé qu'une faible stimulation sur la sécrétion des catécholamines *in vitro* (Morita *et al.*, 1987). Également, le traitement des cellules chromaffines avec un inhibiteur de l'adényl cyclase n'a pas inhibé la sécrétion des catécholamines induite par le PACAP (Arimura, 1998). Ainsi, il semble qu'une voie de signalisation additionnelle à celle de l'adényl cyclase soit impliquée dans les effets sécréteurs du PACAP. Les effets du PACAP sur la sécrétion des catécholamines sont aussi associés à une augmentation de l'activité et de l'expression génétique d'enzymes importantes dans la biosynthèse des catécholamines, notamment la tyrosine hydroxylase, la dopamine- β -hydroxylase, et de la PNMT (Vaudry *et al.*, 2000). La présence d'un inhibiteur de l'enzyme phosphodiesterase a augmenté davantage la stimulation de l'activité de la tyrosine hydroxylase

induite par le PACAP, suggérant que cette activation est soutenue par une cascade d'événements initiée par l'AMPc (Rius *et al.*, 1994).

La glande surrénale, en particulier la médullosurrénale, est l'un des organes périphériques où l'on retrouve les plus hautes concentrations de PACAP, comparables à celles retrouvées au niveau du cerveau (Arimura *et al.*, 1991). Toutefois, il semble y avoir des différences considérables selon l'espèce étudiée; la glande surrénale de la souris, du rat et du hamster contient des niveaux élevés de PACAP alors que les niveaux sont plus bas dans la glande de porc et du bœuf (Tabarin *et al.*, 1994). Il a été montré, par immunohistochimie, que le PACAP était confiné dans la médullosurrénale et qu'il ne co-existait pas avec le VIP au niveau de cette glande (Tabarin *et al.*, 1994). Les cellules chromaffines sont investies d'un réseau dense de fibres nerveuses pré-ganglionnaires contenant du PACAP (Dun *et al.*, 1995; Tornøe *et al.*, 2000; Hamelink *et al.*, 2002). Dans la médullosurrénale de grenouille, un marquage par microscopie électronique a révélé que le PACAP était emmagasiné dans de grosses vésicules denses contenues dans les terminaisons nerveuses en contact étroit avec les cellules chromaffines (Yon *et al.*, 1994). Le sectionnement bilatéral des nerfs splanchniques chez le rat a démontré une baisse importante du contenu en PACAP dans la glande surrénale (Ginda *et al.*, 1999), appuyant le fait que le nerf splanchnique contribue à la majeure partie des fibres nerveuses PACAPergiques. Récemment, il a été montré dans des conditions *in vitro* que le PACAP était libéré au niveau de la glande surrénale suite à une stimulation électrique du nerf splanchnique (Tornøe *et al.*, 2000). De façon similaire, dans un modèle de glande surrénale isolée et perfusée de rat, la sécrétion de catécholamines induite par une stimulation électrique transmurale a été atténuée par l'ajout d'un antagoniste du récepteur PAC₁, le PACAP6-38 (Fukushima *et al.*,

2001). Prises dans leur ensemble, ces évidences neuroanatomiques, pharmacologiques et physiologiques obtenues *in vitro* suggèrent un rôle important pour le PACAP en tant que neurotransmetteur peptidique co-libéré avec l'acétylcholine au niveau de la médullosurrénale.

IV. PROBLÉMATIQUES

Il fut rapporté que l'administration de PACAP augmentait la libération de neurotransmetteurs parasympathiques cardiaques (i.e. l'acétylcholine) dans des modèles *in vitro* (Yonezawa *et al.*, 1996) et *in vivo* (Runcie *et al.*, 1995; Hirose *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont aussi été rapportés dans l'iléon de cobaye *in vitro*, où il fut démontré que le PACAP augmentait la libération d'acétylcholine (Katsoulis *et al.*, 1993). Ces observations obtenues dans des conditions *in vitro* et *in vivo* suggèrent fortement que le PACAP agit en tant que neuromodulateur interagissant avec certains mécanismes impliqués dans la neurotransmission cholinergique dans le système nerveux autonome périphérique. Dans la glande surrénale cependant, il n'existe aucune information concernant un effet potentiel local du PACAP sur les terminaisons nerveuses splanchniques afin d'augmenter la libération d'acétylcholine neuronale et par conséquent la sécrétion des catécholamine qui en découle. Ainsi, une action neuromodulatrice soutenue par le PACAP sur la sécrétion des catécholamines surrénaliennes demeure essentiellement inconnue dans des conditions *in vivo*.

Par ailleurs, bien que la caractérisation pharmacologique du récepteur PAC₁ et des récepteurs VPAC dans plusieurs tissus *in vitro* soit bien documentée, peu de données sont disponibles concernant l'implication fonctionnelle de même que l'importance relative de ces récepteurs dans la réponse sécrétrice induite par le PACAP dans la médullosurrénale dans des conditions *in vivo*. D'autre part, le VIP qui partage une homologie élevée avec le PACAP, induit aussi une sécrétion des catécholamines surrénaliennes dans diverses conditions expérimentales (Malhotra *et al.*, 1987; Yamaguchi, 1993). Celui-ci est également libéré dans l'effluent veineux

surrénalien suivant une stimulation du nerf splanchnique (Gaspo *et al.*, 1995). Curieusement, en dépit de ces observations supportant un rôle pour le VIP en tant que neurotransmetteur peptidique dans la médullosurrénale, les récepteurs impliqués dans son effet sécréteur demeurent à ce jour non-caractérisés.

Quelques études réalisées dans des conditions *in vitro* chez le rat (Wakade *et al.*, 1992) et chez le porc (Tornøe *et al.*, 2000) ont démontré une libération du PACAP endogène suite à une stimulation nerveuse de la glande surrénale. De plus, Fukushima *et al.* (2001a) a observé une diminution de la sécrétion des catécholamines induite par une stimulation électrique de la glande surrénale en présence d'un antagoniste du PACAP. Ces observations antérieures dans des conditions *in vitro* suggèrent que le PACAP serait un neurotransmetteur et un neuromodulateur peptidique impliqué dans le contrôle des fonctions sécrétrices de la médullosurrénale lors d'une véritable activation du système sympatho-surrénalien *in vivo*. Toutefois, une telle implication fonctionnelle du PACAP endogène dans le système sympatho-surrénalien au cours de situations physiologiques et/ou pathophysiologiques demeure essentiellement hypothétique.

V. OBJECTIFS DE LA PRÉSENTE ÉTUDE

Le présent ouvrage s'inscrit dans la continuité des travaux entrepris sur le système nerveux autonome dans notre laboratoire et s'inspire du modèle expérimental développé chez le chien anesthésié au cours des dernières années par Yamaguchi (1993).

Le travail expérimental de la présente étude se divise en trois parties bien distinctes :

Dans la première partie, nous avons proposé de vérifier si le PACAP pouvait influencer localement la sécrétion des catécholamines par la médullosurrénale *in vivo* selon les effets neuromodulateurs répertoriés précédemment dans le cœur *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'au niveau de l'iléon *in vitro*. À cette fin, nous allons examiner si la présence du PACAP administré localement dans la glande surrénale peut moduler la sécrétion des catécholamines provoquée soit par une stimulation directe du nerf splanchnique ou soit par une infusion locale d'acétylcholine chez le chien anesthésié. Cette approche expérimentale devrait nous permettre de mettre en évidence l'existence d'une synergie entre l'activation cholinergique et le PACAP sur la sécrétion des catécholamines surrénaliennes, reflétant une activité modulatrice du PACAP dans cette sécrétion.

Dans la deuxième série de travaux, nous avons proposé de mettre en évidence l'implication fonctionnelle du récepteur PAC₁ dans la sécrétion des catécholamines surrénaliennes induite par le PACAP dans des conditions *in vivo*. Nous avons également entrepris de mettre en évidence l'importance relative des récepteurs PAC₁ et VPAC (VPAC₁ et VPAC₂) dans la sécrétion des catécholamines surrénaliennes induite soit par le PACAP ou soit par le VIP dans

des conditions *in vivo*. Pour ce faire, le PACAP, le VIP et leurs antagonistes respectifs furent administrés localement et de façon successive dans la glande surrénale chez le chien anesthésié.

Enfin, la troisième partie de ce travail vise principalement à déterminer si le PACAP endogène contenu dans les terminaisons des fibres nerveuses splanchniques peut être libéré de façon simultanée avec les catécholamines dans l'effluent veineux surrénalien lors d'une stimulation directe du nerf splanchnique chez le chien *in vivo*. Cette étude a aussi pour objectif d'établir les effets d'une stimulation électrique ininterrompue du nerf splanchnique avec des fréquences croissantes sur la libération des catécholamines et du PACAP endogène dans la glande surrénale. D'autre part, nous avons entrepris d'évaluer si la présence du PACAP administré localement pouvait effectivement moduler la sécrétion des catécholamines surrénaliennes en réponse à une activation réflexe du système sympatho-surrénalien chez le chien anesthésié.

MÉTHODOLOGIE

I. PRÉPARATION DE L'ANIMAL

La présente section décrit le modèle expérimentale ainsi que les diverses procédures chirurgicales effectuées sur l'animal. Il est important de noter que certaines de ces procédures ne concernent qu'un nombre restreint de groupes expérimentaux. Ainsi, le lecteur est prié de se référer à la section « méthode » au début de chaque nouvelle étude afin de déterminer lesquelles furent appliquées. Nos travaux de recherches ont été réalisés chez des chiens adultes mâles métissés et dont la masse corporelle variait entre 20 et 30 kg. Les chiens étaient mis à jeun au moins 12 heures avant le début des expériences mais avaient accès à l'eau *ad libitum*. L'anesthésie générale a été induite par une injection intraveineuse d'une dose de penthobarbital sodique (30 mg/kg i.v. bolus suivi de 4 mg/kg i.v. bolus au besoin). La respiration fut assurée au moyen d'une canule endotrachéale reliée à une pompe Harvard (modèle 607) permettant ainsi de maintenir une ventilation artificielle (20 cm³/kg). La température corporelle de l'animal, mesurée par voie rectale, était maintenue à 37.5 ± 0.5°C durant la totalité de la période expérimentale grâce à un coussin chauffant branché à un régulateur thermique (modèle 74, Yellow Spring Instruments, Yellow Springs, Ohio). Les artères fémorales droite et gauche ont été canulées afin de permettre la mesure de la pression sanguine dans l'aorte et le prélèvement d'échantillons de sang artériel, respectivement.

A. Injection locale des médicaments à la glande surrénale gauche

À la suite d'une laparotomie médiane, une courte incision dans le flanc gauche est pratiquée pour permettre l'accès à la glande surrénale gauche. L'artère lombo-surrénale est

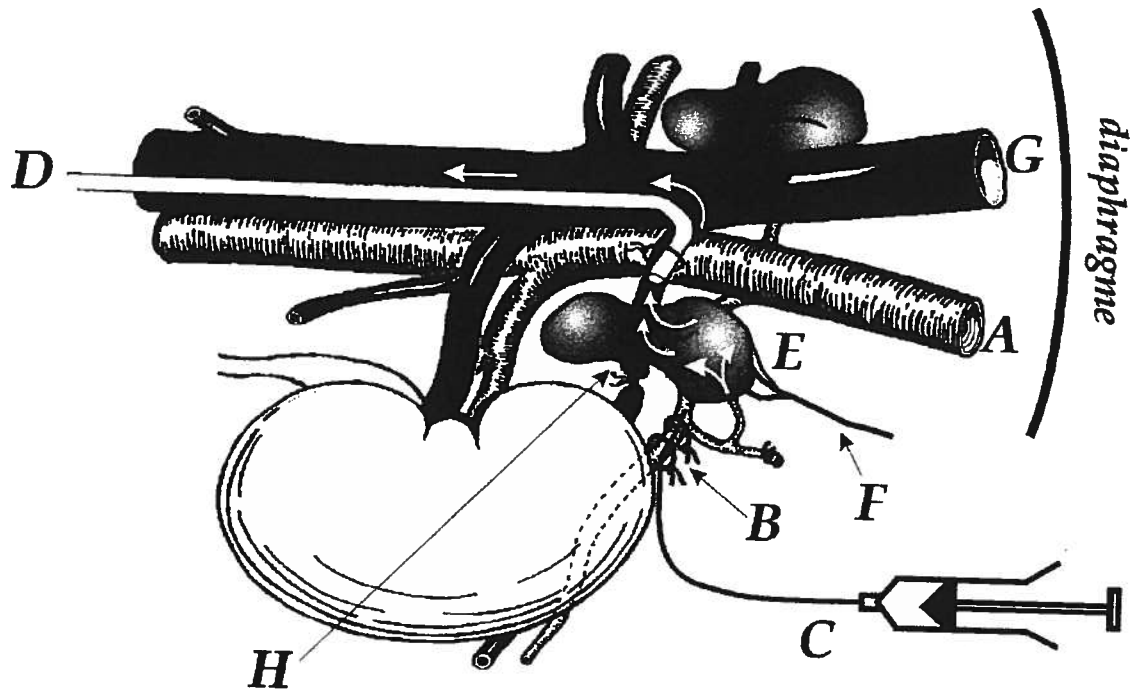
par la suite dégagée de tous tissus environnants et canulée de façon rétrograde, c'est-à-dire de l'extrémité périphérique en direction de la glande et de l'aorte. Ce cathéter (PE-90) est avancé jusqu'à ce que le bout de celui-ci atteigne un endroit près de la jonction entre l'artère lombo-surrénale et l'aorte (Fig. 14, page 93). Les branches visibles prenant leur origine au niveau de l'artère lombo-surrénale sont ensuite ligaturées de façon à prévenir toute diffusion non-désirée du médicament dans la circulation systémique. Pour s'assurer de l'emplacement adéquat du cathéter, une solution saline est délicatement passée dans ce cathéter. Cette procédure induisait généralement un blanchiment transitoire (décoloration due à la solution saline) de la surface antérieure de la glande dans une région irriguée par plusieurs petits vaisseaux alimentant celle-ci (Fig. 14, page 93). L'infusion adéquate des médicaments est ainsi visuellement confirmée. Le volume de ce cathéter a été fixé à 0,5 mL.

B. Dénervation chirurgicale de la glande surrénale gauche.

Cette procédure chirurgicale fut appliquée où le protocole nécessitait l'élimination de l'influence nerveuse sur le contrôle des fonctions sécrétrices de la glande surrénale. La dénervation chirurgicale consistait en une ligature double du nerf splanchnique, lequel était ensuite sectionné du côté rapproché de la glande. Par la suite, tous les autres nerfs dérivant des ganglions sympathiques paravertébraux lombaires, coeliaques et mésentériques supérieurs se dirigeant vers la glande surrénale gauche ont été ligaturés en double puis sectionnés à environ 1,5 cm de la glande. Une attention particulière fut portée à préserver intact un maximum de vaisseaux sanguins en laissant les tissus caudaux connecteurs inaltérés de façon à prévenir des dommages ischémiques potentiels à la glande surrénale gauche durant la

procédure de dénervation chirurgicale. Cette procédure de dénervation de la glande surrénale gauche a été validée antérieurement dans notre laboratoire (Yamaguchi *et al.*, 1991).

Lorsque le protocole nécessitait une stimulation électrique directe du nerf splanchnique, nous avons pratiqué une dénervation chirurgicale de la glande surrénale gauche similaire à celle décrite précédemment à l'exception des procédures s'appliquant à la dissection du nerf splanchnique gauche. Ainsi, celui-ci fut d'abord séparé de tous tissus environnants, ligaturé en double à environ 1,5 cm de la glande mais sans toutefois être sanctionné. Une application d'huile minérale suffit pour le protéger de l'assèchement. La stimulation électrique du nerf splanchnique a été appliquée à l'aide d'une électrode bipolaire en platine placée sous le nerf, avec des impulsions rectangulaires de voltage supramaximal (12 V) à l'aide d'un stimulateur électronique (modèle SEN-3301, Nihon Kohden, Tokyo, Japon). Les divers paramètres de stimulation, le cas échéant, sont décrits de façon plus spécifique au début de chaque nouvelle étude dans la section *méthode*.



- A Aorte
- B Artère lombo-surrénale gauche
- C Cathéter pour l'infusion intra-artériel des médicaments
- D Cathéter pour les prélèvements veineux surrenaliens
- E Glande surrénale gauche
- F Nerf splanchnique gauche
- G Veine cave inférieure
- H Veine surrénale gauche

Figure 14. Diagramme de la région de la glande surrénale montrant la canulation de la veine surrénalienne et de l'artère lombo-surrénale. Un cathéter utilisé pour l'infusion locale des médicaments (C) dans la glande surrénale gauche (E) est inséré dans l'artère lombo-surrénale gauche (B). Une région de la glande irriguée par l'artère lombo-surrénale est indiquée par des flèches blanches. Le sang veineux surrenalien est recueilli à l'aide d'un cathéter (D) inséré via la veine fémorale gauche et fixé à la jonction de la veine cave inférieure (G) et de la veine surrénale gauche (H).

C. Circuit veineux surrénalien extra-corporel

Un cathéter en polyéthylène (PE-240), dont une extrémité était spécialement courbée pour faciliter la canulation de la veine surrénale, a été inséré dans la veine fémorale gauche. Une fois inséré, ce cathéter était fixé à la jonction de la veine cave inférieure et de la veine surrénale gauche, prévenant ainsi une dilution du sang veineux surrénalien avec le sang de la veine cave. Par la suite, la veine surrénale fut ligaturée en amont de la glande de manière à n'obtenir que le sang veineux surrénalien. Le sang veineux de la glande était par la suite drainé dans un petit réservoir dont le niveau est maintenu constant à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex, modèle 7016-52, Cole-Parmer Instruments, Chicago, Illinois). Celle-ci servait à retourner le sang veineux surrénalien à l'animal via un cathéter inséré dans la veine fémorale droite. Le volume total de sang dans la circulation extra-corporelle est minimisé (15-16 mL) afin que le circuit soit complété en moins de 1 min (Fig. 15, page 95). Lorsque les procédures chirurgicales furent terminées, de l'héparine sodique était administrée par voie intra-veineuse (200 U/kg suivit par 100 U/kg à chaque heure par la suite) afin de prévenir la formation de caillots sanguins lors de l'instauration de la circulation extra corporelle. Le chien était ensuite soumis à une période de stabilisation d'environ 60 min.

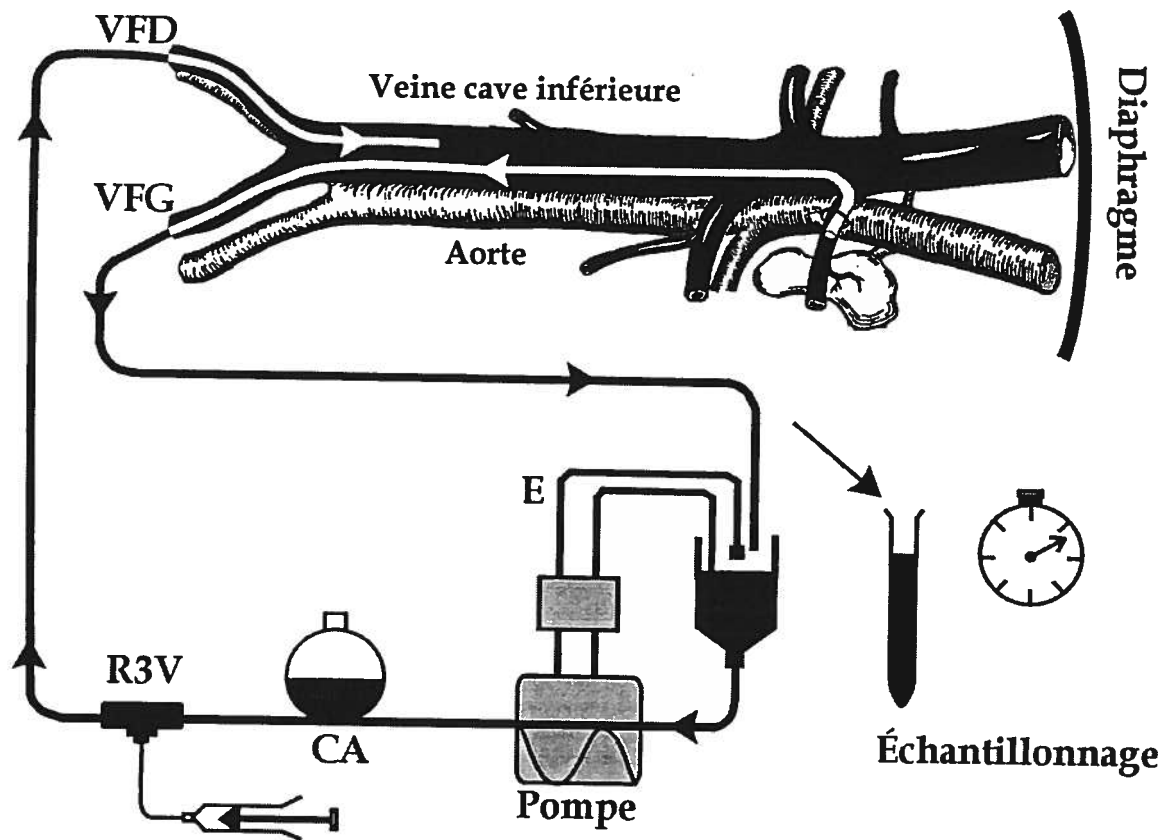


Figure 15. Diagramme de l'aménagement expérimental montrant la circulation extra-corporelle du sang veineux surrénalien. Les flèches indiquent la direction du débit sanguin. VFD: veine fémorale droite; VFG: veine fémorale gauche; E: électrodes; CA: capteur d'air; R3V: robinet 3-voies.

D. Détermination des paramètres biochimiques

1. Dosage des catécholamines plasmatiques

Le dosage des catécholamines plasmatiques a été effectué à partir du sang aortique et veineux surrénalien ayant été prélevé simultanément dans des tubes gradués gardés sur la glace. Le débit sanguin veineux surrénalien a été déterminé par gravimétrie à chaque échantillonnage. Un aliquot de sang (1,5 mL) était par la suite transféré dans un tube à centrifugation en polyéthylène contenant 30 μ L d'une solution préservative (Tableau VI, page 98) pour minimiser la dégradation des catécholamines. Les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 5 min, à 7 000 g (Centrifugeuse Eppendorf, modèle 5402, Hambourg, Allemagne), et le plasma est décanté puis congelé (-80°C) jusqu'au moment de l'analyse.

La première étape du dosage consiste à extraire les catécholamines du plasma selon la méthode décrite par Remie et Zaagsma (1986), et adaptée par Yamaguchi (1993). 200 μ L de plasma sont d'abord transférés dans un tube de verre de 15 mL, dans lequel nous avons ajouté 20 μ L d'une solution aqueuse composée de dihydroxybenzylamine (DHBA; sert à titre de standard interne) à une concentration de 1 ng/mL pour le plasma provenant du sang aortique (8 ng/mL dans le cas du plasma provenant du sang veineux surrénalien), préparée dans de l'acide acétique 0,2 M, et 1 mL d'une solution tampon de $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ à 2 M (Tableau VII, page 99). Suivant l'addition de 5 mL d'une solution de *n*-heptane composée de 1% de *n*-octanol et 0,25% de bromure de tétraoctylammonium, les deux phases sont ensuite mélangées vigoureusement durant 5 min à l'aide d'un mélangeur rotatif (Reax 2, Caframo, Warton, Ontario), puis centrifugées à une vitesse de 2500 révolutions/min (accélération gravitationnelle: 496 g). Par la suite, 4 mL sont transférés de la phase organique dans un autre

tube en verre, dans lequel on a ajouté 2 mL de *n*-octanol et 200 μ L d'acide acétique 0,08 M (600 μ L dans le cas du plasma provenant du sang veineux surrénalien). Les deux phases sont de nouveau mélangées et centrifugées avec les mêmes paramètres énumérés précédemment. Enfin, la phase organique est jetée, et la phase aqueuse contenant les catécholamines est transférée dans des microtubes ambrés pour système à chromatographie liquide à haute pression (CLHP).

La quantification des catécholamines s'effectue à l'aide d'un système de CLHP (Gilson, Villiers-le-Bel, France), lequel est composé d'une pompe à débit constant (Gilson 307) avec une tête de pompe (Gilson 10WSC, un injecteur automatisé (Gilson 231-401), et d'un détecteur électrochimique (Coulochem II, modèle 5200, ESA, Bedford, Massachusetts). Ce dernier consiste en une série de trois électrodes (cellules analytiques et de conditionnement, ESA, modèle 5011 et 5021, respectivement) fonctionnant en mode d'oxydation-réduction. La colonne analytique est fabriquée en acier inoxydable (Supelcosil LC-18-DB, 7,5 cm de longueur \times 4,6 mm de diamètre interne), avec sa surface interne recouverte d'une couche de 3 μ m d'ODS (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie). L'efficacité de la colonne analytique est accrue par l'addition d'une pré-colonne C₁₈ (10 mm \times 4,6 mm diamètre interne, Alltech, Deerfield, Illinois). La phase mobile est constituée d'un mélange (86:14) d'une *solution A* (Tableau VIII, page 99) et d'acétonitrile filtrée (diamètre des pores du filtre: 0,45 μ m) et dégazée par saturation avec de l'hélium. La colonne est stabilisée avec la phase mobile en circuit fermé à compter de la veille du dosage. Les profils d'élution sont intégrés par un micro-ordinateur branché avec le CLHP grâce à un programme de contrôle (Gilson 712).

Les extraits plasmatiques sont analysés suite à l'injection de 20 μL de la phase aqueuse dans la colonne analytique via l'injecteur automatisé. Le monitoring de l'effluent s'effectue aux potentiels électriques suivant : +300 mV (oxydation) pour la première électrode, +60 mV (oxydation) pour la seconde électrode, et -300 mV (réduction) pour la dernière électrode qui permet de quantifier la concentration des catécholamines dans l'extrait plasmatique (Musso *et al.*, 1990). L'échelle de sensibilité est optimale à 10 nA lors du dosage des catécholamines aortiques (50 nA dans le cas des catécholamines surrenaliennes).

Tableau VI. Composition de la solution préservative.

Composé	Concentration	Quantité
EGTA	0,025 mM	950 mg
Glutathion	0,016 mM	600 mg
H ₂ O		compléter à 10 mL

Ajuster le pH à 6,5 avec une solution de NaOH 10 N. EGTA, acide éthylènebis (oxyéthylènenitrilo) tétraacétique.

Tableau VII. Préparation de la solution tampon $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ à 2 M.

Composé	Concentration	Quantité
NH_4Cl	2 M	21,4 g
Diphénylborate- éthanolamine	0,1 %	0,2 g
EDTA	0,5 %	1,0 g
H_2O		Compléter à 200 mL
NH_4OH	2 M	26,8 mL
H_2O		Compléter à 100 mL

La solution de NH_4Cl est ajustée à un pH de 8,7 à l'aide de la solution de NH_4OH . L'eau utilisée est de grade CLHP.

Tableau VIII. Composition de la solution A

Composé	Concentration	Quantité
Acétate de sodium	0,10 M	27,22 g
Acide citrique	0,05 M	19,20 g
Acide acétique glacial	0,174 M	20 mL
Octyl sulfate de sodium	0,68%	0,335 g
Méthanol 70 %	9%	200 mL
H_2O (grade CLHP)		Compléter à 2 L

2. Dosage du PACAP plasmatique

Les concentrations plasmatiques du PACAP ont été déterminées par une méthode de radio-immunologie à l'aide d'une trousse commerciale (RIK-8920, Peninsula Laboratories, San Carlos, Californie). La sensibilité de la trousse de radio-immunologie envers le PACAP endogène était d'environ 10 pg/mL (IC_{50} moyenne), étendue sur un écart variant de ~0,7 pg/mL à ~85 pg/mL. Le principe de cette méthode consiste principalement à incuber une concentration connue de PACAP marqué avec un isotope radioactif, l'iode-125 (^{125}I -PACAP), avec une quantité fixe d'anticorps (anticorps de lapin dirigés contre le PACAP) de manière à ce que la quantité de sites de liaison disponibles pour le ^{125}I -PACAP sur les anticorps soient limités. Prenons pour exemple une situation où seulement 50% de la quantité totale de ^{125}I -PACAP est liée par les anticorps. L'ajout subséquent de PACAP non-marqué (échantillons) à ce système provoquera une compétition entre le ^{125}I -PACAP et le PACAP non-marqué pour les sites de liaisons des anticorps, qui eux sont en nombre limité et constant. Ainsi, la quantité de ^{125}I -PACAP liée aux anticorps diminuera à mesure que la concentration de PACAP non-marqués augmentera. L'ajout subséquent d'un deuxième anticorps (anticorps de chèvre dirigés contre l'immunoglobuline G du lapin) fera en sorte qu'il ira se lier au complexe antigène-anticorps (fraction liée). Le tout est précipité par l'ajout de polyéthylène glycol (PEG) et le surnageant (fraction libre) jeté. Finalement, la radioactivité présente dans le précipité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (celui-ci mesure essentiellement les rayons gamma émis par l' ^{125}I), et la concentration déterminée à l'aide d'une courbe étalon préalablement établie avec des échantillons standards. Les concentrations de PACAP sont mesurées en duplicata à partir de 100 μ L de plasma provenant d'échantillons sanguins prélevés de l'aorte et de la surrénale.

RÉSULTATS

PREMIÈRE PARTIE:

Modulation of adrenal catecholamine release

by PACAP in vivo

Stéphane Lamouche, Daniel Martineau, and Nobuharu Yamaguchi

*American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative
and Comparative Physiology*

276: R162-R170, 1999

RÉSUMÉ

Lamouche, Stéphane, Daniel Martineau, and Nobuharu Yamaguchi. Modulation of adrenal catecholamine release by PACAP in vivo. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 276: R162-R170, 1999.—La présente étude avait pour but d'examiner si le polypeptide₁₋₂₇ activant l'adénylcyclase pituitaire (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-(1-27)*; PACAP27) peut moduler la sécrétion des catécholamines (CA) par la glande surrénale induite soit par une stimulation directe du nerf splanchnique (SNS) ou soit par l'administration d'acétylcholine (ACh) exogène chez des chiens anesthésiés. Les concentrations de CA plasmatiques dans le sang aortique et veineux surrénalien ont été déterminées par HPLC-détection électrochimique. Le débit sanguin de la veine lombo-surrénale a été mesuré par gravimétrie. L'infusion locale du PACAP27 (0,5, 5, et 50 ng) dans la glande surrénale gauche par l'artère lombo-surrénale a augmenté significativement la sécrétion basale des CA, atteignant le seuil de signification à la plus haute dose utilisée. L'augmentation de la sécrétion des CA en réponse soit à une SNS (2 Hz) ou soit à une perfusion locale d'ACh (0,5 µg) à la glande surrénale gauche a atteint un niveau similaire à celle obtenue avec 50 ng de PACAP27 seul. En présence de PACAP27 (50 ng), les réponses des CA soit à une SNS ou soit à l'ACh exogène furent amplifiées significativement environ par un facteur de quatre et six, respectivement, par rapport à celles obtenues en réponse à chaque stimulus seul. Toutefois, l'augmentation de la sécrétion des CA en réponse à l'ACh n'a pas différé de celle produite par une SNS. Les résultats indiquent que l'augmentation de la sécrétion des CA, induite soit par une SNS ou soit par une infusion d'ACh, a été amplifié en synergie par le PACAP27. L'étude suggère que cette augmentation de la sécrétion des CA

pourrait résulter de l'activation, médiée par le PACAP, de mécanismes facilitateurs localisés probablement au niveau postsynaptique dans la médullosurrénale du chien *in vivo*, néanmoins on ne peut exclure de façon définitive une contribution de mécanismes présynaptiques dans la présente étude.

SUMMARY

Lamouche, Stéphane, Daniel Martineau, and Nobuharu Yamaguchi. Modulation of adrenal catecholamine release by PACAP *in vivo*. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 276: R162-R170, 1999.—The aim of the present study was to investigate whether pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 1-27 (PACAP27) can modulate the adrenal catecholamine (CA) secretion induced by splanchnic nerve stimulation (SNS) and by exogenous acetylcholine (ACh) in anesthetized dogs. Plasma CA concentrations in adrenal venous and aortic blood were quantified by a high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. Adrenal venous blood flow was measured by gravimetry. Local infusion of PACAP27 (0.5, 5 and 50 ng) to the left adrenal gland via the adrenolumbar artery resulted in an increase in CA output reaching a significant level at the highest dose tested. Either direct SNS (2Hz) or local infusion of ACh (0.5 μ g) to the left adrenal gland produced significant increases in CA output to an extent similar to that obtained with 50 ng of PACAP27 alone. In the presence of PACAP27 (50 ng), CA responses to either SNS or exogenous ACh were significantly potentiated by ~ 4 and ~ 6 fold, respectively, as compared with those obtained in response to each stimulus alone. However, the enhanced CA responses to ACh were not significantly different from those to SNS. The results indicate that

the increase in adrenal CA secretion, induced by either direct SNS or exogenous ACh, is synergistically enhanced by PACAP27. The study suggests that the enhanced CA secretion may result from the activation of PACAP-mediated facilitatory mechanism(s) localized presumably at the postsynaptic level in the canine adrenal medulla in vivo, although the possible involvement of presynaptic mechanisms cannot completely be ruled out in the present study.

INTRODUCTION

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a member of the family of peptides involving vasoactive intestinal polypeptide (VIP), secretin and glucagons. It was first isolated by Miyata et al. in 1989 (13) from ovine hypothalamic tissues on the basis of its ability to stimulate adenylate cyclase. There exist two isoforms composed of 27 and 38 amino acids residues (PACAP27 and PACAP38), both of which are widely distributed in the peripheral and central nervous systems (1). PACAP has a variety of biological activities, including hormone production and secretion in the pituitary gland (6, 13), thyroid gland (2), and pancreas (26). More recently, the presence of PACAP has also been demonstrated in the rat adrenal gland (1, 20), in which the expression of PACAP type I receptor is the most pronounced (14, 19, 20). In cultured porcine (8) and rat (24) adrenal chromaffin cells and rat adrenal gland in vivo (25), PACAP has been shown to increase the basal catecholamine secretion. More recently, we have also demonstrated that, in anesthetized dogs, both PACAP27 and PACAP38 locally administered to the adrenal gland resulted in a dose-dependent increase in the basal catecholamine secretion (5). Furthermore, PACAP immunoreactive nerve fibres ending on chromaffin cells have been identified in the rat adrenal gland (3, 8, 14). PACAP was also shown to be released in response to splanchnic nerve stimulation in isolated, perfused rat adrenal gland (22). These observations suggest that PACAP may play a role of cotransmitter released along with acetylcholine (ACh) during stimulation of the splanchnic nerve. However, the potential interaction of PACAP with the splanchnic nerve activation and the resulting catecholamine secretion in the adrenal gland remains mostly unknown under in vivo conditions. The specific aim of the present study was

to investigate whether the presence of PACAP27 could modulate the adrenal catecholamine secretion induced either by direct electrical stimulation of the splanchnic nerve or by exogenously administered ACh in anesthetized dogs.

METHODS

Preparation of animals. Adults male mongrel dogs, fasted overnight but allowed free access to water, were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/ kg iv, followed by 4 mg/kg as needed). Artificial respiration was maintained through an endotracheal tube with a Harvard pump (model 607, Harvard, South Natick, MA). The rectal temperature was monitored and kept constant at 37.5 ± 0.5 °C by means of a thermoregulator (model 74, Yellow Spring Instrument, OH) connected to a heating pad. Both femoral arteries were cannulated: the right femoral artery was used to measure aortic pressure and the left femoral artery to obtain aortic blood samples.

Preparation of direct splanchnic nerve stimulation. After a median laparotomy and a left flank incision, the left splanchnic nerve was dissected free from surrounding tissues, firmly double ligated ~ 2 cm from the adrenal gland, and protected from dryness by applying mineral oil. Direct electrical stimulation was applied to the distal ligated end of this nerve. All the other nerves to the left adrenal gland from the lumbar paravertebral sympathetic ganglia and from the celiac-superior mesenteric plexus were double ligated and cut within ~ 2 cm from the gland to prevent undesired retrograde nerve conduction during direct stimulation of the left splanchnic nerve (4, 29). This denervation procedure was also

applied in the second series of experiments in which the secretagogue effect of exogenous ACh was tested in the absence and presence of PACAP27.

Preparation of local intra-arterial drug infusion to the left adrenal gland. The experimental model used in this study has previously been validated in our laboratory and reported in full detail elsewhere (27). Briefly, after the left adrenal denervation, the left adrenolumbar artery was dissected free from surrounding tissues and cannulated in a retrograde manner, i.e., from the peripheral end toward the gland and aorta. The catheter (PE-90) was then advanced, so that the tip of the catheter reached underneath the gland or to a level close to the adrenolumbar arterial-aortic junction. The volume of the catheter was fixed to be 0.5 ml, and the catheter was connected to an infusion pump (model 1140-001, Harvard, south Natick, MA). For the second series of experiments, a smaller size of catheter (PE-50) was used, but the volume of this catheter was also fixed to be 0.5 ml, and the catheter was connected to an double-infusion pump (model 55-2226, Harvard, south Natick, MA).

Preparation of an extra-corporeal adrenal venous circuit. A polyethylene catheter (PE-240), one end of which was specially shaped to allow an easy cannulation, was inserted into the left adrenolumbar vein through the left femoral vein. The catheter was tied at the adreno-abdominal vena caval junction to prevent dilution of adrenal venous blood with abdominal vena caval blood. The left adrenolumbar vein distal to the gland was ligated to obtain actual adrenal venous blood. Venous blood from the gland was drained into a small blood reservoir filled with physiological saline. The volume of the catheter was fixed to be 1.5 ml. Blood volume in the reservoir was kept as small as possible with the use of an automatic

blood level controller connected to a perfusion pump (Master-flex model 7016-52; Cole-Parmer Instrument, Chicago, IL). This served to return adrenal venous blood through a catheter inserted into the right femoral vein at a perfusion rate adjusted as closely as possible to a stabilized initial venous blood flow (27). After all surgical procedures were completed, sodium heparin (200 U/kg iv) was administered, followed by 100 U/kg every hour thereafter. The dog was then allowed a stabilization period of ~ 60 min.

Measured parameters. Mean aortic pressure and heart rate were measured and recorded with a polygraph system (model RM-6000, Nihon-Kohden, Tokyo, Japan). Aortic and left adrenal venous blood were simultaneously sampled into graded, chilled tubes for catecholamine analyses. Adrenal venous blood flow was determined by a gravimetric method at each sampling time point (27). Hematocrit was measured in all adrenal venous blood samples. Blood (1.5 ml) was transferred to a centrifuge tube containing 30 μ l of preservative solution (pH 6.5) consisting of ethylene glycol-bis (β -amino-ethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (95 mg/ml) and glutathione (60 mg/ml). Blood samples were immediately centrifuged at 4 °C for 5 min at 14,000 revolutions/min with a refrigerated centrifuge (model 5402, Eppendorf, Hamburg, Germany). Plasma was stored at -80 °C until assay. Plasma concentrations of adrenaline and noradrenaline were quantified by means of an isocratic high performance liquid chromatographic system (Gilson, Villiers-le-Bel, France) coupled with an electrochemical detector "Coulchem II" (model 5200; ESA, Bedford, MA) (27). At the end of each experiment, the left adrenal gland was removed and weighed. Adrenal catecholamine data were expressed in net catecholamine output calculated as follows: net output of adrenal catecholamine ($\text{ng} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) = $([\text{CA}]_{\text{AV}} - [\text{CA}]_{\text{AO}}) \times \text{BF}_{\text{AV}} \times (1 - \text{Hct}_{\text{AV}}) / \text{wet weight of gland}$,

where $[CA]_{AV}$ is plasma catecholamine concentration in adrenal venous blood, $[CA]_{AO}$ is plasma catecholamine concentration in aortic blood, BF_{AV} is adrenal venous blood flow, and Hct_{AV} is adrenal venous blood hematocrit.

Experimental protocol. The present study consisted of two series of experiments. The first series was to investigate the effect of PACAP27 on the catecholamine secretion in response to a direct splanchnic nerve stimulation (SNS). The second series was to evaluate whether the PACAP27-induced adrenal catecholamine release can be modified in the presence of exogenous ACh.

The first series involved four groups. The first group (25.6 ± 1.9 kg, $n = 6$) received a vehicle and sham-stimulation and served as the control group. One minute after the initial control sample was taken, a vehicle (saline 0.9%, pH 7.38) was infused into the left adrenolumbar artery at a rate of 0.5 ml/min. The dead volume of the adrenal arterial (0.5 ml) and venous (1.5 ml) catheter was taken into account in relation to the infusion rate and adrenal venous blood flow, respectively. Therefore, the infusion period was for 2 min: the first minute for flushing the existing saline previously filled in the catheter and the second minute for infusing the vehicle or drug (the net infusion). An adrenal venous blood sample was obtained during this net infusion period (0-1 min) with a delay depending on the venous blood flow, followed by sample collections during 1-2, 2-3, 3-4, 5-6, 10-11 and 15-16 min after the onset of net infusion. The duration of each adrenal venous sample collection was thus fixed to 1 min. Aortic blood samples (1.5 ml each) were simultaneously obtained during adrenal venous sample collections at these sampling time points. Sample obtained 15 min after the vehicle

infusion served as control for the second administration of the vehicle. And, then, the same protocol was repeated for the second, third and fourth administration of the vehicle.

The second group (26.1 ± 0.7 kg, $n = 6$) received the vehicle and three different doses of PACAP27 (0.5, 5 and 50 ng with concentrations of 1, 10 and 100 ng/ml, respectively; Sigma Chemical, St-Louis, MO) along with sham-stimulation with an interval of 15 min. The procedures for drug administrations and sample collections were exactly the same as those described for the vehicle control group. After taking an aliquot of 1.5 ml of the first 3 samples of the adrenal venous blood obtained during and after the net infusion, the remaining blood was not returned to the dog to prevent potential systemic hemodynamic changes due to the released catecholamines. This precaution was also applied in the group receiving either the vehicle, ACh and SNS.

In the third group (31.5 ± 2.3 kg, $n = 6$), the distal end of the tightly ligated left splanchnic nerve was stimulated with bipolar platinum electrodes by rectangular pulses of 2 ms duration and supra maximal voltage (12 V) at a fixed frequency of 2 Hz for 1 min by means of an electronic stimulator (model SEN-3301, Nihon Kohden). The SNS was repeated 4 times at 15 min-intervals. After taking initial controls, blood samples were taken during SNS (0-1) followed by sample collections during 1-2, 2-3, 3-4, 5-6, 10-11 and 15-16 min after the onset of stimulation. The vehicle (saline) was infused simultaneously during SNS following exactly the same procedure described in the first group. This procedure was repeated for the second, third and fourth stimulation.

The fourth group (25.9 ± 1.6 kg, $n=6$) received SNS in the same way as described for the third group. After the infusion of the vehicle (saline) along with the first stimulation, 0.5, 5 and 50 ng of PACAP27 was administered along with the second, third and fourth stimulation, respectively, following the same protocol described for the third group. The doses of PACAP27 and the frequency of stimulation used in this study were selected on the basis of our previous observations obtained under similar experimental conditions (4, 5).

The second series consisted of two separate groups. The first group (33.6 ± 3.0 kg, $n = 5$) received two identical doses of ACh ($0.5 \mu\text{g}$ with concentration of $1.0 \mu\text{g/ml}$, Sigma Chemical) with an interval of 15 min between each infusion. One minute after the initial control sample was taken, the vehicle (saline) and ACh were infused simultaneously into the left adrenolumbar artery at a rate of 0.25 ml/min to obtain, when combined together, a final rate of 0.5 ml/min following the similar protocol described in the first series of experiments. Adrenal venous and aortic blood samples were similarly obtained following the same procedure described for the third group of the first series. Samples obtained 15 min after the onset of vehicle infusion served as control for the second administration of the vehicle and ACh. The second group (29.8 ± 1.9 kg, $n = 5$) received a first infusion of ACh ($0.5 \mu\text{g}$) along with the vehicle (saline) and, 15 min later, received a second infusion of ACh ($0.5 \mu\text{g}$) combined with an infusion of PACAP27 (50 ng). The protocols for local drug administrations and blood sampling were exactly the same as described for the vehicle control group of this series. The dose of ACh was determined according to several dose-finding experiments with doses ranging from 0.05 to $5 \mu\text{g}$. The dose of $0.5 \mu\text{g}$ was selected because the catecholamine responses to this dose were similar in magnitude to those induced by SNS at 2 Hz.

The experimental protocol has been approved by the animal research committee of the Université de Montréal. The animals used in this study have been cared for and used in accordance with the principles of the *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* published by the Canadian Council on Animal Care.

Statistical analyses. The statistical evaluation was made using a package of statistical software (SigmaStat for Windows, Version 2.03; SPSS, Chicago, IL). Differences over a given experimental period were assessed by an analysis of variance for repeated measures followed by multiple comparisons with one control using the Dunnett's method. Comparisons of catecholamine responses to ACh before and after PACAP27 administration were made using the paired *t*-test. A two-way analysis of variance was conducted to assess possible interactions between PACAP27 and SNS as well as PACAP27 and exogenous ACh. When applicable, a preliminary logarithmic transformation was used to satisfy the condition of a normal distribution of variances (23). All results are expressed as means \pm SE, and a $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Catecholamine secretion in response to PACAP27. Control values observed during resting periods within a given experimental period remained relatively stable, and the observed variations within the same subjects were not statistically significant in any group tested. Local infusions of the vehicle (saline) with an interval of 15 min into the left

PACAP in adrenal catecholamine secretion

adrenolumbar artery did not significantly affect the basal output of adrenal catecholamine during a given experimental period of ~ 60 min. The basal plasma concentrations as well as the basal output of adrenal epinephrine and norepinephrine increased in response to the local administration of PACAP27 with doses of 0.5, 5 and 50 ng administered with an interval of 15 min. However, both epinephrine and norepinephrine responses to PACAP27 reached a statistically significant level only at the highest dose tested (Table IX, Fig. 16A). The onset of catecholamine response to PACAP27 was rapid, and the increased catecholamine output returned to the corresponding control levels by ~ 10 min after the cessation of PACAP27 infusion (Fig. 16A). Plasma concentrations of epinephrine and norepinephrine in aortic blood, mean aortic pressure, heart rate and adrenal venous hematocrit remained statistically unchanged throughout the experiment (Tables IX, X and XI).

Catecholamine secretion in response to SNS. Both adrenal epinephrine and norepinephrine output were significantly elevated in response to the first stimulation period at a frequency of 2 Hz. The catecholamine responses to SNS were rapid and short lasting, so that the increased output returned to its pre-stimulation control value in ~ 3 min after the cessation of SNS (Fig. 16B). The increases in epinephrine and norepinephrine output in response to SNS were reproducible upon repetition of the subsequent three stimulations given with an interval of 15 min at the same frequency (Fig. 16B). The fourth catecholamine responses were slightly smaller in magnitude than those to the first stimulation, but there was no statistical difference among them.

Effects of PACAP27 on SNS-induced catecholamine secretion. The adrenal catecholamine responses to SNS during saline infusion were similar to those observed in the vehicle control group (Fig. 16C). The SNS-induced catecholamine responses during the simultaneous infusion of PACAP27 with a dose of 0.5 and 5 ng followed a pattern similar to that observed in the SNS-saline control response. However, during the infusion of PACAP27 at a dose of 50 ng, the peak catecholamine responses of both epinephrine and norepinephrine output to SNS were significantly enhanced (Fig. 16C). These enhanced CA output responses to SNS in the presence of PACAP27 were significantly higher than those observed during the three preceding stimulations (Fig. 16C). This holds true for changes in plasma concentrations of both epinephrine and norepinephrine in adrenal venous blood, despite that adrenal venous blood flow increased significantly (Table X). The net changes in maximum catecholamine output during the infusion of saline alone, PACAP27 (50 ng) alone, the SNS (2 Hz) alone and the SNS (2 Hz) plus PACAP27 (50 ng) infusion are summarized in Fig. 17. A two-way analysis of variance revealed that the SNS-induced catecholamine secretion in the presence of PACAP27 was significantly greater than that observed in response to each stimulus alone, thus indicating a synergistic interaction between the two factors (Fig. 17).

Catecholamine secretion in response to exogenous ACh. The simultaneous administration of saline during ACh (0.5 μ g) infusion increased significantly the basal output of adrenal epinephrine and norepinephrine (Fig. 18A). The catecholamine responses were rapid and short-lasting. The responses returned to the corresponding control value in \sim 3 min after the cessation of the infusion (Fig. 18A). The increasing responses of adrenal

catecholamine output induced by ACh were reproducible upon the second administration of ACh at the same dose with an interval of 15 min (Fig. 18A).

Effect of PACAP27 on ACh-induced catecholamine secretion. The catecholamine responses to the first administration of ACh in the presence of saline were similar to those obtained in the control group (Fig. 18B). In the presence of PACAP27 (50 ng), however, the ACh-induced increases in catecholamine output were significantly enhanced as compared with those observed in response to ACh in the absence of PACAP27 (Fig. 18B). Similar increasing responses were obtained in plasma concentrations of both epinephrine and norepinephrine in adrenal venous blood, despite the significant increase in adrenal venous blood flow (Table XI). The net catecholamine responses during the infusion of saline alone, PACAP27 alone, ACh alone and ACh in the presence of PACAP27 are summarized in Fig. 19. The net increases in ACh-induced catecholamine secretion were significantly potentiated by PACAP27 as compared with those obtained in response to each stimulus alone, showing the presence of interaction between exogenous ACh and PACAP27 (Fig. 19). However, the potentiated catecholamine responses to SNS in the presence of PACAP27 were not significantly different from those to ACh administered along with PACAP27.

DISCUSSION

The present results demonstrate that the local infusion of 50 ng of PACAP27 into the left adrenolumbar artery resulted in a significant increase in the basal secretion of catecholamines from the canine adrenal gland in vivo. Furthermore, adrenal catecholamine

responses to either SNS or exogenous ACh were reproducible upon the repetition of each stimulus alone with an interval of 15 min. The data indicate that the increase in catecholamine secretion induced by either SNS or ACh was significantly enhanced in the presence of PACAP27 in a synergistic manner. These observations suggest that PACAP27 may play a role of neuromodulator facilitating cholinergic neurotransmission in the canine adrenal *in vivo*.

In the present study, adrenal medullary stimulation locally applied with either PACAP27, SNS or ACh alone resulted in a significant increases in basal catecholamine output from the gland without significant changes in systemic parameters such as circulating catecholamine levels in aortic blood, mean aortic pressure and heart rate. It should be noted that plasma catecholamine concentration in adrenal venous blood also increased in response to those stimuli despite the simultaneous increase in adrenal venous blood flow. These observations are consistent with the view that the increase in catecholamine output induced by those stimuli resulted from an actual increase in adrenal catecholamine release, and not from secondary indirect effects of either systemic or local hemodynamic changes, in agreement with our recent findings with PACAP27 and PACAP38 obtained under the similar experimental conditions (5).

It has been shown that the administration of PACAP resulted in a severe bradycardia along with an increase in the release of tritiated ACh in isolated, spontaneously beating guinea-pig atria (17). PACAP has also been shown to potentiate the cardiac slowing induced by vagal stimulation in anesthetized dogs (16). The similar stimulating effect of PACAP on

the cardiac parasympathetic component has been suggested in the dog model both *in vivo* and *in vitro* (7, 31). Furthermore, PACAP has been found to produce a concentration-dependent increase in the release of tritiated ACh in the guinea-pig ileum *in vitro* (9). These previous observations obtained from both *in vitro* and *in vivo* studies strongly suggest that PACAP may interact with certain presynaptic mechanisms involved in cholinergic neurotransmission in the peripheral autonomic nervous system. However, the present finding that PACAP27 significantly enhanced SNS-induced adrenal catecholamine release may result, at least, from two distinct processes, presynaptic and postsynaptic mechanisms.

In accordance with those previous studies (7, 9, 16, 17, 31), it is plausible that the potentiated catecholamine response to SNS in the presence of PACAP27 could result, at least in part, from an enhanced release of neural ACh from splanchnic nerve endings, because the principal innervation to chromaffin cells in the adrenal medulla is predominantly preganglionic cholinergic in nature. If PACAP27 stimulates specific PACAP receptor presumably localized on splanchnic nerve terminals, the ongoing SNS-induced ACh release might be enhanced resulting in the potentiation of catecholamine response. Although the underlying mechanism by which PACAP27 enhances SNS-induced ACh release remains to be defined in the adrenal medulla, a Ca^{2+} -dependent, tetrodotoxin-sensitive mechanism has been suggested to be involved in the negative chronotropic response induced by PACAP38 in the dog heart *in vivo* (7) as well as in the PACAP-induced release of tritiated ACh from the guinea-pig ileum *in vitro* (9). A presynaptic PACAP receptor-mediated mechanism may thus be involved in the enhanced catecholamine response to SNS in the presence of PACAP27. The potential implication of presynaptic mechanism could further be corroborated by the

existence of preganglionic PACAP-positive fibres containing choline acetyltransferase (8) and specific PACAP type I receptor (14, 18, 20) in the adrenal medulla. Nevertheless, the presynaptic hypothesis such as this is not fully compatible with the observation that PACAP directly increases basal catecholamine secretion independent of cholinergic pathway (25). This inconsistent issue, however, can be accounted for by a possibility that the postulated presynaptic action of PACAP27 may become functional only when the splanchnic nerve firing rate is significantly elevated above the basal resting condition. The interpretation such as this is compatible with the previous finding that, in anesthetized dogs, the vagal stimulation-induced bradycardia was potentiated more effectively at higher stimulation frequencies, while the basal resting heart rate did not decrease in the presence of PACAP (16).

Under the present experimental conditions, the enhanced catecholamine response to SNS was also affected by a direct postsynaptic action of PACAP27 on adrenal chromaffin cells as clearly indicated by the observation that exogenous ACh-induced catecholamine release was significantly potentiated in the presence of PACAP27. As PACAP is devoid of direct cholinergic effect on the adrenal medulla *in vivo* (25), the present observation suggests that the enhancing effect of PACAP27 on ACh-induced catecholamine release may be indirectly mediated via, most likely, specific type I PACAP receptor localized on the surface of adrenal chromaffin cells. In addition to the direct non-cholinergic action of PACAP27 on catecholamine secretion, stimulation of the PACAP receptor may result in an upregulation of cholinceptors on the chromaffin cells, resulting in the synergistic enhancement of catecholamine release in response to either endogenous (SNS) or exogenous ACh. In support of this interpretation, it has been demonstrated that, in chick ciliary ganglion *in vitro*, both

PACAP27 and PACAP38 enhanced the sensitivity of cholinceptors to the neural ACh, through a cyclic AMP-dependent mechanism, resulting from the stimulation of specific PACAP type I receptors (12). This possibility, however, may be less likely to occur under the present experimental conditions, because PACAP27 was simultaneously administered with either ACh or SNS in the present study, while the reported upregulation occurred in ~ 10 min after the incubation with PACAP (12). The latter observation suggests the need of either continuous or frequent stimulation of the PACAP receptor for at least 10 min prior to the application of endogenous (SNS) or exogenous ACh to significantly upregulate surface membrane cholinceptors on the chromaffin cells.

Alternatively, certain intracellular interactions between various second messengers at the postsynaptic level may be more likely to be involved in the enhanced catecholamine release in response to cholinergic stimulation in the presence of PACAP. We have previously shown that both cholinergic nicotinic and muscarinic receptors are functionally involved in mediating catecholamine release in response to exogenously administered selective agonists in the canine adrenal in vivo (27, 28). This holds true for the catecholamine secretion induced by exogenous ACh, while SNS-induced catecholamine release is likely to be mediated predominantly by nicotinic receptor (10). On the other hand, it has been shown that, in rat cultured chromaffin cells, PACAP increases Ca^{2+} influx through a cyclic AMP-mediated mechanism (15). A recent study further indicated that, in bovine adrenal medullary cells, PACAP induces Ca^{2+} release from ryanodine/caffeine-sensitive stores through a novel intracellular mechanism independent of both inositol trisphosphates and cyclic AMP (21). Moreover, we have recently shown that dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channel is

functionally involved, although to a small extent, in PACAP27-induced adrenal catecholamine release in the canine adrenal in vivo (5). Taken together, these previous observations are compatible with the view that the potentiating effect of PACAP27 on SNS-induced catecholamine release observed in the present study could result from the PACAP-induced increase in intracellular free Ca^{2+} , through a mechanism either dependent or independent of cyclic AMP, which, in turn, activates protein kinase C, resulting in the amplification of the exocytotic process initiated by the action of neurally released ACh on nicotinic receptor. In support of this interpretation, it has been shown that nicotinic receptor-mediated Ca^{2+} influx is positively regulated by the activated protein kinase C (11). The similar cascade such as this has previously been postulated for the synergistic interaction between the effects of VIP and ACh on catecholamine release from the isolated, perfused rat adrenal gland (11).

In the course of the present study, we sought the difference of the potentiated catecholamine responses in the presence of PACAP27 between those induced by SNS and those by exogenous ACh, thereby characterizing the effect of PACAP27 on either the pre- or postsynaptic level during SNS. As discussed earlier in this study, the possibility that PACAP27 potentiated the release of neural ACh in response to SNS resulting in the enhanced catecholamine secretion cannot completely be ruled out under the present experimental conditions. The present data indicate that the catecholamine responses to either SNS or exogenous ACh alone were similar in magnitude. Therefore, if the release of neural ACh was actually potentiated by PACAP27 during SNS, the enhanced catecholamine secretion induced by SNS in the presence of PACAP27 ought to be greater than that obtained from the group

receiving exogenous ACh and PACAP27. Nevertheless, the potentiated catecholamine responses observed in the group receiving SNS and PACAP27 were not significantly different from those obtained in the group receiving exogenous ACh and PACAP27. This finding suggests that the potentiated catecholamine release in response to SNS in the presence of PACAP27 is less likely to result from the presynaptic facilitatory action of PACAP27, but rather more likely from its action on the postsynaptic level.

In conclusion, the present study was to investigate if PACAP27 can modulate catecholamine secretion in the canine adrenal *in vivo*. The results indicate that locally administered PACAP27 significantly potentiated catecholamine release induced by either SNS or exogenously administered ACh. These results are compatible with the view that PACAP27 potentiates SNS-induced adrenal catecholamine secretion either by facilitating the release of neural ACh or by postsynaptic multiple intracellular interactions between various second messengers. However, the net catecholamine responses potentiated by PACAP27 during SNS were not significantly different from those enhanced by PACAP27 during exogenous ACh infusion. The present study suggests that PACAP27 may play a role of neuromodulator presumably at the postsynaptic level in the local regulation of catecholamine secretion in the canine adrenal medulla *in vivo*, although the possible involvement of presynaptic facilitatory effect of PACAP27 cannot totally be ruled out under the present experimental conditions.

PERSPECTIVES

The present study clearly indicates that the adrenomedullary response to either endogenous (SNS) or exogenous ACh was significantly enhanced in a synergistic manner in the presence of PACAP27 under in vivo conditions. The present observations are compatible with the view that PACAP is functionally involved as a neuromodulator in the local regulation of adrenomedullary secretion. The physiological significance of the present findings is that this concept can be further applied to many pathophysiological situations in which the sympathoadrenal system is functionally involved. In this context, it is conceivable, for example, that the glucose counter-regulatory response of the adrenal medulla to insulin-induced hypoglycemia should also be potentiated in the presence of PACAP, so that the increased catecholamine secretion can contribute to rapidly restore the hypoglycemia. This hypothesis has recently been tested in a dog model similar to that used in the present study. The preliminary results indicated that the increased sympathoadrenal activity, as judged by adrenal catecholamine output, during insulin-induced hypoglycemia was significantly enhanced in the presence of PACAP27 in accordance with the present observations (30). It is of further interest that this potentiation of catecholamine response became significant only when the hypoglycemic response to insulin reached the maximum level. It is, therefore, likely that the PACAP-mediated mechanism is functionally involved in the sympathoadrenal system under certain pathophysiological conditions where the cholinergic mechanism needs to be markedly enhanced or otherwise becomes deficient.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Sanae Yamaguchi and Richard Lalande for their skilled and devoted technical assistance. This work was supported by grants from the Canadian Diabetes Association and the Medical Research Council of Canada. During the present study, S. Lamouche was a holder of a studentship awarded by the Société Québécoise d'Hypertension Artérielle (1997-1998).

Received 20 June 1998; Accepted in final form 8 September 1998.

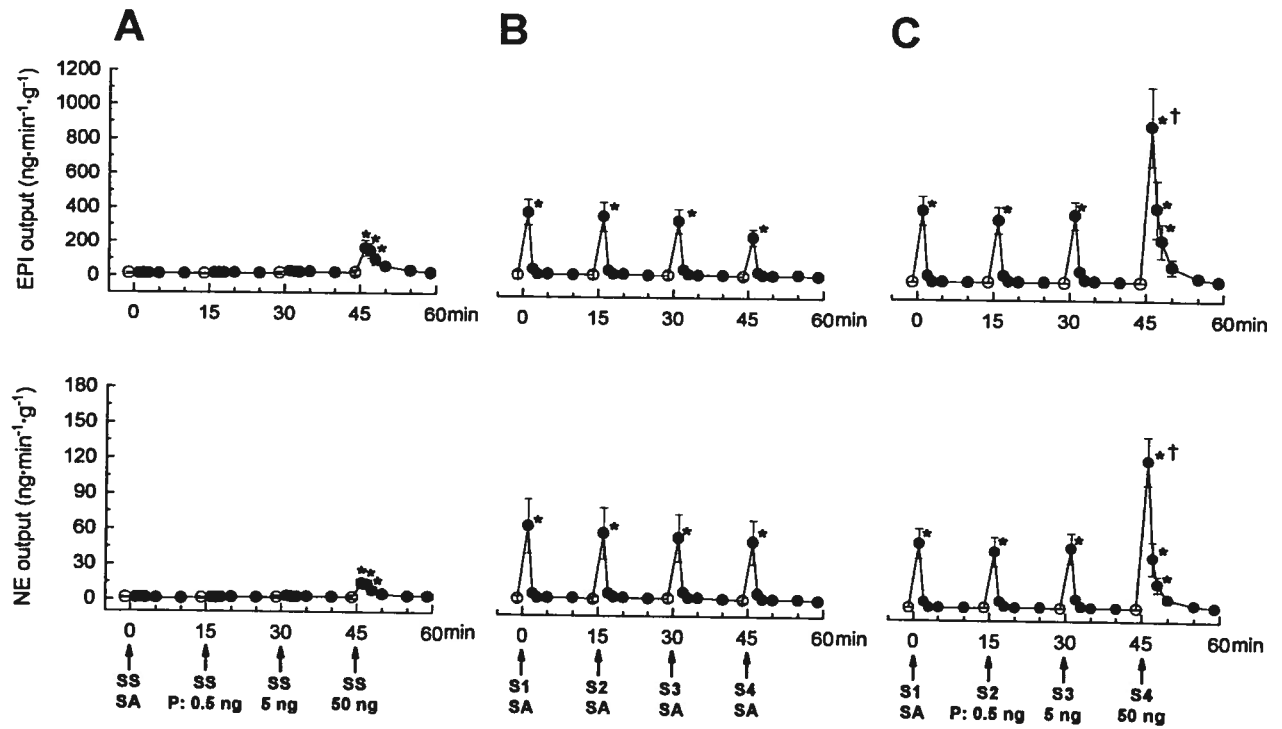


Figure 16. Adrenal epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output in response A) to the administration of PACAP27 (P: 0.5, 5 and 50 ng) with sham stimulation (SS); B) to repetitive direct splanchnic nerve stimulation at 2 Hz, given at 0, 15, 30 and 45 min (S1 through S4) in the group receiving the vehicle (saline, SA,); and C) to the same stimulation in the group receiving PACAP27 (P: 0.5, 5 and 50 ng) as indicated underneath arrows. Open circles indicate control values taken immediately before stimulation and administration of either saline or PACAP27. *, $P < 0.05$ versus the corresponding control values; †, $P < 0.05$ versus the three preceding responses.

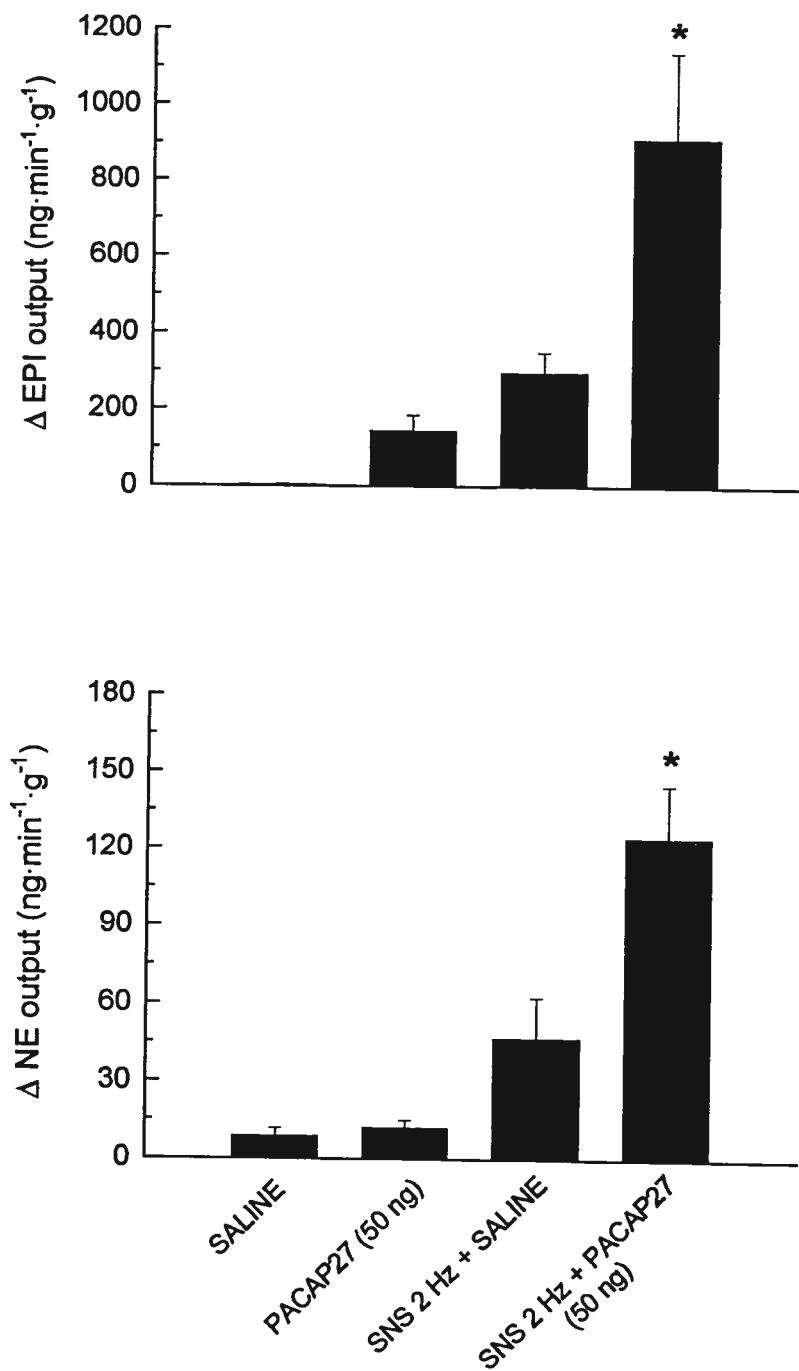


Figure. 17. Maximum net increases (Δ) in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output in the group receiving saline, PACAP27 (50 ng), direct splanchnic nerve stimulation (SNS; 2 Hz), and SNS in the presence of PACAP27 (50 ng). The maximum net response in each group was calculated with the data obtained from the first series of experiments. *, $P < 0.05$ versus all three other groups.

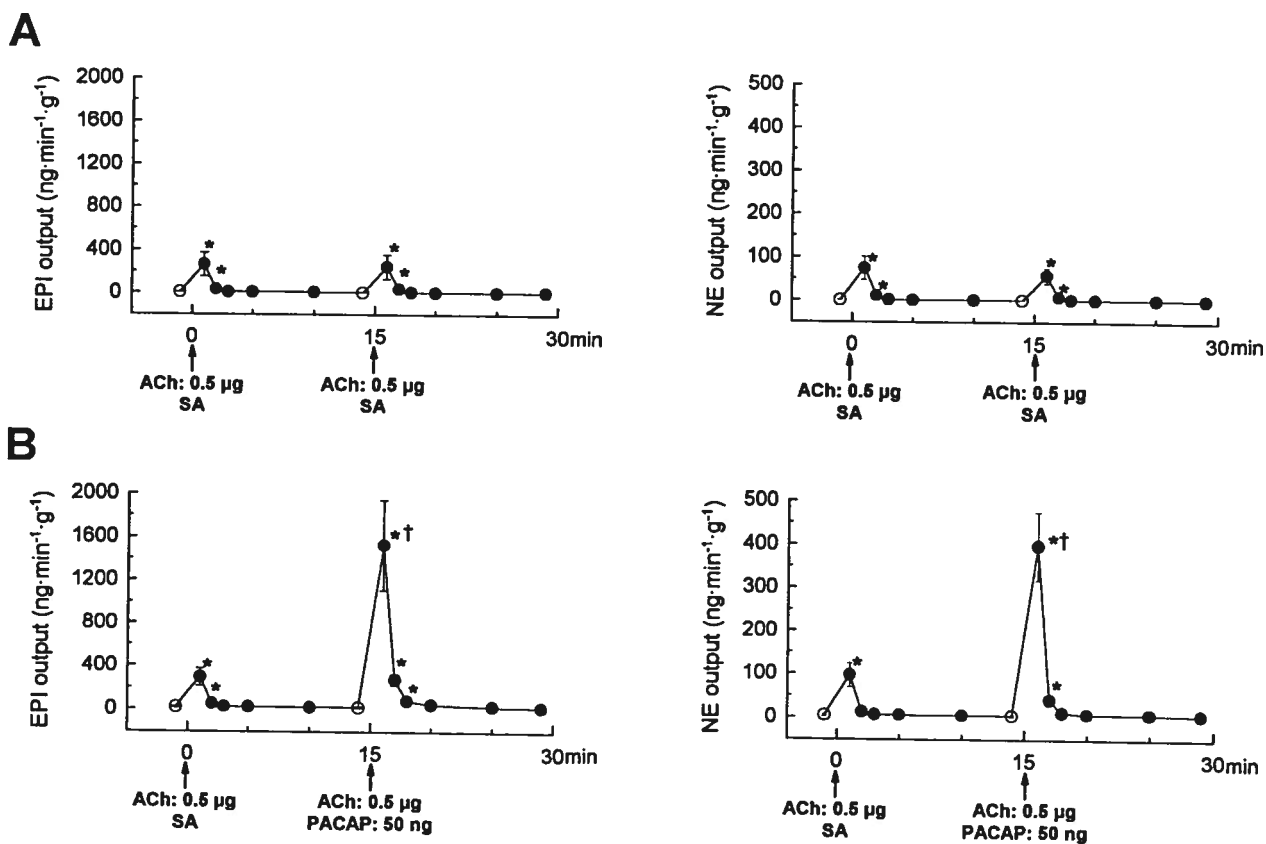


Figure. 18. Adrenal epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output in response to repeated administrations of ACh (0.5 mg) given at 0 and 15 min in the group receiving A) the vehicle (saline, SA) and B) PACAP27 (50 ng) as indicated underneath arrows. Open circles indicate control values taken immediately before the drugs administration. *, $P < 0.05$ versus the corresponding control values; †, $P < 0.05$ versus the preceding response.

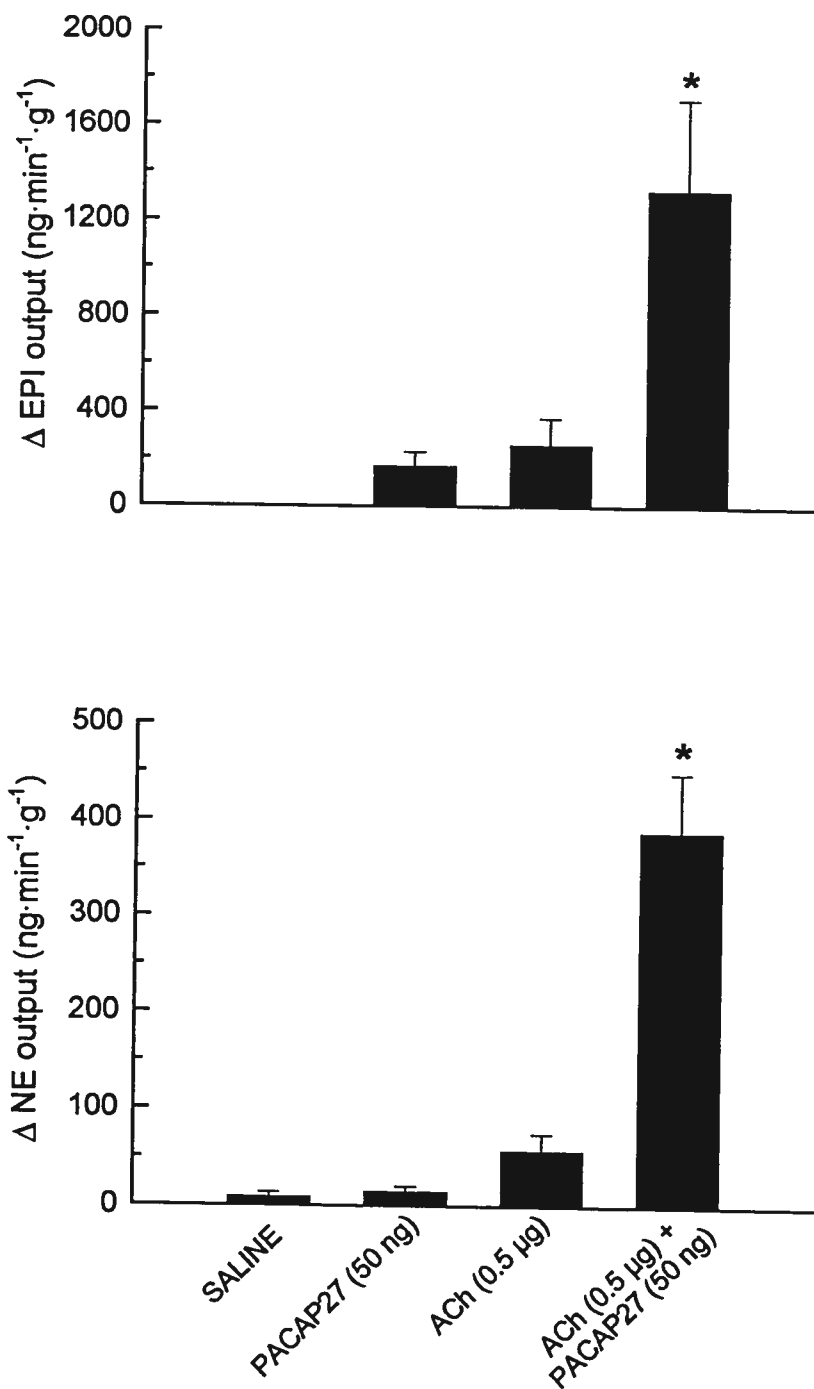


Figure. 19. Maximum net increases (Δ) in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output in the group receiving saline, PACAP27 (50 ng), ACh (0.5 mg) and the combined infusion of PACAP27 (50 ng) and ACh (0.5 mg). The data for calculating the maximum net response in each group were obtained from the groups receiving saline alone and PACAP27 alone in the first series as well as from those receiving ACh alone and ACh plus PACAP27 in the second series of experiments. *, $P < 0.05$ versus all three other groups.

Table IX. Plasma catecholamine concentrations in adrenal venous and aortic blood, adrenal venous blood flow, adrenal venous hematocrit, mean aortic pressure and heart rate in the group receiving PACAP27 during sham-stimulation

Parameters	C1	SA 1 min	C2	PACAP (0.5 ng) 1 min	C3	PACAP (5 ng) 1 min	C4	PACAP (50 ng) 1 min
AV-Epi, ng/ml	6.9 ± 2.4	6.0 ± 1.9	6.5 ± 2.1	8.2 ± 3.0	11.4 ± 5.4	18.5 ± 7.0	16.3 ± 9.1	147.5 ± 51.3*†
AV-NE, ng/ml	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.6 ± 0.7	2.1 ± 1.0	2.0 ± 1.1	13.3 ± 4.1*†
AO-Epi, ng/ml	0.24 ± 0.09	0.23 ± 0.12	0.23 ± 0.08	0.21 ± 0.08	0.30 ± 0.09	0.18 ± 1.23	0.28 ± 0.11	0.33 ± 0.14
AO-NE, ng/ml	0.29 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.27 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.29 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.31 ± 0.05	0.32 ± 0.03
AV-BF, ml/min	3.4 ± 0.7	3.7 ± 0.7*	3.0 ± 0.6	3.5 ± 0.7*	2.9 ± 0.5	3.3 ± 0.6*	2.7 ± 0.4	3.4 ± 0.7*
AV-Hct, %	51.7 ± 2.1	47.7 ± 2.2	51.7 ± 2.5	48.2 ± 2.2	52.0 ± 2.3	48.7 ± 2.2	52.5 ± 2.3	49.0 ± 2.4
MAP, mmHg	122.3 ± 3.65	123.3 ± 5.3	121.9 ± 6.0	122.2 ± 5.2	119.0 ± 5.6	121.1 ± 7.1	116.0 ± 7.0	118.8 ± 7.2
HR, beats/min	147.7 ± 4.5	147.0 ± 4.5	149.3 ± 6.2	149.7 ± 5.8	152.0 ± 5.6	151.0 ± 5.1	149.0 ± 6.7	147.7 ± 5.5

Values are means ± SE, AV-Epi, adrenal venous epinephrine; AV-NE, adrenal venous norepinephrine; AO-Epi, aortic epinephrine; AO-NE, aortic norepinephrine; AV-BF, adrenal venous blood flow; AV-Hct; adrenal venous hematocrit; MAP, mean aortic pressure; HR, heart rate. *, $P < 0.05$ versus the corresponding control values (C1 through C4) observed immediately before the infusion of saline (SA) or PACAP27 along with sham-stimulation. †, $P < 0.05$ versus the three preceding responses observed at 1 min.

Table X. Plasma catecholamine concentrations in adrenal venous and aortic blood, adrenal venous blood flow, adrenal venous hematocrit, mean aortic pressure and heart rate in the group receiving PACAP27 during splanchnic nerve stimulation

Parameters	S2 + PACAP				S3 + PACAP				S4 + PACAP	
	C1	S1 +SA 1 min	C2	0.5 ng 1 min	C3	5 ng 1 min	C4	50 ng 1 min		
AV-Epi, ng/ml	4.1 ± 1.0	265.5 ± 70.5*	4.8 ± 1.3	244.8 ± 61.9*	3.8 ± 0.9	280.6 ± 68.8*	5.8 ± 1.8	639.2 ± 156.7*†		
AV-NE, ng/ml	0.7 ± 0.2	34.2 ± 9.5*	1.0 ± 0.2	30.6 ± 8.9*	0.8 ± 0.2	34.3 ± 9.1*	0.9 ± 0.2	82.2 ± 11.9*†		
AO-Epi, ng/ml	0.17 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.05	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.04	0.11 ± 0.01		
AO-NE, ng/ml	0.27 ± 0.06	0.27 ± 0.05	0.26 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.24 ± 0.07	0.46 ± 0.13	0.26 ± 0.08	0.33 ± 0.08		
AV-BF, ml/min	2.8 ± 0.3	3.9 ± 0.3*	2.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2*	2.5 ± 0.1	3.6 ± 0.2*	2.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2*		
AV-Hct, %	47.2 ± 3.1	45.3 ± 3.2	49.3 ± 3.0	46.0 ± 3.2	49.7 ± 3.0	45.8 ± 3.2	49.7 ± 3.0	46.0 ± 3.2		
MAP, mmHg	115.5 ± 25.1	115.7 ± 24.2	114.7 ± 24.1	118.8 ± 24.9	116.0 ± 24.6	118.6 ± 25.2	118.3 ± 24.2	115.9 ± 24.4		
HR, beats/min	178.8 ± 12.1	176.4 ± 11.2	181.8 ± 12.2	180.2 ± 11.5	182.6 ± 14.9	180.8 ± 15.3	183.8 ± 15.2	182.6 ± 16.2		

Values are means ± SE, AV-Epi, adrenal venous epinephrine; AV-NE, adrenal venous norepinephrine; AV-Epi, aortic epinephrine; AO-NE, aortic norepinephrine; AV-BF, adrenal venous blood flow; AV-Hct; adrenal venous hematocrit; MAP, mean aortic pressure; HR, heart rate. *, $P < 0.05$ versus the corresponding control values (C1 through C4) observed immediately before the infusion of saline (SA) or PACAP27 along with splanchnic nerve stimulation (S1 through S4). †, $P < 0.05$ versus the three preceding responses observed at 1 min.

Table XI. Plasma catecholamine concentrations in adrenal venous and aortic blood, adrenal venous blood flow, adrenal venous hematocrit, mean aortic pressure and heart rate in the group receiving PACAP27 during ACh administration

Parameters	C1	ACh 0.5 μ g +	C2	ACh 0.5 μ g +
		SA		PACAP 50 ng
		1 min		1min
AV-Epi, ng/ml	8.6 \pm 2.8	128.8 \pm 25.1*	10.2 \pm 5.4	659.2 \pm 300.1*†
AV-NE, ng/ml	2.4 \pm 1.0	36.3 \pm 8.2*	2.8 \pm 1.2	180.5 \pm 56.6*†
AO-Epi, ng/ml	0.13 \pm 0.04	0.11 \pm 0.01	0.13 \pm 0.04	0.13 \pm 0.03
AO-NE, ng/ml	0.20 \pm 0.05	0.21 \pm 0.04	0.25 \pm 0.07	0.19 \pm 0.03
AV-BF, ml/min	3.3 \pm 0.5	5.1 \pm 0.5*	3.1 \pm 0.5	5.1 \pm 0.4*
AV-Hct, %	46.1 \pm 3.2	42.1 \pm 2.6	46.4 \pm 3.3	42.8 \pm 2.9
MAP, mmHg	136.3 \pm 8.2	137.9 \pm 8.3	137.4 \pm 8.0	137.5 \pm 8.1
HR, beats/min	159.2 \pm 8.4	160 \pm 8.9	160.2 \pm 9.1	161.8 \pm 9.7

Values are means \pm SE, AV-Epi, adrenal venous epinephrine; AV-NE, adrenal venous norepinephrine; AO-Epi, aortic epinephrine; AO-NE, aortic norepinephrine; AV-BF, adrenal venous blood flow; AV-Hct; adrenal venous hematocrit; MAP, mean aortic pressure; HR, heart rate. *, $P < 0.05$ compared with the corresponding control values (C1 and C2). †, $P < 0.05$ versus the response to ACh in the absence of PACAP27.

REFERENCES

1. Arimura, A., A. Somogyvari-Vigh, A. Miyata, K. Mizuno, D.H. Coy, and C. Kitada. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129: 2787-2789, 1991.
2. Chen, W., I. Inui, T. Hachiya, Y. Ochi, Y. Nakajima, and Y. Kajita. Stimulatory action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on thyroid gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 923-929, 1993.
3. Dun, N.J., H. Tang, S.L. Dun, R. Huang, E.C. Dun, and A.R. Wakade. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-immunoreactive sensory neurons innervate rat adrenal medulla. *Brain Res.* 716: 11-21, 1996.
4. Gaspo, R., N. Yamaguchi, and J. de Champlain. Effects of nifedipine and BAY K 8644 on stimulation-induced adrenal catecholamine secretion in the dog. *Am. J. Physiol.* 265 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 34): R28-R34, 1993.
5. Geng, G., F. Trabelsi, R. Gaspo, and N. Yamaguchi. Role of L-type Ca²⁺ channel in PACAP-induced adrenal catecholamine release in vivo. *Am. J. Physiol.* 273 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 42): R1339-R1345, 1997.

6. **Goth, M.I., C. E. Lyons, B. J. Canny, and M.O. Thorner.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, growth hormone (GH)-releasing peptide and GH releasing hormone stimulate GH release through distinct pituitary receptors. *Endocrinology* 127: 272-277, 1990.
7. **Hirose, M., Y. Furukawa, Y. Nagashima, K. Yamazaki, Y. Hoyano, and S. Chiba.** Effects of PACAP-38 on the SA nodal pacemaker activity in autonomically decentralized hearts of anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 29: 216-221, 1997.
8. **Holgert, H., K. Ohlberg, J. Hannibal, J. Fahrenkrug, S. Brimijoin, B.K. Hartman, and T. Hokfelt.** PACAP in the adrenal gland: relationship with choline acetyltransferase, enkephalin and chromaffin cells and effects of immunological sympathectomy. *Neuroreport.* 8 (1): 297-301, 1996.
9. **Katsoulis, S., A. Clemens, H. Schwörer, W. Creutzfeldt, W.E. Schmidt.** PACAP is a stimulator of neurogenic contraction in guinea-pig ileum. *Am. J. Physiol.* 265 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 28): G295-G302, 1993.
10. **Kimura, T., T. Shimamura, and S. Satoh.** Effects of pirenzepine and hexamethonium on adrenal catecholamine release in response to endogenous and exogenous acetylcholine in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20: 870-874, 1992.

11. **Malhotra, R. K., T. D. Wakade, and A. R. Wakade.** Cross-communication between acetylcholine and VIP in controlling catecholamine secretion by affecting cAMP, inositol triphosphate, protein kinase C, and calcium in rat adrenal medulla. *J. Neurosci.* 9: 4150-4157, 1989.
12. **Margiotta, J. F., and D. Pardi.** Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide type I receptors mediate cyclic AMP-dependent enhancement of neuronal acetylcholine sensitivity. *Mol. Pharmacol.* 48: 63-71, 1995.
13. **Miyata, A., A. Arimura, R.R. Dahl, N. Ninamo, A. Uehara, L. Jung, M.D. Culler, and D.H. Coy.** Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 567-574, 1989.
14. **Moller, K., and F. Sundler.** Expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and PACAP type I receptors in the rat adrenal medulla. *Reg. Peptides* 63 (2-3): 129-139, 1996.
15. **Przywara, D. S., X. Guo, M. L. Angelilli, T. D. Wakade, and A. R. Wakade.** A non-cholinergic transmitter, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, utilizes a novel mechanism to evoke catecholamine secretion in rat adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 271: 10545-10550, 1996.

16. **Runcie, M.J., L.G. Hulman, and E.K. Potter.** Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cardiovascular and respiratory responses in anaesthetised dogs. *Regul. Peptides* 60: 193-200, 1995.
17. **Seebeck, J., W.E. Schmidt, H. Kilbinger, J. Neuman, N. Zimmerman, and S. Herzig.** PACAP induces bradycardia in guinea-pig heart by stimulation of atrial cholinergic neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 354: 424-430, 1996.
18. **Shivers, B.D., T.J. Görcs, P.E. Gottshall, and A. Arimura.** Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology* 128: 3055-3065, 1991.
19. **Spengler, D., C. Waeber, C. Pantaloni, F. Holsboer, J. Bockaer, P.H. Seeburg, and L. Journot.** Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptors. *Nature (London)* 365: 170-175, 1993.
20. **Tabarin, A., D. Chen, R. Hakanson, and F. Sundler.** Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the adrenal gland of mammals: distribution, characterization and responses to drugs. *Neuroendocrinol.* 59: 113-119, 1994.
21. **Tanaka, K., I. Shibuya, Y. Uezono, Y. Ueta, Y. Toyohira, N. Yanagihara, F. Izumi, T. Kanno, and H. Yamashita.** Pituitary adenylate cyclase-activating

- polypeptide causes Ca^{2+} release from ryanodine/caffeine stores through a novel pathway independent of both inositol trisphosphates and cyclic AMP in bovine adrenal medullary cells. *J. Neurochem.* 70: 1652-1661, 1998.
22. **Wakade, A.R., X. Gou, R. Strong, A. Arimura, and J. Haycock.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a neurotransmitter in rat adrenal medulla (Abstract). *Reg. Peptide.* 37: 327, 1992.
23. **Wallenstein, S., C.L. Zucker, and J. Fleiss.** Some statistical methods useful in circulation research. *Circ. Res.* 47: 1-9, 1980.
24. **Watanabe, T., Y. Masuo, H. Matsumoto, N. Suzuki, T. Ohtaki, Y. Masuda, C. Kitada, M. Tsuda, and M. Fujino.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide provokes cultured rat chromaffin cells to secrete adrenaline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182 (1): 403-411, 1992.
25. **Watanabe, T., N. Shimamoto, A. Takahashi, and M. Fujino.** PACAP stimulates catecholamine release from adrenal medulla: a novel noncholinergic secretagogue. *Am. J. Physiol.* 269 (Endocrinol. Metab. 32): E903-E909, 1995.
26. **Yada, T., M. Sakurada, K. Ihida, M. Nakata, F. Murata, A. Arimura, and M. Kikuchi.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an extraordinarily

- potent intra-pancreatic regulator of insulin secretion from islet beta-cells. *J. Biol. Chem.* 269: 1290-1293, 1994.
27. **Yamaguchi, N.** In vivo evidence for adrenal catecholamine release mediated by nonnicotinic mechanism: local medullary effect of VIP. *Am. J. Physiol.* 260 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 34): R766-R771, 1993.
28. **Yamaguchi, N.** Implication of L-type Ca²⁺ channels in noncholinergic adrenal catecholamine secretion by endothelin-1 in vivo. *Am. J. Physiol.* 269 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 38): R287-R293, 1995.
29. **Yamaguchi, N., L. Lamarche, and R. Briand.** Simultaneous evaluation of medullary secretory functions of normal and acutely denervated adrenals. *Am. J. Physiol.* 260 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 29): R306-R313, 1991.
30. **Yamaguchi, N., and S. Lamouche.** Enhanced release by PACAP of adrenomedullary secretion during insulin-induced hypoglycemia (Abstract). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358: R709, P16.10, 1998.
31. **Yonezawa, T., Y. Furukawa, M. Lakhe, Y. Nagashima, M. Hirose, and S. Chiba.** PACAP38 activates parasympathetic nerves in isolated, blood-perfused dog atria. *Eur. J. Pharmacol.* 315: 289-296, 1996.

DEUXIÈME PARTIE:

*Role of PAC₁ receptor in adrenal catecholamine
secretion induced by PACAP and VIP in vivo*

Stéphane Lamouche and Nobuharu Yamaguchi

*American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative
and Comparative Physiology*

280: R510-R518, 2001

RÉSUMÉ

Lamouche, Stéphane, and Nobuharu Yamaguchi. *Role of PAC1 receptor in adrenal catecholamine secretion induced by PACAP and VIP in vivo. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 280: R510-R518, 2001.—La présente étude avait pour but de clarifier l'implication fonctionnelle du récepteur spécifique au polypeptide activant l'adénylcyclase pituitaire (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*; PACAP) de type I (PAC₁) dans la libération des catécholamines (CA) surrénaliennes induite soit par l'isoforme PACAP-27 soit par le polypeptide vasoactif intestinal (*vasoactive intestinal polypeptide*; VIP) chez des chiens anesthésiés. Le PACAP-27, le VIP, et leurs antagonistes respectifs furent administrés localement par l'artère lombo-surrénale dans la glande surrénale gauche. Les concentrations de CA plasmatiques dans le sang aortique et veineux surrénalien ont été déterminées par HPLC-détection électrochimique. Le débit sanguin de la veine lombo-surrénale a été mesuré par gravimétrie. L'infusion locale du PACAP-27 (50 ng) a augmenté significativement la sécrétion basale des CA surrénaliennes. Le VIP (5 µg) a aussi augmenté la sécrétion basale des CA à un niveau comparable à celui observé avec le PACAP-27. En présence de la séquence partielle 6-27 du PACAP (PACAP6-27; un antagoniste sélectif du récepteur PAC₁) à 7,5 et 15 µg, l'augmentation de la sécrétion des CA en réponse au PACAP-27 a diminué d'environ 50% et 95%, respectivement. En dépit de l'effet sécréteur du VIP sur les CA qui a été inhibé par environ 85% en présence du PACAP6-27 (15 µg), il fut inchangé en présence de la séquence partielle 10-28 du VIP (VIP10-28; antagoniste des récepteurs du VIP) à 15 µg. Également, la sécrétion des CA en réponse au PACAP-27 est demeurée

inchangé en présence du VIP10-28. Les résultats indiquent que l'augmentation de la sécrétion des CA induite par le PACAP-27 a été atténué de façon concentration dépendantes en présence du PACAP6-27. Les résultats indiquent aussi que la réponse des CA au PACAP-27 et au VIP furent inhibées de façon sélective par le PACAP6-27 mais non par le VIP10-28. L'étude démontre que le récepteur PAC₁ joue un rôle fonctionnel majeur dans la sécrétion des CA induite autant par le PACAP-27 que par le VIP dans la médullosurrénale du chien *in vivo*.

SUMMARY

Lamouche, Stéphane, and Nobuharu Yamaguchi. Role of PAC1 receptor in adrenal catecholamine secretion induced by PACAP and VIP in vivo. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 280: R510-R518, 2001.—The present study was to investigate the functional implication of the PACAP type I (PAC₁) receptor in the adrenal catecholamine (CA) secretion induced by either PACAP27 or VIP in anesthetized dogs. PACAP27, VIP and their respective antagonists were locally infused to the left adrenal gland via the left adrenolumbar artery. Plasma CA concentrations in adrenal venous and aortic blood were determined by means of a high-performance liquid chromatograph coupled with an electrochemical detector. Adrenal venous blood flow was measured by gravimetry. The administration of PACAP27 (50 ng) resulted in a significant increase in adrenal CA output. VIP (5 µg) also increased the basal CA secretion to an extent comparable to that observed with PACAP27. In the presence of PACAP6-27 (a PAC₁ receptor antagonist) at the doses of 7.5 µg and 15 µg, the CA response to PACAP27 was attenuated by ~50% and ~95%,

respectively. While the CA secretagogue effect of VIP was blocked by ~85% in the presence of PACAP6-27 (15 μ g), it remained unaffected by VIP10-28 (a VIP receptor antagonist) at the dose of 15 μ g. Furthermore, the CA response to PACAP27 did not change in the presence of the same dose of VIP10-28. The results indicate that PACAP6-27 diminished, in a dose-dependent manner, the increase in adrenal CA secretion induced by PACAP27. The results also indicate that the CA response to either PACAP27 or VIP was selectively inhibited by PACAP6-27, but not by VIP10-28. It is concluded that PAC₁ receptor is primarily involved in the CA secretion induced by both PACAP27 and VIP in the canine adrenal medulla in vivo.

INTRODUCTION

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) are neuropeptides widely distributed in the central and peripheral nervous systems. Both of them are members of the vasoactive intestinal polypeptide /secretin/glucagon family of peptides. PACAP was first isolated from the ovine hypothalamus and can be found in two biologically active isoforms depending on the number of amino acid residues, PACAP27 and PACAP38 (19, 20). VIP is a 28-amino acid polypeptide originally isolated from porcine intestine and shares 68% homology with PACAP27 in their amino acid sequence (20, 22). PACAP and VIP possess a wide variety of biological activities, particularly a potent secretagogue effect on adrenal catecholamine secretion both in vitro (18, 28) and in vivo models (28, 31). PACAP exerts tissue-specific effects by interacting with at least three distinct G-protein-coupled receptors: the PAC₁, VPAC₁ and VPAC₂ receptors (11). The PAC₁ receptor is highly selective for both isoforms of PACAP and has only a weak affinity for VIP (11). On the other hand, the VPAC receptors possess a high affinity for both VIP and PACAP (11). The adrenal gland contains high concentrations of PACAP (2, 28) as well as PAC₁ receptor (28). Despite the fact that pharmacological characterization of the PAC₁ and VPAC receptors has been well documented in various tissues in vitro (28), studies in vivo on the functional involvement and the relative importance of these receptors in the adrenal medulla have been limited in number. Therefore, the aims of the present study were to demonstrate the functional existence of PAC₁ receptor involved in PACAP-induced adrenal catecholamine secretion, and to clarify the relative importance of PAC₁ and VPAC receptors in the secretion of adrenal catecholamines induced by VIP under in vivo conditions.

METHODS

Preparation of animals. Adult mongrel dogs (26.82 ± 1.78 kg, $n = 35$), fasted overnight but allowed free access to water, were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg iv, followed by 4 mg/kg as needed; MTC Pharmaceutical, Cambridge, ON). Respiration was controlled through an endotracheal tube, with room air delivered by a respirator (model 607; Harvard, South Natick, MA). Body temperature of each dog was monitored and kept constant at 37.5 ± 0.5 °C by a thermoregulator (model 74; Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH) connected to a heating pad throughout the experiment. Physiological saline was slowly administered intravenously during the whole period of the experiment to prevent dehydration. The pH of physiological saline was adjusted at 7.38 immediately before use. Both femoral arteries were cannulated; the right femoral artery was used to measure aortic pressure, and the left femoral artery was used to obtain aortic blood samples.

Preparation of local intra-arterial drug infusion into the left adrenal gland. The experimental model used in this study has previously been validated in our laboratory and reported in full detail elsewhere (31). Briefly, after a median laparotomy, a catheter (PE-50) was inserted into the left adrenolumbar artery from the peripheral end toward the gland and then advanced, so that the tip of the catheter reached under the gland or to a level close to the adrenolumbar arterial-aortic junction. All visible branches arising from the adrenolumbar artery toward the outside of the gland were ligated to prevent undesired drug diffusion into the

systemic circulation. The volume of this catheter was fixed at 0.25 ml, and the catheter was connected to a double-infusion pump (model 55-2226, Harvard, south Natick, MA).

Preparation of an extracorporeal adrenal venous circuit. A specially shaped catheter (PE-240) was inserted into the left adrenolumbar vein through the left femoral vein. The catheter was tied at the adrenoabdominal-vena cava junction. The left adrenolumbar vein distal to the gland was ligated to obtain actual adrenal venous blood. The volume of this catheter was fixed at 1.5 ml. Venous blood from the gland was continuously drained into a small blood reservoir to facilitate blood sampling. Venous blood in the reservoir was returned to the dog by a perfusion pump (Masterflex model 7016-52, Cole-Parmer Instrument, Chicago, IL) through a catheter inserted into the right femoral vein at a perfusion rate adjusted to a stabilised initial venous flow. After all surgical procedures were completed, heparin sodium was administered at 200 U/kg iv and then at 100 U/kg every hour. The dog was then allowed a stabilisation period of ~60 min.

Measured parameters. Mean aortic pressure and heart rate were measured and recorded with a polygraph system (model RM-6000, Nihon-Kohden, Tokyo, Japan). Aortic and left adrenal venous blood were simultaneously sampled into graded, chilled tubes for catecholamine analyses. Adrenal venous blood flow was determined by a gravimetric method at each sampling time point (31). Hematocrit was measured in all adrenal venous blood samples. Blood (1.5 ml) was transferred to a centrifuge tube containing 30 μ l of preservative solution (pH 6.5) consisting of ethylene glycol-bis (β -amino-ethyl ether)-*N,N,N,N*-tetraacetic acid (95 mg/ml) and glutathione (60 mg/ml). Blood samples were immediately

centrifuged at 4 °C for 5 min at 14,000 revolutions/min with a refrigerated centrifuge (model 5402, Eppendorf, Hamburg, Germany). Plasma was stored at -80 °C until assayed. Plasma concentrations of adrenaline and noradrenaline were quantified by means of an isocratic high performance liquid chromatographic system (Gilson, Villiers-Le-Bel, France) coupled with an electrochemical detector "Coulchem II" (model 5200; ESA, Bedford, MA) (31). At the end of each experiment, the left adrenal gland was removed and weighed. Adrenal catecholamine data were obtained in net catecholamine output calculated as follows: net output of adrenal catecholamine ($\text{ng} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ of gland) = $([\text{CA}]_{\text{AV}} - [\text{CA}]_{\text{AO}}) \times \text{BF}_{\text{AV}} \times (1 - \text{Hct}_{\text{AV}}) / \text{wet weight of gland}$, where $[\text{CA}]_{\text{AV}}$ is plasma catecholamine concentration in adrenal venous blood, $[\text{CA}]_{\text{AO}}$ is plasma catecholamine concentration in aortic blood, BF_{AV} is adrenal venous blood flow, and Hct_{AV} is adrenal venous blood hematocrit.

Experimental protocol. The present study consisted of two series of experiments. The first series of experiments was to determine the functional existence of the PAC_1 receptor in the PACAP27-induced catecholamine secretion. The first group (28.1 ± 4.8 kg, $n = 6$) of this series served as the control receiving a vehicle (saline 0.9%, pH 7.38) to ensure the reproducibility of the adrenal catecholamine responses to PACAP27 (Sigma Chemical, St-Louis, MO). The two identical doses of PACAP27 (50 ng with concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were administered with an interval of 30 min. One minute after the initial control sample was taken, the vehicle was infused via the catheter inserted into the left adrenolumbar artery at a rate of $0.25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ for 4 min. At the third minute, PACAP27 was added to the vehicle infusion line through a three way stopcock connected to the adrenolumbar arterial catheter. Thus, the vehicle and PACAP27 were simultaneously administered during the last minute of

the infusion. At the end of the 4-min infusion, the administration of both vehicle and PACAP27 was discontinued. Adrenal venous blood samples were obtained for precisely 1 min during the infusion at 1, 2, 3, and 4 min followed by sample collections at 1, 2, 4, 10, 15 and 30 min after the secession of the infusion. The dead volume of the adrenal arterial (0.25 ml) and venous (1.5 ml) catheters was taken into account in relation to the infusion rate and adrenal venous blood flow, respectively. Aortic blood samples (1.5 ml each) were simultaneously obtained during adrenal venous sample collections at these sampling time points. The sample obtained 30 min after the secession of the first infusion served as control for the subsequent intervention. The second administrations of the vehicle and PACAP27 as well as the sequence of blood sample collections followed exactly the same protocol described for the first bloc of the experiment.

In the second (27.3 ± 2.9 kg, $n = 6$) and the third (25.1 ± 0.7 kg, $n = 6$) group of the first series, the catecholamine secretagogue response to PACAP27 (50 ng) was tested in absence and presence of PACAP6-27 (Sigma Chemical), a selective PAC₁ receptor antagonist (23). The second and third group received 7.5 μ g and 15 μ g of PACAP6-27, respectively. During the first bloc of the protocol, the dog received the vehicle followed by PACAP27. In the second bloc, the infusion of either 7.5 μ g or 15 μ g of PACAP6-27, instead of saline, was started 3 min prior to PACAP27 and continued during the fourth minute. At the fourth minute, the infusion of PACAP27 was started so that the antagonist and the agonist were administered simultaneously. Thus, the timing of drug administrations and the sequence of sample collections of adrenal venous and aortic blood were exactly the same as those described for the control group.

The second series consisted of three groups to investigate the relative importance of PAC₁ and VPAC receptors in catecholamine release induced either by PACAP27 or VIP. In the first group (24.5 ± 2.2 kg, $n = 6$), the effect of PACAP27 (50 μ g) was tested in absence and presence of 15 μ g of VIP10-28 (Sigma Chemical), a non-selective VPAC receptor antagonist (27). In the second (25.7 ± 3.4 kg, $n = 6$) group, the catecholamine secretagogue effect of VIP (5 μ g) was evaluated in absence and presence of VIP10-28 (15 μ g). Similarly, the third group (27.4 ± 5.0 kg, $n = 5$) served to test the effect of VIP (5 μ g) in absence and presence of PACAP6-27 (15 μ g). In all groups of this series, the experimental protocols for the sequence of local administrations of the vehicle and the drugs as well as the timing of sample collections of adrenal venous and aortic blood were exactly the same as those described for the first series. Each of the experimental protocols described for both series was applied only once on each animal.

The doses of PACAP6-27 used in this study were selected according to several dose-finding experiments with doses ranging from 1.5 to 15 μ g. The dose of VIP10-28 (15 μ g) was used according to the same molar equivalence with the higher dose of PACAP6-27. The doses of PACAP27 and VIP were selected on the basis of the dose-response relationships of each peptide previously reported from our laboratory (17, 31). The dose of 5 μ g of VIP was used in the present study, as this dose of VIP produced catecholamine responses to an extent similar to that caused by 50 ng of PACAP27 (17, 31).

The animal research committee of the Université de Montréal has approved the experimental protocol. The animals used in this study have been cared for and used in accordance with the principles of the Guide to the Care and Use of Experimental Animals published by the Canadian Council on Animal Care.

Statistical analyses. The statistical evaluations and the calculations of an area under the curve were carried out using a statistical software package (SigmaStat for Windows, Version 2.03; SPSS, Chicago, IL). Differences over an experimental period within the same subjects were assessed by an analysis of variance for repeated measures followed by multiple comparisons with one control using the Dunnett's method. Catecholamine responses to the agonists in absence and presence of the antagonists in the same subjects were analyzed using the paired t-test. This test was made on the net amount of catecholamines released during the first 5 min after the onset of the agonist infusion obtained from the area under the curve of the catecholamine output. Comparisons between different groups were conducted by the use of one-way analysis of variance followed by the Bonferroni t-test. When applicable, a preliminary logarithmic transformation was used to satisfy the condition of a normal distribution of variance (30).

RESULTS

Catecholamine secretion in response to PACAP27. The initial basal values for adrenal venous and aortic catecholamines, mean aortic pressure, heart rate, left adrenal venous blood

flow and hematocrit obtained from six separate groups are summarized in Table XII. These values were not statistically different between groups. Aortic catecholamine levels, mean aortic pressure, heart rate and hematocrit remained relatively stable during and after the local administrations of any drug tested. In the control group receiving the vehicle (saline), the administration of PACAP27 at the dose of 50 ng increased both adrenal venous catecholamine concentration and blood flow without significantly affecting circulating catecholamine concentrations in aortic blood. Consequently, the output of adrenal epinephrine and norepinephrine increased significantly in response to PACAP27 (Fig. 20A). The onset of catecholamine response to PACAP27 was rapid, and the increased catecholamine output returned towards the corresponding pre-infusion control levels within ~10 min after the secession of drug infusion (Fig. 20A). The time-course of catecholamine output as well as the net amount of catecholamines released during the first 5 min after the onset of PACAP27 infusion were highly reproducible upon the repetition of the same dose of PACAP27 with an interval of 30 min (Fig. 20A, B).

Catecholamine response to PACAP27 in the presence of PACAP6-27. In the second and third group of the first series, the onset of catecholamine response to PACAP27 was identical as in the first group of the present series of experiments. In the group receiving a low dose (7.5 μ g) of PACAP6-27, the time-course of the PACAP-induced catecholamine output was attenuated (Fig. 21A). Consequently, the net amount of epinephrine and norepinephrine released during the first 5 min after the onset of PACAP27 infusion was significantly reduced (Fig. 21B). A more pronounced inhibition was obtained in the group receiving the higher dose (15 μ g) of PACAP6-27 (Fig. 22A,B). The PACAP27-induced catecholamine secretion was

thus diminished in a dose-dependent manner when compared between different groups receiving the vehicle, 7.5 μg or 15 μg of PACAP6-27 (Fig. 23). The inhibition obtained with the higher dose of PACAP6-27 (~95%) was significantly greater than that found with the lower dose (~50%) (Fig. 23).

Effects of VIP10-28 and PACAP6-27 on VIP-induced catecholamine secretion. In the first group of the second series receiving VIP10-28 (15 μg), the net quantity of catecholamines released during the first 5 min after the onset of the administration of PACAP27 (50 ng) remained unchanged (Fig. 24). Similarly, the presence of VIP10-28 (15 μg) did not affect the increase in adrenal catecholamine release induced by VIP with the dose of 5 μg (Fig. 25). However, the VIP-induced catecholamine secretion was significantly inhibited by ~80% in the presence of PACAP6-27 with the same dose that blocked the catecholamine response to PACAP27 (Fig. 26).

Both PACAP6-27 and VIP10-28 showed, by themselves, a slight secretagogue effect on the adrenal medulla at the doses used in the present study. For example, catecholamine output significantly increased with the higher dose of PACAP6-27 (Fig 15). Similarly, epinephrine output increased from $10.7 \pm 2.4 \text{ ng}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ to $58.8 \pm 23.0 \text{ ng}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$, $n = 6$) in the presence of VIP10-28. These observations suggest that both antagonists possess the partial agonistic property in the canine adrenal medulla in vivo, as previously shown with PACAP6-38 in rat cerebellar neuroblasts in vitro (9). However, the initially elevated catecholamine output induced by these antagonists was short lasting and returned to the control level before starting the infusion of either PACAP27 or VIP.

DISCUSSION

The present results indicate that local infusion of PACAP27 into the left adrenal gland resulted in a significant increase in adrenal medullary catecholamine secretion in a highly reproducible manner when the same dose was repeated with an interval of ~30 min. The results also show that the secretion of adrenal catecholamines induced by either PACAP27 or VIP was significantly blocked by PACAP6-27, a selective PAC₁ receptor antagonist. However, neither PACAP27- nor VIP-induced catecholamine secretion was affected by VIP10-28, a non-selective VPAC receptor antagonist. The study suggests that the PAC₁ receptor may be functionally involved in locally regulating the adrenal catecholamine secretion induced by either PACAP27 or VIP in the canine adrenal medulla in vivo.

It has been well documented that PACAP is a potent secretagogue of adrenal catecholamines both in vitro and in vivo models (28). An immunofluorescence study revealed the existence of PACAP immunoreactivity in splanchnic nerve terminals in the rat adrenal medulla (13, 21) and in sensory nerve fibers ending on chromaffin cell (4). In the isolated, perfused rat (1) and porcine (26) adrenal gland, it has also been shown that endogenous PACAP was released into the perfusate during splanchnic nerve stimulation. These observations are compatible with the hypothesis that PACAP may play a role as a peptidergic neurotransmitter or neuromodulator in the adrenal gland (4, 26, 1). With respect to the postsynaptic binding sites for PACAP, various studies on the biochemical and pharmacological receptor characterizations indicate that PACAP exerts its biological action by stimulating PAC₁, VPAC, or both receptors (28). The presence of PAC₁ receptors has also

been shown in human adrenal chromaffin cells in vitro (33). The functional pharmacological antagonism, however, has not yet been clearly demonstrated in the adrenal medulla in vivo. In the present study, it is evident that the increase in catecholamine output in response to PACAP27 was blocked by PACAP6-27 in a dose-dependent manner. PACAP6-27 has been shown to specifically antagonize the PACAP1-27-induced response (adenylate cyclase activation) in rat pancreatic cell membranes (23) as well as in human neuroblastoma cell membranes (24). Furthermore, it has been well documented that the adrenal gland contains higher concentration of the PAC₁ receptor as compared to that of VPAC receptor (28). It should also be noted that the present data clearly show that VIP10-28, a VPAC receptor antagonist (27), did not affect the catecholamine response to PACAP27 at the dose equivalent to that of PACAP6-27 in their molar basis. Consequently, it is most likely that the observed inhibition by PACAP6-27 of the catecholamine response to PACAP27 results from the specific antagonism at the level of PAC₁ receptor in the adrenal medulla.

It may be of further interest that the catecholamine response to PACAP27 was almost completely blocked by the higher dose of PACAP6-27. We have previously observed that the similar catecholamine response to PACAP27 was inhibited by nifedipine, an L-type Ca²⁺ channel blocker, to an extent merely of about 50% of the control response (8). However, nifedipine with the same dose that only partially inhibited the catecholamine response to PACAP27 completely blocked the catecholamine release induced by BAY K-8644, a direct acting L-type Ca²⁺ channel activator, under the similar experimental condition (8). Thus, an increase in Ca²⁺ influx via the dihydropyridine sensitive L-type Ca²⁺ channel could be functionally implicated in PACAP27-induced catecholamine secretion both in vitro (14) and

in vivo (8). Nevertheless, the present finding that the blockade of PAC₁ receptor resulted in the almost complete inhibition of the catecholamine response to PACAP27 strongly suggests the principal role for PAC₁ receptor in mediating the secretion of catecholamines induced by PACAP27. The major contribution of PAC₁ receptor to PACAP-induced catecholamine secretion has been further demonstrated in recent studies in the isolated, perfused porcine adrenal gland (26) as well as in PC12 cells from the rat adrenal medulla (25).

Many previous studies have indicated that VIP triggers catecholamine secretion in a variety of experimental models including cultured chromaffin cells (3), isolated, perfused rat adrenal gland (18) as well as in the canine adrenal gland in vivo (7, 31). VIP has been localized in both splanchnic nerve terminals and chromaffin cell (16). Furthermore, VIP could be released into the venous effluent in response to direct splanchnic nerve stimulation in the canine adrenal gland in vivo (6). Although these observations are compatible with the view that VIP plays a role of neurotransmitter in the adrenal medulla (29), a role for the VPAC receptor in the adrenal catecholamine response to VIP still remains obscure.

VIP10-28 has been widely used as a VIP receptor antagonist in a variety of tissues and organs including in HT29 colonic adenocarcinomic cell line (27), the sinus node of the canine heart (12), and the guinea pig and rat tenia coli and gastric fundus strips (10). Nevertheless, VIP10-28 did not affect the catecholamine response to VIP to any significant extent in the present study. Furthermore, we have previously observed that another VIP antagonist, [Lys¹,Pro^{2,5},Arg^{3,4},Tyr⁶]VIP, also failed to block the release of catecholamines induced by VIP in the similar experimental setup in vivo (7). These observations suggest that the failure

of the VIP antagonists in blocking the catecholamine secretion induced by VIP may result, most probably, from the absence of specific receptor for VIP in the canine adrenal medulla. In support of this view, it has previously been reported that the specific receptors for VIP (VPAC₁ and VPAC₂) were undetectable in the adrenal medulla (14). Yet, it should be borne in mind that the inhibitory effect of all VIP antagonists cannot consistently be observed in different tissues and models (5). Another possible explanation may be the dose of VIP10-28, which could be insufficient to exert its blocking action on the VPAC receptor. This is, however, less likely to occur, as the catecholamine response to VIP could be significantly blocked by a molar dose of PACAP6-27 equivalent to that of VIP10-28. In this context, it may be of particular importance to note that VIP usually requires a dose in the range of micromoles to exert its secretagogue effect on the adrenal medulla, while PACAP only needs a dose in the range of nanomoles to achieve a comparable secretory effect. Thus, the ratio of the effective dose of PACAP versus that of VIP would be roughly 1:1000. This difference in the effective doses is most likely to result from the PAC₁ receptor affinity, which is about 1000 times higher for PACAP as compared to that for VIP (11). In this regard, a physiological role for VIP may be less likely than that for PACAP to play in the adrenal medulla. It is of interest that, in the present study, VIP10-28 failed to inhibit the catecholamine response to PACAP27, a finding that further suggests the absence of VIP specific receptor in the canine adrenal medulla, since PACAP27 also possesses a high affinity to both VPAC₁ and VPAC₂ receptors (11). Taken together, these observations are compatible with the hypothesis that VIP exerts its secretagogue effect via the activation of the PAC₁ receptor in the canine adrenal medulla.

In conclusion, the present study was carried out to investigate the functional implication of PAC₁ receptor in vivo and the relative importance of PAC₁ and VPAC receptors involved in the adrenomedullary response to PACAP and VIP. The data indicate that the catecholamine response to either PACAP27 or VIP was significantly blocked by PACAP6-27, a specific PAC₁ receptor antagonist. However, VIP10-28, a non-selective VPAC receptor antagonist, did not affect the catecholamine secretion induced by either PACAP27 or VIP. It is suggested that the VPAC receptor may not functionally be involved in the local regulation of adrenal catecholamine secretion induced by PACAP and VIP. We conclude that the PAC₁ receptor plays a major role in mediating the secretion of catecholamines induced by either PACAP or VIP in the canine adrenal medulla in vivo.

PERSPECTIVES

The present study demonstrates that the PAC₁ receptor plays a primary functional role in mediating the catecholamine secretion induced by exogenous PACAP1-27 and VIP in the canine adrenal medulla in vivo. However, question as to whether endogenous PACAP and VIP in the adrenal medulla could be functionally implicated in pathophysiological situations still remains unanswered. Can these neuropeptides be released in the adrenal gland resulting in modulations of the medullary and cortical functions during the sympathoadrenal activation in response to physiological and/or pathophysiological alterations of the body? To answer, at least in part, to this question, endogenous VIP and PACAP have been shown to be released in response to direct splanchnic nerve stimulation in the canine adrenal gland in vivo (6) and in

vitro (Lamouche et al. unpublished observation), respectively. Yet, the potential release of these neuropeptides in response to more pathophysiological perturbations such as severe hypotension, hemorrhage, or hypoglycemia remains to be confirmed. On the other hand, we have recently shown that the adrenomedullary reactivity was significantly enhanced by exogenous PACAP during either direct splanchnic nerve stimulation (17) or insulin-induced hypoglycemia (32). Taken together, these observations are compatible with the hypothesis that both endogenous PACAP and VIP could be released and stimulate the PAC₁ receptor, and thereby support or facilitate the cholinergic functions in the adrenal medulla during pathophysiological activation of the sympathoadrenal system. However, this hypothesis has to be confirmed before fully accepting the physiological relevance of endogenous PACAP, VIP, and PAC₁ receptor in regulating catecholamine secretion from the adrenal medulla.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Sanae Yamaguchi for her skilled and devoted technical assistance. This work was supported by the grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10605) and, in part, from the Canadian Diabetes Association. Stéphane Lamouche was recipient of a studentship awarded by the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR; 1999-2000) and is now a holder of a doctoral research award from the Canadian Institutes of Health Research.

Received 7 July 2000, accepted in final form 17 October 2000.

Table XII. Initial values for adrenal venous and aortic catecholamines, mean aortic pressure, heart rate, left adrenal venous blood flow and hematocrit, and postmortem wet weight of left adrenal gland in the group receiving either PACAP27 or VIP in presence of various drugs.

Parameters	First series			Second series		
	Gr 1: PACAP27 + Vehicle (n = 6)	Gr 2: PACAP27 + PACAP6-27 (7.5 µg; n = 6)	Gr 3: PACAP27 + PACAP6-27 (15 µg; n = 6)	Gr 1: PACAP27 + VIP10-28 (15 µg; n = 6)	Gr 2: VIP + PACAP6-27 (15 µg; n = 5)	Gr 3: VIP + VIP10-28 (15 µg; n = 6)
AV-EPI, ng/ml	29.1 ± 11.1	30.9 ± 17.6	32.8 ± 17.6	16.9 ± 3.2	13.3 ± 5.4	15.6 ± 5.4
AV-NE, ng/ml	3.9 ± 1.5	7.4 ± 4.3	5.4 ± 2.3	1.3 ± 0.6	2.2 ± 0.9	1.4 ± 0.3
AO-EPI, ng/ml	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.02
AO-NE, ng/ml	0.42 ± 0.12	0.47 ± 0.04	0.42 ± 0.07	0.18 ± 0.03	0.32 ± 0.07	0.32 ± 0.08
MAP, mmHg	151 ± 10.4	142.9 ± 9.3	153.4 ± 14.0	153.4 ± 14.0	145.7 ± 10.7	146.1 ± 9.0
HR, beats/min	166.8 ± 7.9	164.5 ± 6.3	171.3 ± 16.5	181.3 ± 7.4	150.8 ± 10.3	167.0 ± 9.8
AV-BF, ml/min/g	3.8 ± 0.6	4.0 ± 0.8	4.1 ± 0.7	3.5 ± 0.3	4.9 ± 0.8	3.7 ± 0.4
AV-Hct, %	46.2 ± 0.7	45.9 ± 2.4	49.3 ± 2.8	47.9 ± 1.8	47.1 ± 2.5	45.3 ± 1.1
LAG, g	1.22 ± 0.22	1.22 ± 0.16	1.10 ± 0.16	1.06 ± 0.01	1.14 ± 0.16	0.96 ± 0.08

Values are means ± SE; Gr, group; n, number of dogs in each group; AV-EPI, adrenal venous epinephrine; AV-NE, adrenal venous norepinephrine; AO-EPI, aortic epinephrine; AO-NE, aortic norepinephrine; MAP, mean aortic pressure; HR, heart rate; AV-BF, adrenal venous blood flow; AV-Hct, adrenal venous hematocrit; LAG, wet weight of left adrenal gland.

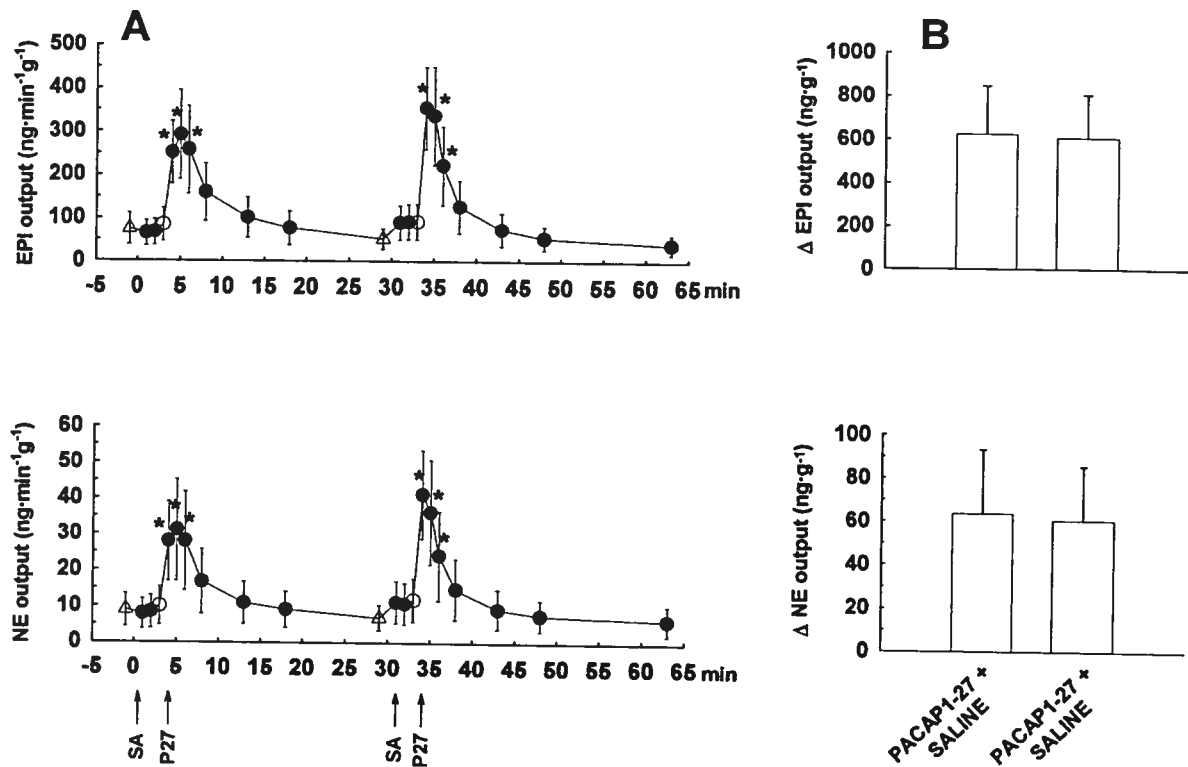


Figure 20. A. Adrenal epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output in response to repeated administrations of PACAP27 (P27, 50 ng) given at 3 and 33 min in the control group receiving the vehicle (saline, SA) as indicated by arrows. Open triangles and open circles represent control values observed immediately before the administration of the vehicle and PACAP27, respectively. Filled circles indicate values observed during and after the infusion of the vehicle and PACAP27. *, $P < 0.05$ versus corresponding control value indicated by an open circle ($n = 6$). B. Net amount of epinephrine (Δ EPI output) and norepinephrine (Δ NE output) released during the first 5 min after the onset of each infusion of PACAP27 as shown in column A.

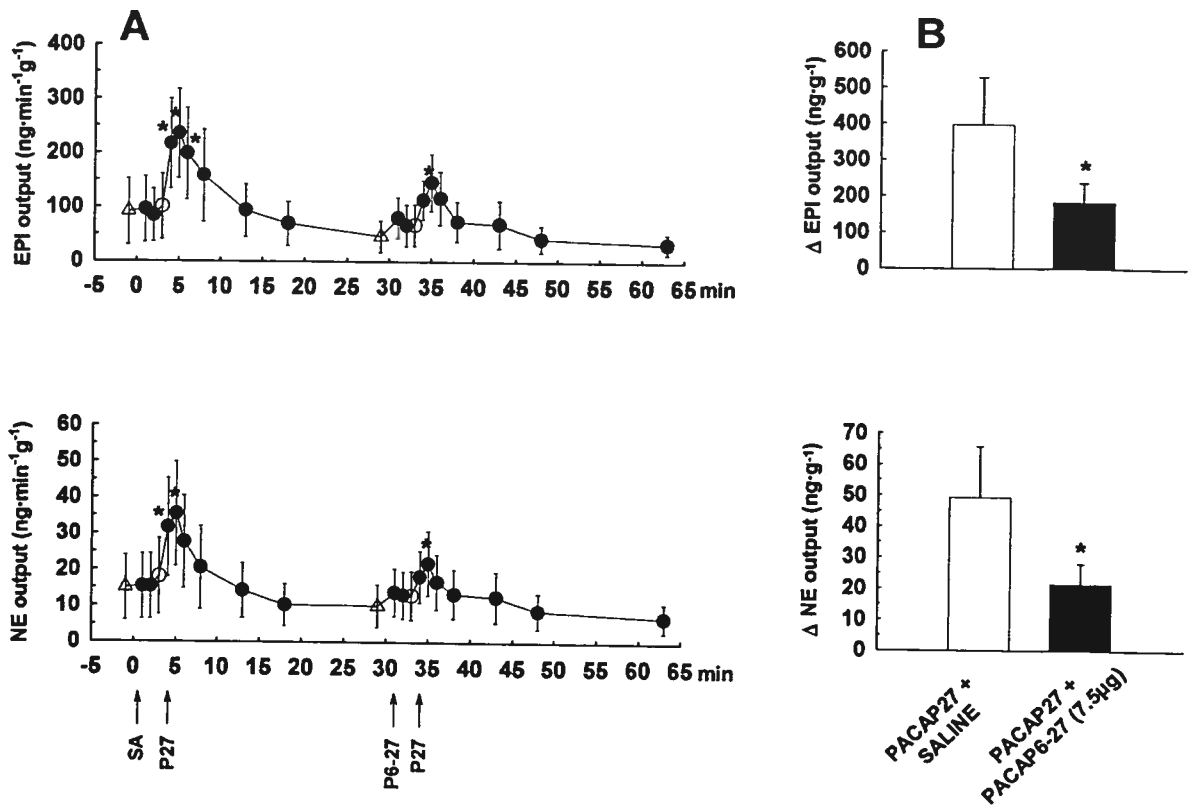


Figure 21. A. Adrenal epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output in response to repeated administrations of PACAP27 (P27, 50 ng) given at 3 and 33 min in the group receiving PACAP6-27 (P6-27, 7.5 µg) as indicated by arrows. Open triangles and open circles represent control values observed immediately before the administration of the vehicle (saline, SA) and PACAP27, or PACAP6-27 and PACAP27, respectively. Filled circles indicate values observed during and after the infusion of the vehicle and PACAP27, or PACAP6-27 and PACAP27. *, $P < 0.05$ versus corresponding control value indicated by an open circle ($n = 6$). B. Net amount of epinephrine (Δ EPI output) and norepinephrine (Δ NE output) released during the first 5 min after the onset of each infusion of PACAP27 (50 ng) in absence (open bars) and presence of PACAP6-27 (filled bars) with the dose of 7.5 µg. *, $P < 0.05$ versus corresponding vehicle control indicated by open bars ($n = 6$).

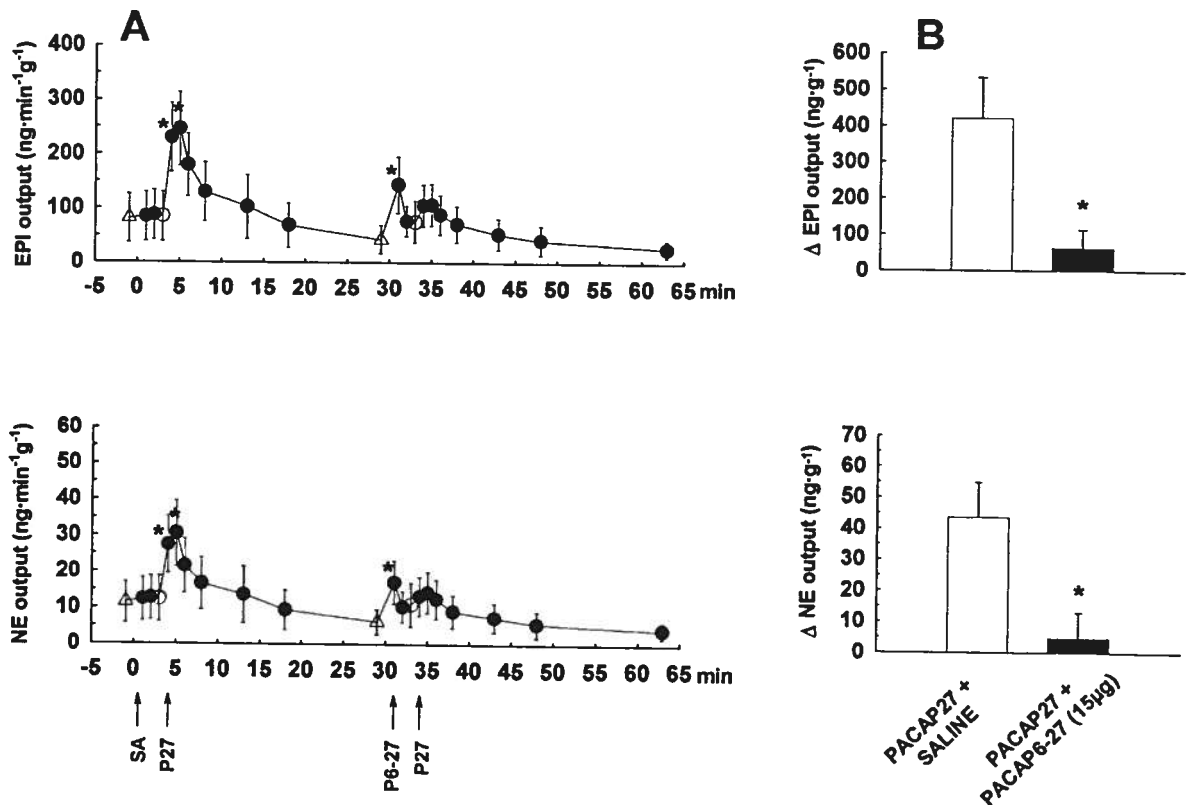


Figure 22. A. Adrenal epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output in response to repeated administrations of PACAP27 (P27, 50 ng) given at 3 and 33 min in the group receiving PACAP6-27 (P6-27, 15 µg) as indicated by arrows. Open triangles and open circles represent control values observed immediately before the administration of the vehicle (saline, SA) and PACAP27, or PACAP6-27 and PACAP27, respectively. Filled circles indicate values observed during and after the infusion of the vehicle and PACAP27 or PACAP6-27 and PACAP27. *, $P < 0.05$ versus corresponding control value indicated by an open circle ($n = 6$). B. Net amount of epinephrine (Δ EPI output) and norepinephrine (Δ NE output) released during the first 5 min after the onset of each infusion of PACAP27 (50 ng) in absence (open bars) and presence of PACAP6-27 (filled bars) with the dose of 15 µg. *, $P < 0.05$ versus corresponding vehicle control indicated by open bars ($n = 6$).

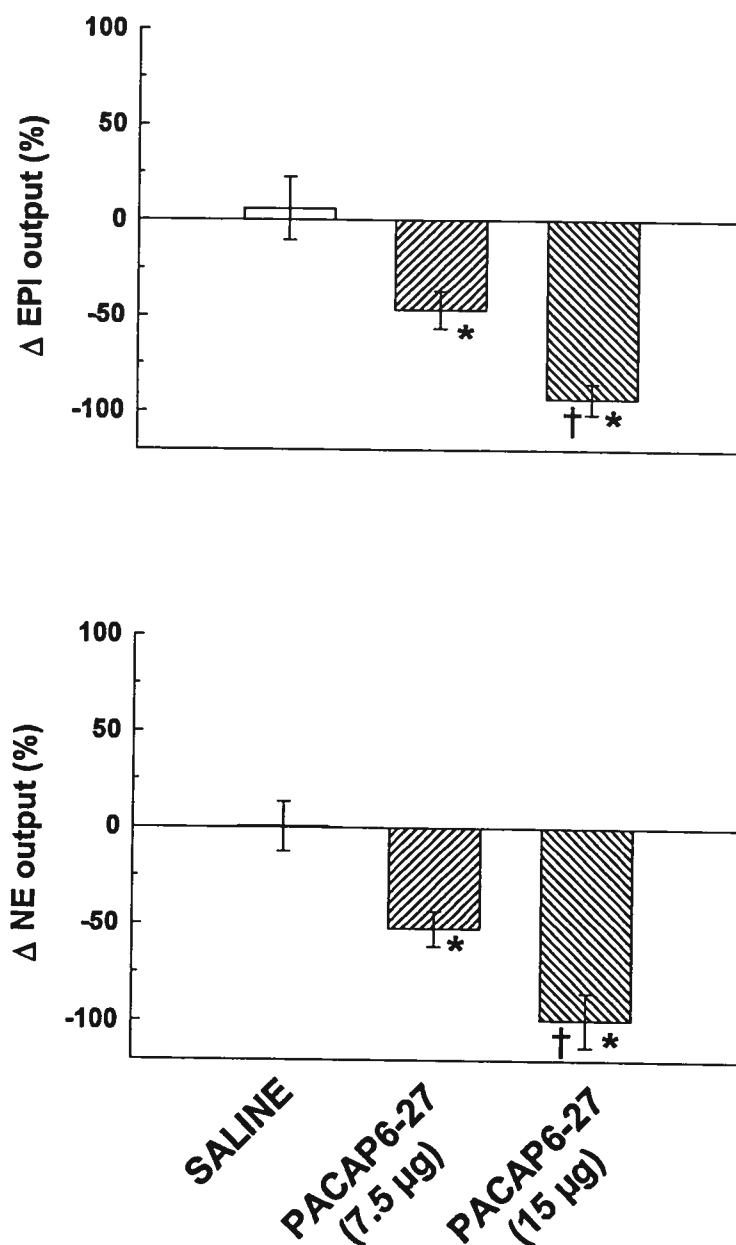


Figure 23. Percent changes in the net amount of epinephrine (Δ EPI output) and norepinephrine (Δ NE output) released during the first 5 min after the onset of the second infusion of PACAP27 (50 ng). Open bars represent the catecholamine responses to PACAP27 in absence of PACAP6-27 (saline control group). Bars filled with up-right and down-right diagonal lines indicate the catecholamine responses to PACAP27 in presence of PACAP6-27 with the dose of 7.5 μ g and 15 μ g, respectively. *, $P < 0.05$ versus the value obtained from the vehicle control group (saline); †, $P < 0.05$ versus the value obtained from the group receiving 7.5 μ g of PACAP6-27. The original data are shown in Figures 14 and 15.

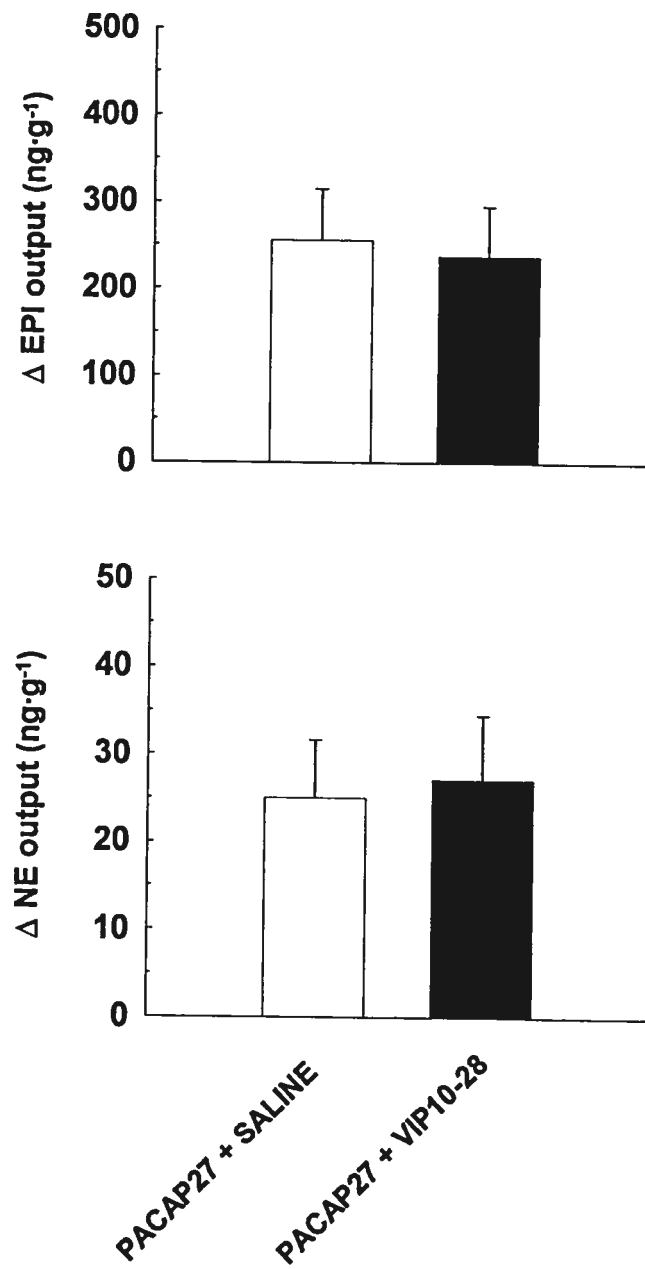


Figure 24. Net amount of epinephrine (Δ EPI output) and norepinephrine (Δ NE output) released during the first 5 min after the onset of each infusion of PACAP27 (50 ng) in absence (open bars) and presence of 15 μg of VIP10-28 (filled bars) ($n = 6$).

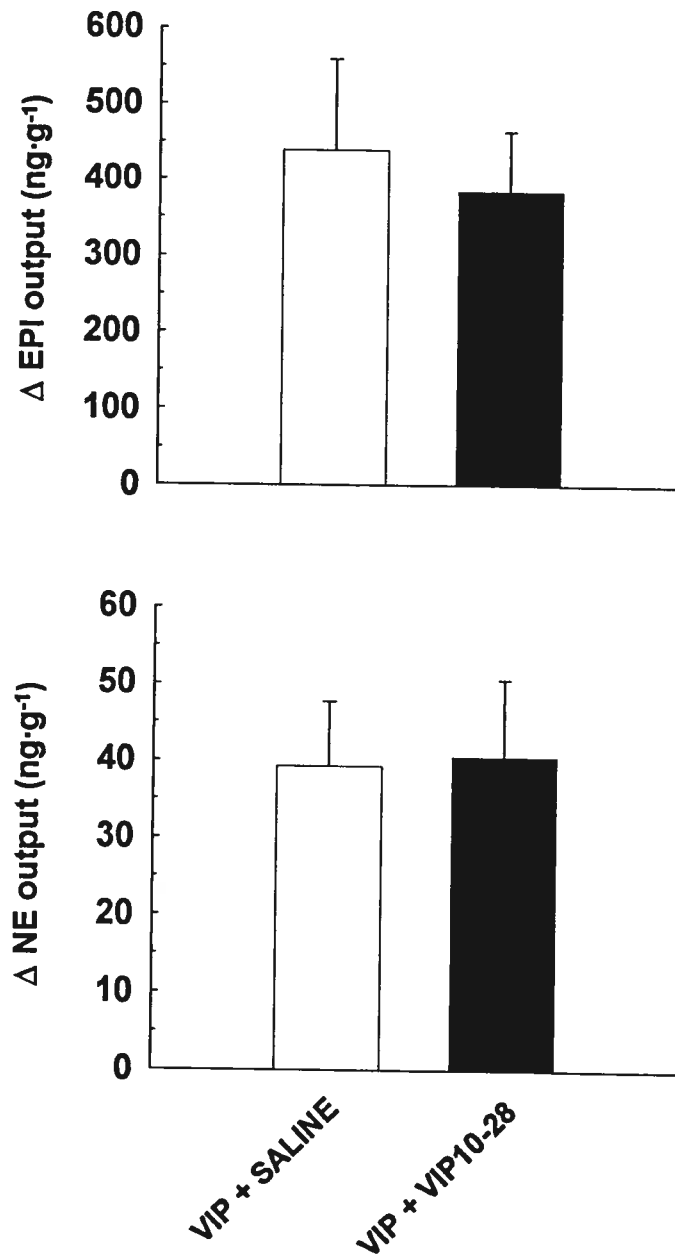


Figure 25. Net amount of epinephrine (Δ EPI output) and norepinephrine (Δ NE output) released during the first 5 min after the onset of each infusion of VIP ($5\ \mu\text{g}$) in the absence (open bars) and presence of $15\ \mu\text{g}$ of VIP10-28 (filled bars) ($n = 6$).

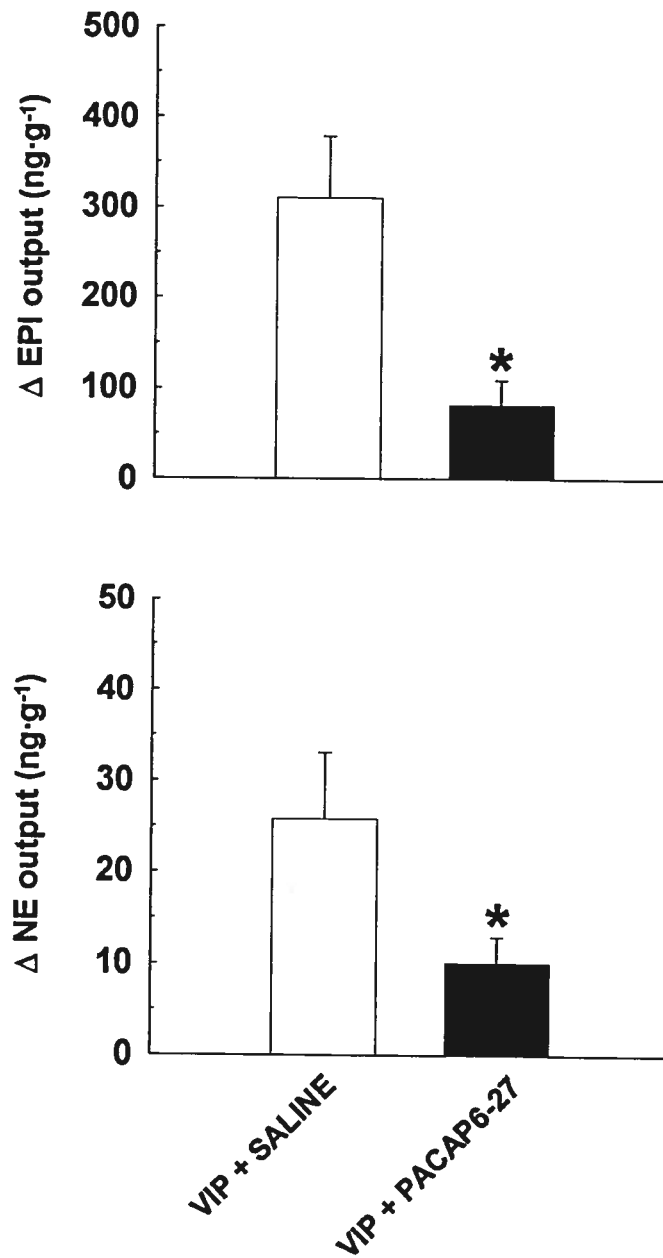


Figure 26. Net amount of epinephrine (Δ EPI output) and norepinephrine (Δ NE output) released during the first 5 min after the onset of each infusion of VIP ($5\ \mu\text{g}$) in absence (open bars) and presence of $15\ \mu\text{g}$ of PACAP6-27 (filled bars). *, $P < 0.05$ versus corresponding vehicle control as indicated by open bars ($n = 5$).

REFERENCES

1. Arimura A, and Shioda S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: Neuroendocrine and endocrine interaction. *Frontiers in Neuroendocrinology* 16: 53-88, 1995.
2. Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, and Kitada C. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129: 2787-2789, 1991.
3. Chowburry PS, Guo X, Wakade TD, Przywara DA, and Wakade AR. Exocytosis from a single rat chromaffin cell by cholinergic and peptidergic neurotransmitters. *Neuroscience* 59; 1-5, 1994.
4. Dun NJ, Tang H, Dun SL, Huang R, Dun EC, and Wakade AR. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-immunoreactive sensory neurons innervate rat adrenal medulla. *Brain Res.* 716: 11-21, 1996.
5. Fahrenkrug J. VIP and autonomic neurotransmission. *Pharmacol. Ther.* 41: 515-534, 1989.

6. **Gaspo R, Yamaguchi N, and de Champlain J.** Correlation between neural release of VIP and adrenomedullary catecholamine secretion in vivo. *Am. J. Physiol.* 268 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 37): R1449-R1455, 1995.
7. **Gaspo R, Lamarche L, De Champlain J, and Yamaguchi N.** Canine adrenal catecholamine response to VIP is blocked by PACAP-(6-27) in vivo. *Am. J. Physiol.* 272 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 41): R1606-R1612, 1997.
8. **Geng G, Gaspo R, Trabelsi F, and Yamaguchi N.** Role of L-type Ca^{2+} channel in PACAP-induced adrenal catecholamine release in vivo. *Am. J. Physiol.* 273 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 42): R1339-R1345, 1997.
9. **Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A, and Vaudry H.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78 (2): 419-430, 1997.
10. **Grider JR, and Rivier JR.** Vasoactive intestinal peptide (VIP) as transmitter of inhibitory motor neurons of the gut: evidence from the use of selective antagonists and VIP antiserum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253 (2): 738-742, 1990.
11. **Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, and Washek JA.** International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for

- vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol. Rev.* 50 (2): 265-270, 1998.
12. Hill MR, Wallick DW, Mongeon LR, Martin PJ, and Levy MN. Vasoactive intestinal polypeptide antagonists attenuate vagally induced tachycardia in the anesthetized dog. *Am. J. Physiol.* 269 (4 Pt 2): H1467-H1472, 1995.
13. Holgert H, Ohlberg K, Hannibal J, Fahrenkrug J, Brimijoin S, Hartman BK, and Hokfelt T. PACAP in the adrenal gland: relationship with choline acetyltransferase, enkephaline and chromaffin cells and effects of immunological sympathectomy. *Neuroreport.* 8 (1): 297-301, 1996.
14. Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, and Nagata S. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 8: 811-819, 1992.
15. Isobe K, Nakai T, and Takuwa Y. Ca²⁺-dependent stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in catecholamine secretion from cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Endocrinology* 132: 1757-1765, 1993.
16. Kondo H. Immunohistochemical analysis of the localization of neuropeptides in the adrenal gland. *Arch. Histol. Jpn.* 48: 453-481, 1985.

17. Lamouche S, Martineau D, and Yamaguchi N. Modulation of adrenal catecholamine release by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 276 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 45): R162-R170, 1999.
18. Malhotra RK, and Wakade AR. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the secretion of catecholamines from the rat adrenal gland. *J. Physiol. Lond.* 388: 285-294, 1987.
19. Miyata A, Arimura A., Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, and Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 567-574, 1989.
20. Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 643-648, 1990.
21. Moller K, and Sundler F. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and PACAP type I receptors in the rat adrenal medulla. *Reg. Peptides* 63 (2-3): 129-139, 1996.

22. Mutt V, and Said SI. Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. *Eur. J. Biochem.* 42: 581-589, 1974.
23. Robberecht P, Wousen-Colle MC, De Neef P, Gourlet P, Buscail L, Vandermeers A, and Vandermeers-Piret MC. The two forms of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-(1-27) and PACAP-(1-38)) interact with distinct receptors on rat pancreatic AR4-2J cell membranes. *FEBS Lett.* 286: 133-136, 1991.
24. Robberecht P, Gourlet P, De Neef P, Woussen-Colle MC, Vandermeers-Piret MC, Vansdermeers A, and Christophe J. Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *Eur. J. Biochem.* 207: 239-246, 1992.
25. Taupenot L, Mahata SK, Wu H, and O'Connor DT. Peptidergic stimulation of secretion and transcription in chromaffin cells: *cis* and *trans* signaling determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *J. Clin. Invest.* 101: 863-876, 1998.
26. Tornoe K, Hannibal J, Andreasen MB, Jensen TB, Fahrenkrug J, and Holst JJ. Neural regulation of adrenal secretion by PACAP 1-38; effects of the PACAP-receptor antagonist PACAP6-38 (Abstract). *Regul. Pept.* 83: 59, 1999.

27. **Turner JT, Jones SB, and Bylund DB.** A fragment of vasoactive intestinal peptide, VIP(10-28), is an antagonist of VIP in the colon carcinoma cell line, HT29. *Peptides* 7(5): 849-854, 1986.
28. **Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, and Vaudry H.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52 (2): 269-324, 2000.
29. **Wakade TD, Blank MA, Malhotra RK, Pourcho R, and Wakade AR.** The peptide VIP is a neurotransmitter in rat adrenal medulla: physiological role in controlling catecholamine secretion. *J. Physiol. (Lond)* 444: 349-362, 1991.
30. **Wallenstein S, Zucker CL, and Fleiss J.** Some statistical methods useful in circulation research. *Circ. Res.* 47: 1-9, 1980.
31. **Yamaguchi N.** In vivo evidence for adrenal catecholamine release mediated by nonnicotinic mechanism: local medullary effect of VIP. *Am. J. Physiol.* 265 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 34): R766-R771, 1993.
32. **Yamaguchi N, and Lamouche S.** Enhanced reactivity of the adrenal medulla in response to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide₁₋₂₇ (PACAP) during insulin-induced hypoglycemia in anesthetized dogs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77: 819-826, 1999.

33. **Yon L, Breault L, Contesse V, Bellancourt G, Delarue C, Fournier A, Lehoux JG, Vaudry H, and Gallo-Payet N.** Localization, characterization, and second messenger coupling of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the fetal human adrenal gland during the second trimester of gestation. *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism* 83 (4): 1299-1305, 1998.

TROISIÈME PARTIE:

PACAP release from the canine adrenal gland in vivo:

Its functional role in severe hypotension

Stéphane Lamouche and Nobuharu Yamaguchi

*American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative
and Comparative Physiology*

284: R588-R597, 2003

RÉSUMÉ

Lamouche, Stéphane, and Nobuharu Yamaguchi. PACAP release from the canine adrenal gland in vivo: functional role in adrenomedullary response to severe hypotension. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 284: R588-R597, 2003.—La présente étude avait pour but de vérifier si le polypeptide activant l'adénylcyclase pituitaire (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*; PACAP) peut être libéré au cours d'une stimulation du nerf splanchnique in vivo, et de déterminer si la présence du PACAP durant une activation réflexe du système sympatho-surrénalien peut moduler la réponse de la médullosurrénale. Les concentrations plasmatiques des catécholamines et du PACAP-38 immunoréactif (PACAP-38-ir) ont augmentées de façon proportionnelle en réponse à une stimulations successives du nerf splanchnique avec des fréquences croissantes (0,2-20 Hz). Les deux réponses furent hautement reproductibles et une étroite relation a été observée entre les augmentations du PACAP-38-ir et celles des catécholamines. L'administration de nitroprussiate de sodium (SNP; 0,1 mg/kg, iv, en bolus) a entraîné une chute importante de la pression artérielle moyenne, provoquant par conséquent une augmentation marquée de la sécrétion des catécholamines. En présence de PACAP-27 (125 ng) administré localement, la réponse maximale des catécholamines fut amplifiée en présence de SNP de façon synergique par rapport à celle obtenue dans le groupe recevant seulement soit le SNP ou soit le PACAP-27. La présente étude indique que le PACAP-38 endogène est libéré particulièrement lorsque le système sympatho-surrénalien est fortement activé, et que la présence locale du PACAP-27 exogène augmente la sécrétion des catécholamines en réponse à une activation réflexe,

suggérant collectivement un rôle facilitateur du PACAP en tant que neuromodulateur dans les fonctions sympatho-surréaliennes in vivo.

SUMMARY

Lamouche, Stéphane, and Nobuharu Yamaguchi. PACAP release from the canine adrenal gland in vivo: functional role in adrenomedullary response to severe hypotension. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 284: R588-R597, 2003.—This study was to investigate if endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) can be released during direct splanchnic nerve stimulation in vivo, and to determine whether PACAP in the adrenal gland can modulate the medullary response to sympathoadrenal reflex. The output of adrenal catecholamine and PACAP-38-like immunoreactivity (PACAP-38-ir) increased in a frequency-dependent manner following direct splanchnic nerve stimulation (0.2–20 Hz). The both responses were highly reproducible and PACAP-38-ir output closely correlated with catecholamine output. Sodium nitroprusside (SNP; 0.1 mg/kg, iv, bolus) caused a severe hypotension resulting in marked increases in catecholamine secretion. In the presence of local PACAP-27 (125 ng), the maximum catecholamine response to SNP was significantly potentiated in a synergistic manner as compared with that obtained in the group receiving SNP or PACAP-27 alone. The study indicates that endogenous PACAP-38 can be released particularly when the sympathoadrenal system is highly activated and that the local exogenous PACAP-27 enhanced the reflex-induced catecholamine release, suggesting

collectively a facilitating role of PACAP as neuromodulator in the sympathoadrenal function in vivo.

INTRODUCTION

The adrenal medullae release catecholamines in response to various stresses that activates the sympathetic nervous system. It is well established that acetylcholine (ACh), the classical cholinergic neurotransmitter released from splanchnic nerve terminals, evokes catecholamine secretion (7). In addition to ACh, it has been acknowledged that various endogenous neuropeptides are co-released along with ACh to mediate and/or modulate catecholamine secretion in response to varying stress. Among several neuropeptides playing a potential role as a non-cholinergic neurotransmitter and/or neuromodulator in the adrenal medulla, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is likely to play a major role.

PACAP is a neuropeptide having two isoforms composed of 27 and 38 amino acids (PACAP-27 and PACAP-38), which are both widely distributed in the central and peripheral nervous systems. The rat adrenal gland contains high concentrations of PACAP as well as PAC₁ receptors (29). PACAP immunoreactive nerve fibers ending on chromaffin cells have also been identified in the rat adrenal gland (6, 12, 27). A few studies in vitro have shown that endogenous PACAP was released in response to direct splanchnic nerve stimulation in isolated, perfused porcine and rat adrenal glands (27, 30) and that the direct nerve stimulation-induced catecholamine secretion was diminished by a PACAP antagonist (8). These previous observations in vitro have suggested that PACAP may play a role of controlling adrenomedullary function during an actual stimulation of the sympathoadrenal system in vivo. However, such a functional implication of PACAP in the sympathoadrenal system in

physiological and/or pathophysiological situations still remains mostly conjectural in the limited number of experimental demonstrations under *in vivo* conditions. Therefore, the present study was carried out: (i) to determine whether endogenous PACAP can be actually released into the adrenal venous effluent during a direct splanchnic nerve stimulation *in vivo*, and (ii) to investigate if locally administered PACAP can effectively modulate the adrenal catecholamine secretion in response to a reflex activation of the sympathoadrenal system in anesthetized dogs.

METHODS

Surgical preparations of the animals. Adult mongrel dogs fasted overnight but allowed free accesses to water were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg iv, followed by 4 mg/kg as needed). Artificial respiration was maintained through an endotracheal tube with a Harvard pump (model 607). The rectal temperature was monitored and kept constant at $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ by means of a thermoregulator (model 74, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH) connected to a heating pad. Physiological saline was slowly administered intravenously during the whole period of the experiment to prevent dehydration. The pH of the physiological saline was adjusted at 7.38 immediately before use. Both femoral arteries were cannulated: the right femoral artery was used to measure aortic pressure and the left femoral artery to obtain aortic blood samples.

Preparation for direct splanchnic nerve stimulation. The direct splanchnic nerve stimulation was applied in the group of animals in which endogenous PACAP-38 was determined in the left adrenal venous effluent. After a median laparotomy and a left flank incision, the left splanchnic nerve was dissected free from surrounding tissues, double ligated ~ 2 cm from the adrenal gland, and protected from dryness by applying mineral oil. Direct electrical stimulation was applied to the distal end of this nerve. All the other nerves to the left adrenal gland from the lumbar paravertebral sympathetic ganglia and from the celiac-superior mesenteric plexus were double ligated and cut within ~ 2 cm from the gland to prevent undesired retrograde nerve conduction during direct splanchnic nerve stimulation (9, 35).

Preparation of local intra-arterial drug infusion to the left adrenal gland. Following a median laparotomy and a left flank incision, the left adrenolumbar artery was dissected free from surrounding tissue for installation of a cannula in a retrograde manner, i.e., from the peripheral end towards the gland and aorta (34). The catheter (PE-90) was inserted so that the tip reached beneath the gland or to a point close to the adrenolumbar arterial-aortic junction. All visible branches arising from the adrenolumbar artery toward the outside of the gland were ligated to prevent undesired drug diffusion into the systemic circulation. The volume of this catheter was fixed at 0.5 ml, and the catheter was connected to an infusion pump (model 1140-001, Harvard). PACAP-27 was locally infused to the left adrenal gland through this catheter at a fixed rate of 0.5 ml/min.

Preparation of the extracorporeal adrenal venous circuit. Adrenal venous blood was sampled through a polyethylene catheter (PE-240) specially shaped at one end for easy

introduction and inserted into the left adrenolumbar vein via the left femoral vein. The catheter was tied at the adrenoabdominal-vena cava junction to prevent adrenal venous blood contamination with abdominal vena cava blood. The left adrenolumbar vein, distal to the gland, was ligated to obtain actual adrenal venous blood. Venous blood from the gland was drained into a small blood reservoir filled with saline. The volume of this catheter was fixed at 1.5 ml. Blood volume in the reservoir was kept as small as possible and the venous blood was returned to the dog using an automatic blood level controller connected to an infusion pump (Masterflex model 7016-52, Cole-Parmer Instrument, Chicago, IL) through a catheter inserted into the right femoral vein at a perfusion rate adjusted to a stabilized initial venous flow (34).

Preparation of acute surgical denervation of the left adrenal gland. In a separate group, a relative contribution of the local splanchnic input to the adrenal medulla was tested during a reflex activation of the sympathoadrenal system induced by a severe hypotension with an intravenous injection of sodium nitroprusside (SNP; Sigma Chemical, St-Louis, MO). To this end, an acute surgical denervation of the left adrenal gland was performed by cutting the left splanchnic nerve according to our previously reported procedure (35). All the other nerves to the left adrenal gland were cut following the same method described for preparing the direct splanchnic nerve stimulation. After all surgical procedures were completed, sodium heparin (200 U/kg iv) was administered, followed by 100 U/kg every hour thereafter. Dogs were then allowed a stabilization period of ~ 60 min.

Measured parameters. Mean aortic pressure and heart rate were measured and recorded with a polygraph system (model RM-6000, Nihon-Kohden, Tokyo, Japan). Aortic

Role of PACAP in sympathoadrenal regulation

and left adrenal venous blood was simultaneously sampled into graded, chilled tubes for catecholamine analyses. In experiments with direct splanchnic nerve stimulation, plasma concentrations of endogenous PACAP-38 were also determined in the same blood samples served for catecholamine measurements. Adrenal venous blood flow was determined by a gravimetric method at each sampling time point (34). Hematocrit was measured in all adrenal venous blood samples. For the catecholamine measurements, an aliquot of 1.5 ml of blood was transferred to a centrifuge tube containing 30 μ l of preservative solution (pH 6.5) consisting of ethylene glycol-bis (β -amino-ethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (95 mg/ml) and glutathione (60 mg/ml). These blood samples were immediately centrifuged at 4 °C for 5 min at 14,000 revolutions/min with a refrigerated centrifuge (model 5402, Eppendorf, Hamburg, Germany). Plasma was stored at -80 °C until assayed. Plasma concentrations of epinephrine and norepinephrine were quantified by means of an isocratic high performance liquid chromatographic system (Gilson, Villiers-Le-Bel, France) coupled with an electrochemical detector "Coulchem II" (model 5200; ESA, Bedford, MA) (34). At the end of each experiment, the left adrenal gland was removed and weighed. Adrenal catecholamine data were obtained in net catecholamine output calculated as follows: net output of adrenal catecholamine ($\text{ng}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of gland) = $([\text{CA}]_{\text{AV}} - [\text{CA}]_{\text{AO}}) \times \text{BF}_{\text{AV}} \times (1 - \text{Hct}_{\text{AV}}) / \text{wet weight of gland}$, where $[\text{CA}]_{\text{AV}}$ is plasma catecholamine concentration in adrenal venous blood, $[\text{CA}]_{\text{AO}}$ is plasma catecholamine concentration in aortic blood, BF_{AV} is adrenal venous blood flow, and Hct_{AV} is adrenal venous blood hematocrit. For aortic and adrenal venous PACAP-38 measurements, an aliquot of 4 ml of blood was transferred to a chilled polypropylene test tube containing disodium EDTA (1 mg/ml of blood). Plasma PACAP-38 concentration was determined by radioimmunoassay with a commercial kit (RIK-8920, Peninsula Laboratories,

San Carlos, CA). The protease inhibitor aprotinin was not used in this study, because we have previously shown that peptide concentrations in plasma were similar either in the presence or absence of aprotinin at the concentration of 500 KIU/ml of blood (10).

Experimental protocol. The present study consisted of three separate series of experiments. The first series contained one experimental group (29.9 ± 1.2 kg; $n = 6$) that served to determine if endogenous PACAP-38 is actually released into the adrenal venous effluent during a direct splanchnic nerve stimulation under in vivo conditions. In this group, the distal end of tightly double-ligated left splanchnic nerve was stimulated with bipolar platinum electrodes by rectangular pulses of supramaximal voltage (12 V) by means of an electronic stimulator (model SEN-3301; Nihon Kohden). The stimulation period consisted of three successive stimuli with three different frequencies, 0.2, 2, and 20 Hz, each lasting 2 min, without interruption between each stimulus. The pulse duration was also modified in such a manner that the splanchnic nerves received the identical total pulse duration during each stimulus, which corresponds to a single pulse duration of 20, 2, and 0.2 ms for each frequency of 0.2, 2, and 20 Hz, respectively (10). Adrenal venous blood was separately collected into a chilled, graded tube during each stimulus (2 min), for a total period of 6 min. The dead volume of the adrenal venous catheter (1.5 ml) was taken into account for blood collection during each stimulus. Aortic blood samples (4 ml) were simultaneously obtained during adrenal venous sample collections at every sampling time point. After a 30 min stabilization period, another control sample of aortic and adrenal venous blood was taken, and a second stimulation period was applied under exactly the same conditions to ensure the reproducibility of the peptide response.

The second series involved four groups of experiments. This series served to evaluate whether the presence of locally administered PACAP-27 (Sigma Chemical, St-Louis, MO) could modulate the adrenal catecholamine secretion in response to a reflex activation of the sympathoadrenal system during the SNP-induced severe hypotension. The experiments of this series were designed so that a possible interaction between SNP (depicting the reflex-mediated splanchnic neural drive to the adrenal medulla) and PACAP-27 can be evaluated by means of a two-way analysis of variance.

The first group (21.5 ± 1.2 kg, $n = 8$) received a local infusion of the vehicle (saline 0.9%, pH 7.38) combined with a simultaneous intravenous bolus injection of the vehicle and served as the control. One minute after the initial control sample was taken, the vehicle was infused into the left adrenolumbar artery at a rate of 0.5 ml/min for 5 min. The dead volume of the adrenal arterial catheter (0.5 ml) was taken into account in relation to the infusion rate. Similarly, the dead volume of the adrenal venous catheter (1.5 ml) was taken into consideration in relation to adrenal venous blood flow while adrenal venous blood samples were collected. At the onset of vehicle infusion (designated min 0), a bolus injection of the vehicle was given intravenously. An adrenal venous blood sample was obtained during the first min of vehicle infusion (*0-1 min*) with a delay depending on the venous blood flow, followed by sample collections at *1-2*, *2-3*, *3-4*, and *4-5 min* during the whole period of vehicle infusion lasted for 5 min. Samples were also collected at *5-6*, *6-7*, *10-11*, *15-16*, *30-31* and *45-46 min* after cessation of the vehicle infusion. The duration of each adrenal venous

sample collection was thus fixed to 1 min. Aortic blood samples (1.5 ml each) were simultaneously obtained during adrenal venous sample collection at these sampling points.

The second group (29.2 ± 3.5 kg, $n = 8$) received a local infusion of the vehicle combined with a simultaneous intravenous bolus injection of SNP (0.1 mg/kg; Sigma Chemical) and served as the SNP-induced hypotension group. The experimental protocol for this group followed the same procedures as those described above.

The third group (23.5 ± 1.6 kg, $n = 8$) received a total dose of 125 ng of PACAP-27 given locally to the left adrenal gland via the left adrenolumbar artery with the concentration of 50 ng/ml at the infusion rate of 0.5 ml/min for precisely 5 min. Instead of SNP, a bolus of saline was given intravenously at the onset of PACAP-27 infusion. This group served as the PACAP-induced catecholamine secretion group. The procedures for drug administrations and sample collections were exactly the same as those described for the vehicle control group. After taking an aliquot of 1.5 ml of adrenal venous blood (for plasma catecholamine quantification) from the first seven samples obtained during and after the drug infusion, the remaining blood was not return to the dog to prevent potential systemic hemodynamic changes due to the released catecholamine.

Finally, the fourth group (26.8 ± 3.4 kg, $n = 8$) received a local infusion of PACAP-27 (125 ng as a total dose, see above) to the left adrenal gland combined with a bolus intravenous injection of SNP (0.1 mg/kg) at the onset of PACAP-27 infusion. The protocol for blood sampling followed exactly the same procedures described for the vehicle control group.

The third series, consisted of one group (26.9 ± 1.6 kg, $n = 8$), served to assess the relative contribution of the splanchnic neural pathway in the sympathoadrenal counter-response to SNP-induced severe hypotension. This group received both the acute surgical denervation of the left adrenal gland and intravenous bolus injection of SNP (0.1 mg/kg, iv bolus). The vehicle was locally infused to the left adrenal gland. The experimental protocols for the sequence of the drug administration as well as the timing for sample collections of adrenal venous and aortic blood were exactly the same as those described for the second series of experiments.

The concentration of PACAP-27 used in this study was selected on the basis of our previous observations obtained under similar experimental conditions (36). The period of PACAP-27 infusion, however, was fixed for 5 min to ensure the presence of PACAP-27 in the adrenal gland during a period of the maximal sympathoadrenal reflex stimulation, which could be estimated to be about 5 min according to the time-course of adrenal catecholamine secretion following the intravenous administration of SNP alone. The dose of SNP was chosen on the basis of several dose-finding pilot experiments in which a bolus intravenous injection of SNP caused a severe fall in arterial pressure from which the animals could recover over a given experimental period. Each of the experimental protocols described for all series was applied only once in each animal. All surgeries and experimental procedures were carried out while the dogs were under full surgical anesthesia. All experiments were acute, terminal procedures. The experimental protocols have been approved by the animal research committee of the Université de Montréal. The animals used in this study have been cared for

and used in accordance with the Guiding principles for research involving animals and human beings published by the American Physiological Society (ref. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 283: R281-R283, 2002).

Statistical analyses. The statistical evaluation was made using a package of statistical software (SigmaStat for Windows, version 2.03; SPSS, Chicago, IL). Differences over a given experimental period were assessed by an analysis of variance for repeated measures followed by multiple comparisons with one control using the Dunnett's method. A two-way analysis of variance was conducted to assess possible interaction between PACAP-27 and SNP. This test was made on the maximal net amount of catecholamines released during the first 5 min following the SNP administration and/or PACAP-27 infusion. When applicable, a preliminary logarithmic transformation was used to satisfy the condition of a normal distribution of variance (32). All results are expressed as means \pm SE, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Responses to a direct splanchnic nerve stimulation. Values for plasma concentrations of catecholamines and PACAP-38-ir in adrenal venous and aortic blood, mean arterial pressure, heart rate and adrenal venous blood flow obtained before and during splanchnic nerve stimulation are summarized in Table XIII. During the first stimulation period, both adrenal venous catecholamine concentrations and blood flow raised in response to the three

Role of PACAP in sympathoadrenal regulation

successive stimuli following a frequency-dependent manner, reaching a statistically significant level at the frequencies of 2 and 20 Hz. PACAP-38-ir concentrations also increased in a frequency-dependent manner and reached a significant level at the highest frequency tested (20 Hz), at which the concentration of PACAP-38-ir was approximately two-fold higher than the basal value (Table XIII). Aortic blood catecholamine and PACAP-38-ir concentrations and hemodynamic parameters remained unchanged. Consequently, the output of adrenal catecholamines and PACAP-38-ir increased in a similar profile to that observed in their concentrations (Fig. 27). The catecholamine and PACAP-38-ir responses to the direct splanchnic nerve stimulation returned to their respective basal control levels by 30 min after the cessation of the first bloc of stimulation. These secretory responses were highly reproducible upon repetition of the subsequent stimulation given with an interval of 30 min (Fig. 27). Furthermore, the correlation analyses revealed that the release of PACAP-38-ir strongly correlated with epinephrine ($r^2 = 0.915$, $n = 8$, $P = 0.0002$) and norepinephrine ($r^2 = 0.909$, $n = 8$, $P = 0.0002$) outputs.

Responses to a severe hypotension. In the group receiving SNP alone, the administration of SNP caused an immediate and marked decrease (~ 60%) in the mean arterial pressure (Fig. 28C). During this hypotensive period, the plasma catecholamine concentrations (Table XIV) and outputs (Fig. 28A-B) increased markedly, reaching the maximum level at least ~ 15 (norepinephrine concentration) to ~ 25 (epinephrine concentration) times higher than the corresponding control value observed before the SNP administration. The onset of catecholamine responses to the fall in arterial pressure was rapid, and the increased catecholamine outputs returned to their corresponding control levels ~ 15 min following the

Role of PACAP in sympathoadrenal regulation

SNP administration (Fig. 28A-B). Plasma catecholamine concentrations in aortic blood and heart rate also increased in response to the severe hypotension (Table XIV) while adrenal venous blood flow decreased (Table XIV).

Responses to a local PACAP-27 infusion. In the group receiving PACAP-27 alone, the intra-arterial infusion of PACAP-27 to the left adrenal gland with a dose of 125 ng, did not cause significant changes in circulating catecholamine concentrations in aortic blood, mean arterial pressure, and heart rate. Adrenal venous catecholamine concentrations and blood flow increased significantly (Table XIV). Consequently, the output of both epinephrine and norepinephrine increased in response to PACAP-27 infusion (Fig. 28A & B). This increase in catecholamine output was rapid, and the peak response was observed during the infusion. The increased catecholamine output returned to the corresponding control levels ~10 min after the cessation of infusion.

Catecholamine responses to PACAP-27 during severe hypotension. An important fall in mean arterial pressure occurred immediately after the bolus intravenous injection of SNP following a similar profile to that obtained in dogs receiving SNP alone. The adrenal catecholamine output increased markedly in response to severe hypotension with a concomitant local infusion of PACAP-27 (Fig. 28A & B). Aortic catecholamine concentrations and heart rate also increased while, adrenal venous blood flow did not change significantly (Table XIV).

The changes in the net catecholamine responses, defined as delta (Δ) catecholamine output, observed during the infusion of the vehicle alone, the SNP-induced hypotension alone, the PACAP-27 alone, and the SNP-induced hypotension combined with the local PACAP-27 infusion are summarized in Fig. 22. Those catecholamine responses were calculated from the peak responses obtained during the first 5 min following SNP injection and/or PACAP-27 infusion. In the presence of PACAP-27, the maximum increase in catecholamine secretion during SNP-induced hypotension was significantly greater than that observed in the group receiving either SNP or PACAP27 alone (Fig. 29). Furthermore, a two-way analysis of variance performed on these maximum responses revealed the presence of a significant interaction between the SNP- and the PACAP-mediated catecholamine responses ($P = 0.005$ for epinephrine; $P = 0.039$ for norepinephrine), indicating a synergistic interaction between these two factors.

Responses to severe hypotension in dogs with left adrenal denervation. In the group receiving the acute left adrenal denervation, a bolus intravenous injection of SNP caused an immediate and marked decrease in the mean arterial pressure (Fig. 30C). However, both outputs and plasma concentrations of epinephrine and norepinephrine increased only slightly in response to the severe hypotension (Fig. 30A & B, Table XV). The maximum net catecholamine outputs during SNP-induced hypotension were significantly attenuated by ~85% ($P = 0.045$ for epinephrine; $P = 0.021$ for norepinephrine) in the group receiving the acute left adrenal denervation as compared to those obtained in dogs with the normal left adrenal innervation (Fig. 31A & B). Aortic epinephrine and norepinephrine concentrations,

and heart rate also increased in response to severe hypotension (Table XV). Adrenal venous blood flow decreased significantly during the SNP challenge (Table XV).

DISCUSSION

The aims of the present study were to evaluate if endogenous PACAP could be actually released into the adrenal venous effluent during direct splanchnic nerve stimulation *in vivo*; and to determine whether the presence of exogenous PACAP in the adrenal gland could locally modulate the adrenomedullary function during sympathoadrenal reflex activation in anesthetized dogs. Direct splanchnic nerve stimulation caused significant increases in the release of both adrenal catecholamines and PACAP-38-ir in a frequency-dependent manner, showing strong correlations between the output of catecholamines and PACAP-38-ir. The results also indicate that the adrenal catecholamine response to the SNP-induced severe hypotension was significantly enhanced in a synergistic manner in the presence of PACAP-27 administered locally to the adrenal gland, showing a facilitating interaction between these two factors.

In the present study, we measured endogenous PACAP-38-ir in the local adrenal venous blood under basal conditions as well as during direct splanchnic nerve stimulation, since the tissue distribution of endogenous PACAP-38 predominates over the other isomer (2), and because immunoreactive PACAP has been localized to splanchnic nerve fibers innervating chromaffin cells in the adrenal medulla (6, 12, 26, 27). Our present data show for

the first time in vivo that endogenous PACAP-38 could be released into the adrenal venous effluent during direct splanchnic nerve stimulation following a frequency-dependent manner and reaching a statistical significance with the highest frequency (20 Hz) tested. This in vivo finding is consistent with previous in vitro observations in that the release of endogenous PACAP-38 during either transmural or direct nerve stimulation occurred only when the relatively high frequencies (10 – 16 Hz) were applied in the isolated, perfused rat (30) and porcine (27) adrenal gland. In addition, we also found in this study that the stimulation-induced release of PACAP-38-ir could be closely correlated with that of epinephrine and norepinephrine under in vivo conditions. Although the adrenal catecholamine secretory response is primarily controlled by the classical neurotransmitter, acetylcholine (12), the present observation may imply the existence of functional interaction in the adrenal gland between endogenous PACAP and catecholamine secretions by modulating the cholinergic neurotransmission during the sympathoadrenal activation in certain physiopathological situations (12, 15).

Under certain conditions associated with stress such as severe hypotension, a reflex activation of the sympathoadrenal system occurs to rapidly restore the cardiovascular homeostasis (16). In the present experiment, the intravenous injection of SNP caused a rapid and severe fall in mean arterial blood pressure associated with an immediate and significant rise in the adrenal catecholamine secretion. It has been well documented that the hypotensive effects of intravenous SNP are due to peripheral vasodilatation and reduction in peripheral resistance as a result of the action of released nitric oxide on the vascular beds (1, 28). The immediate adrenomedullary response to the SNP-induced hypotension, therefore, may have

resulted from the baroreflex-mediated sympathoadrenal stimulation, since the left adrenal catecholamine response was diminished by about 85% in dogs receiving the acute surgical denervation of the left adrenal gland. With respect to the validity of the acute surgical denervation used in the present study, we have previously shown that the centrally mediated adrenomedullary response to bilateral carotid occlusion was almost completely diminished in the denervated left adrenal gland (35). In the present study, plasma catecholamine concentrations in aortic blood significantly increased during the SNP-induced hypotension in dogs with the denervated left adrenal gland. This increase in circulating catecholamines may be due most probably to the increased catecholamine output from the right adrenal gland that has been kept normally innervated. Thus, the lack of the catecholamine response in the left denervated adrenal gland during the severe hypotension ensures the functional existence of the splanchnic neural pathway mediating the medullary secretion during the reflex activation of the sympathoadrenal system.

While the two PACAP isoforms are very potent secretagogues in the adrenal medulla both in vitro and in vivo (29), we have previously shown that under the similar experimental conditions, the amplitude of adrenal catecholamine response to PACAP-27 was at least three times greater than that obtained with PACAP-38 on the same molar basis in anesthetized dogs (11). In the present experiments, we therefore used PACAP-27 to ensure the adrenal catecholamine response to PACAP. In dogs receiving PACAP-27 alone, the local administration of this peptide to the normally innervated adrenal gland resulted in marked increases in the catecholamine secretions without significantly affecting the mean arterial blood pressure. The catecholamine response to PACAP-27 may have resulted most probably

from its specific action on the PAC₁ receptor, as the presence of PACAP6-27, a selective PAC₁ receptor antagonist (22, 23), in the adrenal gland almost completely blocked the PACAP-27-induced catecholamine response under similar experimental conditions in anesthetized dogs (18). Even if PACAP6-27 may have certain affinity for VPAC₂ receptor as in the case of PACAP6-38 (13), this possibility does not seem to have direct relevance to the adrenal gland in which the PAC₁ receptor is almost exclusively expressed (19). Moreover, the observation that arterial blood pressure did not significantly change during PACAP-27 infusion is consistent with the view that the PACAP-27-induced increase in catecholamine secretion resulted from its local action on the adrenal medulla and not from secondary reflexive effects due to hypotension that could also be produced by PACAP when administered intravenously (24, 25).

Adrenal venous blood flow remained statistically unchanged during the concomitant administration of PACAP-27 and SNP, while increased with PACAP-27 alone and decreased with SNP alone. It has been demonstrated that in anesthetized dogs, SNP-induced hypotension with a decrease of mean arterial pressure of ~ 55% caused a significant reduction of blood flow in the ascending aorta, celiac, superior mesenteric, renal and iliac arteries (3). In the light of these observations, the severe hypotension (~ 60% of control) provoked in the group receiving SNP alone might have induced a similar reduction of blood flow in the abdominal region, ultimately resulting in a diminished blood supply to the adrenal gland. On the other hand, PACAP is also known to be a potent vasodilator (24, 25). In the present study, however, PACAP-27 was locally administered to the adrenal gland without producing any significant systemic effects. Since PACAP is such a potent vasodilator, the elevation in

adrenal blood flow during a single infusion of PACAP-27 alone may have resulted from its local vasodilating effect. Therefore, when both SNP and PACAP-27 were administered concomitantly through their respective routes (intravenously and local arterial infusion, respectively), it is most likely that PACAP-27 evoked a local adrenal vasodilatation that counteracted a decrease in adrenal blood supply due to the SNP-induced severe hypotension. The net result of both effects is finally illustrated by a null gain in the adrenal venous blood flow.

The synergistic effect of PACAP-27 on the adrenal catecholamine secretion, observed in the present study, may have resulted most probably from the local interaction of PACAP-27 with the operative splanchnic neurotransmission largely mediated by neural acetylcholine in the adrenal medulla during the SNP-induced hypotension. In this context, we have previously shown that in the similar experimental setup, locally applied PACAP-27 synergistically enhanced the adrenal catecholamine secretion induced by either direct splanchnic nerve stimulation or the local administration of acetylcholine to the adrenal gland in anesthetized dogs (17). Taken together, these previous and the present observations suggest that the presence of PACAP in the adrenal medulla enhances adrenal catecholamine secretion either by facilitating the release of neural acetylcholine or by postsynaptic multiple intracellular interactions with various second messengers (31). While a potential PACAP-induced presynaptic facilitation of acetylcholine release has been suggested by the enhanced cardiac parasympathetic cholinergic neurotransmission in anaesthetized dogs (14, 25), the site of interaction in the canine adrenal gland cannot precisely be determined in the present study.

With respect to a potentially functional role of either endogenous PACAP-27 or PACAP-38, both peptides would theoretically play a similar role of facilitating the catecholamine secretion, because both peptides have the same binding affinity to PAC₁ receptor (13). The relative potency, however, as judged from the catecholamine releasing effects of exogenous PACAP27 and PACAP38 on the canine adrenal gland (11), must be greater with PACAP27 if the latter peptide can be actually released along with PACAP38. Nevertheless, it has been reported that, in the porcine adrenal gland in vitro, the tissue content of PACAP-27 was found to be only 1% of that of PACAP-38, and that, perhaps more importantly, PACAP-27 could not be detected in the adrenal venous perfusate following direct splanchnic nerve stimulation (27). As endogenous PACAP38 could be released into the venous effluent in the porcine adrenal in vitro (27) as well as in the canine adrenal in vivo during direct splanchnic nerve stimulation as observed in this study, it is conceivable that PACAP-38 rather than PACAP-27 may play a role of a neuromodulator to facilitate the sympathoadrenal activity in a certain physiopathological situation. Nevertheless, a possible implication of endogenous PACAP-27 in the canine adrenal gland in vivo cannot completely be excluded in the present study.

Under the present experimental conditions, however, the magnitude of adrenal catecholamine release during the SNP-induced hypotension is roughly equivalent to or even smaller than that obtained at 2 Hz in the group receiving direct splanchnic nerve stimulation. Based on this rather over-simplified comparison, it appears unlikely that a significant amount of endogenous PACAP can be released from splanchnic nerve endings during severe hypotension. On the other hand, however, it must be noted that the concentration of

endogenous PACAP-38 found in this study was obtained in the adrenal venous effluent, leaving a possibility that its intrasynaptic concentration at the adrenomedullary synapse may be much more elevated to an extent sufficient to modulate the cholinergic neurotransmission. Also, it has been well documented that the general anesthesia including the one with pentobarbital-Na considerably blunts peripheral responses to the baroreceptor-mediated reflexes (5). Under a less suppressive anesthesia, the SNP-induced hypotension may have generated a greater sympathoadrenal response, a condition under which endogenous PACAP may be preferentially released from the splanchnic nerves.

In conclusion, the present study demonstrates that endogenous PACAP-38 can be released in the adrenal medulla during direct splanchnic nerve stimulation at a preferably high frequency under in vivo conditions. The study also indicates that the presence of exogenous PACAP-27 in the adrenal gland potentiates in a synergistic manner the catecholamine secretion during SNP-induced severe hypotension. Taken together, these results are compatible with the view that PACAP may play a functional role as a local neuromodulator in facilitating or sustaining adrenal catecholamine secretion during severe activation of the sympathoadrenal system. However, the actual pathophysiological implication of endogenous PACAP-38 remains to be further investigated under various reflex-induced sympathoadrenal stimulations.

PERSPECTIVES

In the present study, we used SNP as a pharmacological tool to induce a rapid and severe hypotension that provoked a strong baroreflex-mediated activation of the sympathoadrenal system. As the SNP-induced hypotension results from a decrease in peripheral resistance due to the vasodilating effect of nitric oxide released from the SNP molecule (1), it is conceivable that the released nitric oxide may affect the multiple mechanisms controlling the adrenal catecholamine secretion. In this context, it has been shown that in the isolated, perfused canine adrenal gland, endogenous nitric oxide inhibited the nicotine-induced catecholamine release (4). In contrast, however, nitric oxide produced a large stimulation of the basal catecholamine secretion as well as the evoked catecholamine release induced by low concentrations of nicotine in cultured bovine chromaffin cells (21). Therefore, in parallel to the present study, we have tested direct in vivo effect on the adrenal gland of SNP locally administered in the same way as in the case of PACAP-27 infusion. Within the dose range of SNP (0.065 μg – 6.5 μg per adrenal gland), there was no significant direct effect on the basal adrenal catecholamine secretion in anesthetized dogs. With the highest dose tested (6.5 μg per adrenal gland), however, the basal catecholamine secretion increased slightly due to the indirect, baroreflex-induced activation of the sympathoadrenal system. Thus, nitric oxide released from the SNP molecule does not directly affect the basal catecholamine secretion in the canine adrenal gland under in vivo conditions. This observation is consistent with a previous study that, in the canine adrenal gland in vivo, another nitric oxide donor, NOC 7, had no direct effect on the basal adrenal catecholamine secretion (20). Nevertheless, either the potentially facilitating or inhibiting effect of SNP-

derived nitric oxide on the PACAP-27-induced adrenal catecholamine secretion remains to be determined under conditions where the operative sympathoadrenal system is absent to define whether the observed synergism results from the interaction either with the neural factors or with the SNP-derived nitric oxide.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Sanae Yamaguchi for her skilled and devoted technical assistance. The authors are also grateful to Jean-Marc Chianetta and Eric Himaya, supported by the Merck-Frosst Summer Research Program for 2000 and 2001, respectively, for their active participation to the present study. This work was supported by the grants from the Canadian Institutes of Health Research (MT-10605). Stéphane Lamouche is a holder of a doctoral research award from the Canadian Institutes of Health Research.

Received 31 July 2002, accepted in final form 30 October 2002.

Table XIII. Changes in plasma PACAP-38-ir and catecholamine concentrations and hemodynamic parameters before and during direct splanchnic nerve stimulation in dogs.

	S1			S2		
	Basal	0.2 Hz	2.0 Hz	Basal	0.2 Hz	2.0 Hz
PAC38 _{AV}	10.2 ± 1.2	12.1 ± 1.6	15.0 ± 2.1	10.7 ± 2.3	11.5 ± 3.2	18.0 ± 4.6
PAC38 _{AO}	7.7 ± 1.1	8.4 ± 2.3	7.5 ± 0.8	7.0 ± 1.0	7.6 ± 0.7	8.5 ± 1.3
EPI _{AV}	21.2 ± 8.6	36.0 ± 9.0	312.9 ± 101.2*	18.7 ± 6.1	51.4 ± 11.8	499.6 ± 210.3*
NE _{AV}	3.4 ± 1.5	4.7 ± 1.7	60.1 ± 17.4*	2.9 ± 1.4	6.7 ± 1.7	87.5 ± 35.4*
EPI _{AO}	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.01
NE _{AO}	0.16 ± 0.02	0.20 ± 0.05	0.23 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.19 ± 0.02
MAP	137.6 ± 5.5	139.3 ± 5.8	142.3 ± 6.8	138.0 ± 5.8	139.8 ± 6.3	141.9 ± 6.7
HR	156.3 ± 4.6	159.8 ± 5.2	159.7 ± 5.1	158.8 ± 4.8	158.8 ± 4.8	158.2 ± 4.9
BF _{AV}	8.1 ± 1.1	8.3 ± 1.0	8.9 ± 1.0*	7.3 ± 1.1	7.4 ± 1.1	8.2 ± 1.1*

Values are means ± SE obtained from 6 dogs. Samples were taken before (basal) and during splanchnic nerve stimulation at 0.2, 2 and 20 Hz. S1 and S2, 1st and 2nd stimulation given immediately after corresponding control; stimulation periods S1 and S2 were given with an interval of 30 min. PAC38_{AV}, adrenal venous PACAP-38-ir (pg/ml); PAC38_{AO}, aortic PACAP-38-ir (pg/ml); EPI_{AV}, adrenal venous epinephrine (ng/ml); NE_{AV}, adrenal venous norepinephrine (ng/ml); EPI_{AO}, aortic epinephrine (ng/ml); NE_{AO}, aortic norepinephrine (ng/ml); MAP, mean arterial pressure (mmHg); HR, heart rate (beats/min); BF_{AV}, adrenal venous blood flow (ml/2min). **P* < 0.05 compared with corresponding control values.

Table XIV. Changes in plasma catecholamine concentrations and hemodynamic parameters in dogs receiving either SNP or PACAP-27 alone or a combination of both treatments.

	Peak change (0-5 min)		Peak change (0-5 min)		Peak change (0-5 min)		Peak change (0-5 min)				
	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal			
EPI _{AV}	12.1 ± 3.9	9.7 ± 3.5	7.1 ± 3.0	175.6 ± 81.4*	16.0 ± 9.3	437.9 ± 81.5*	26.7 ± 12.6	1185.2 ± 478.3*			
NE _{AV}	1.9 ± 0.9	2.0 ± 0.9	1.2 ± 0.5	20.8 ± 10.2*	1.9 ± 0.7	36.4 ± 7.8*	5.11 ± 2.9	106.4 ± 38.7*			
EPI _{AO}	0.09 ± 0.06	0.12 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.54 ± 0.20*	0.09 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.07 ± 0.06	0.66 ± 0.24*			
NE _{AO}	0.20 ± 0.02	0.23 ± 0.3	0.19 ± 0.03	0.55 ± 0.10*	0.25 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.58 ± 0.14*			
MAP	131.2 ± 12.0	126.2 ± 10.8	128.6 ± 8.0	41.0 ± 4.4*	129.2 ± 12.5	127.4 ± 13.2	126.8 ± 9.4	50.0 ± 6.8*			
HR	167.7 ± 7.3	169.3 ± 7.6	164.8 ± 5.5	194.7 ± 4.7	176.8 ± 7.0	178.7 ± 6.4	149.0 ± 5.7	184.0 ± 12.5*			
BF _{AV}	3.4 ± 0.5	3.9 ± 0.4	3.9 ± 0.4	2.6 ± 0.4*	3.8 ± 0.4	4.9 ± 0.4*	4.1 ± 0.5	5.0 ± 1.1			
Gr 1: Vehicle + Vehicle (n = 8)			Gr 2: Vehicle + SNP (n = 8)			Gr 3: PACAP-27 + Vehicle (n = 8)			Gr 4: PACAP-27 + SNP (n = 8)		

Values are means ± SE. Gr, group; n, number of dogs in each group; SNP, sodium nitroprusside; EPI_{AV}, adrenal venous epinephrine (ng/ml); NE_{AV}, adrenal venous norepinephrine (ng/ml); EPI_{AO}, aortic epinephrine (ng/ml); NE_{AO}, aortic norepinephrine (ng/ml); MAP, mean arterial pressure (mmHg); HR, heart rate (beats/min); BF_{AV}, adrenal venous blood flow (ml/min). *P < 0.05 compared with corresponding control values.

Table XV. Changes in plasma catecholamine concentrations and hemodynamic parameters in dogs with left adrenal denervation receiving SNP.

SNX + Vehicle + SNP (n = 8)		
	Basal	Peak change (0-5 min)
EPI _{AV}	10.52 ± 4.91	34.14 ± 12.57*
NE _{AV}	1.57 ± 0.54	5.47 ± 2.06*
EPI _{AO}	0.07 ± 0.02	0.57 ± 0.19*
NE _{AO}	0.14 ± 0.29	0.44 ± 0.08*
MAP	137.8 ± 6.5	44.8 ± 4.4*
HR	164.0 ± 7.7	195.1 ± 12.0*
BF _{AV}	2.9 ± 0.2	1.5 ± 0.6*

Values are means ± SE. SNX, left adrenal denervation; SNP, sodium nitroprusside; *n*, number of dogs; EPI_{AV}, adrenal venous epinephrine (ng/ml); NE_{AV}, adrenal venous norepinephrine (ng/ml); EPI_{AO}, aortic epinephrine (ng/ml); NE_{AO}, aortic norepinephrine (ng/ml); MAP, mean arterial pressure (mmHg); HR, heart rate (beats/min); BF_{AV}, adrenal venous blood flow (ml/min). **P* < 0.05 compared with corresponding control values.

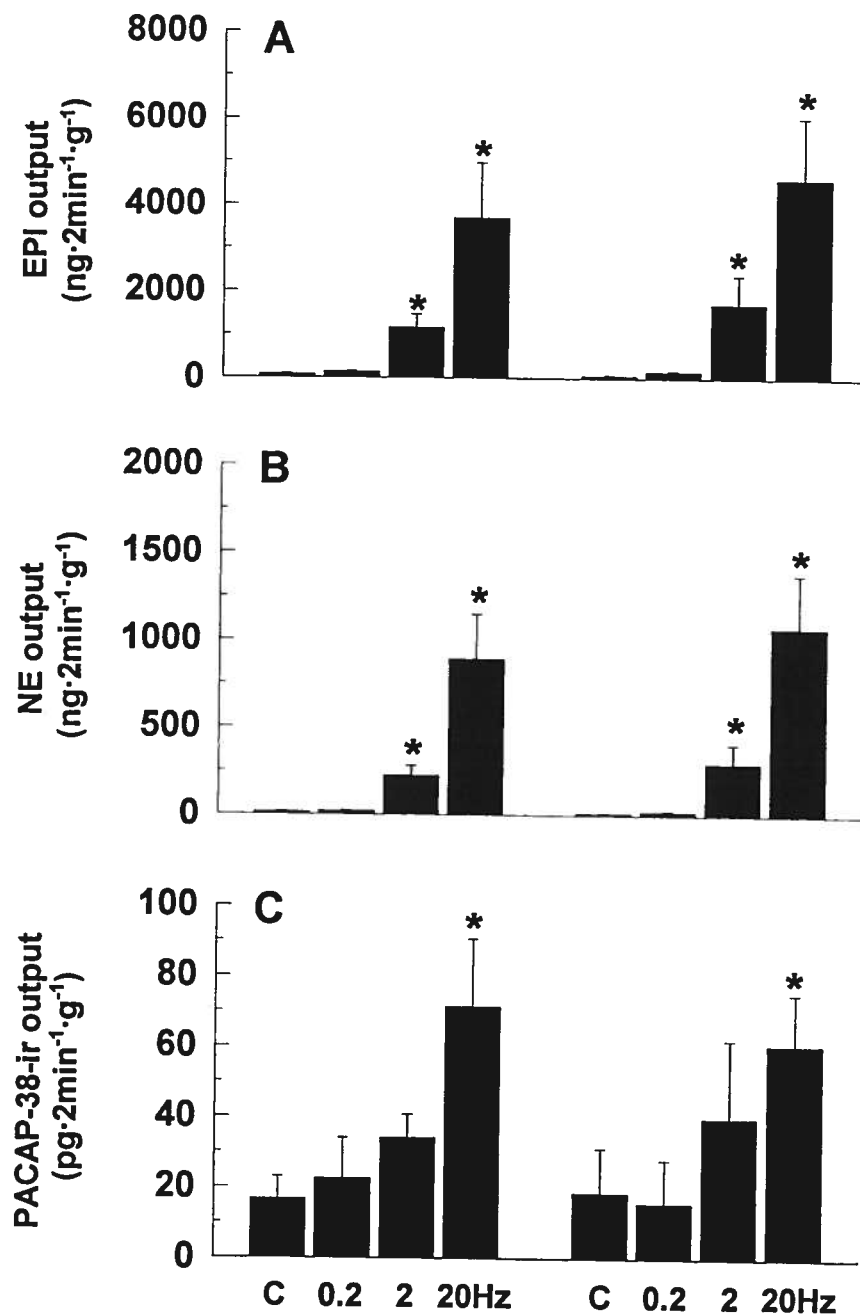


Figure 27. Adrenal epinephrine (EPI, *A*), norepinephrine (NE, *B*) and PACAP-38-ir (*C*) output in response to splanchnic nerve stimulation at 0.2, 2, and 20 Hz. Two sets of stimulation were given at an interval of 30 min. C, control value observed immediately before each stimulation period. * $P < 0.05$ compared with corresponding initial control value.

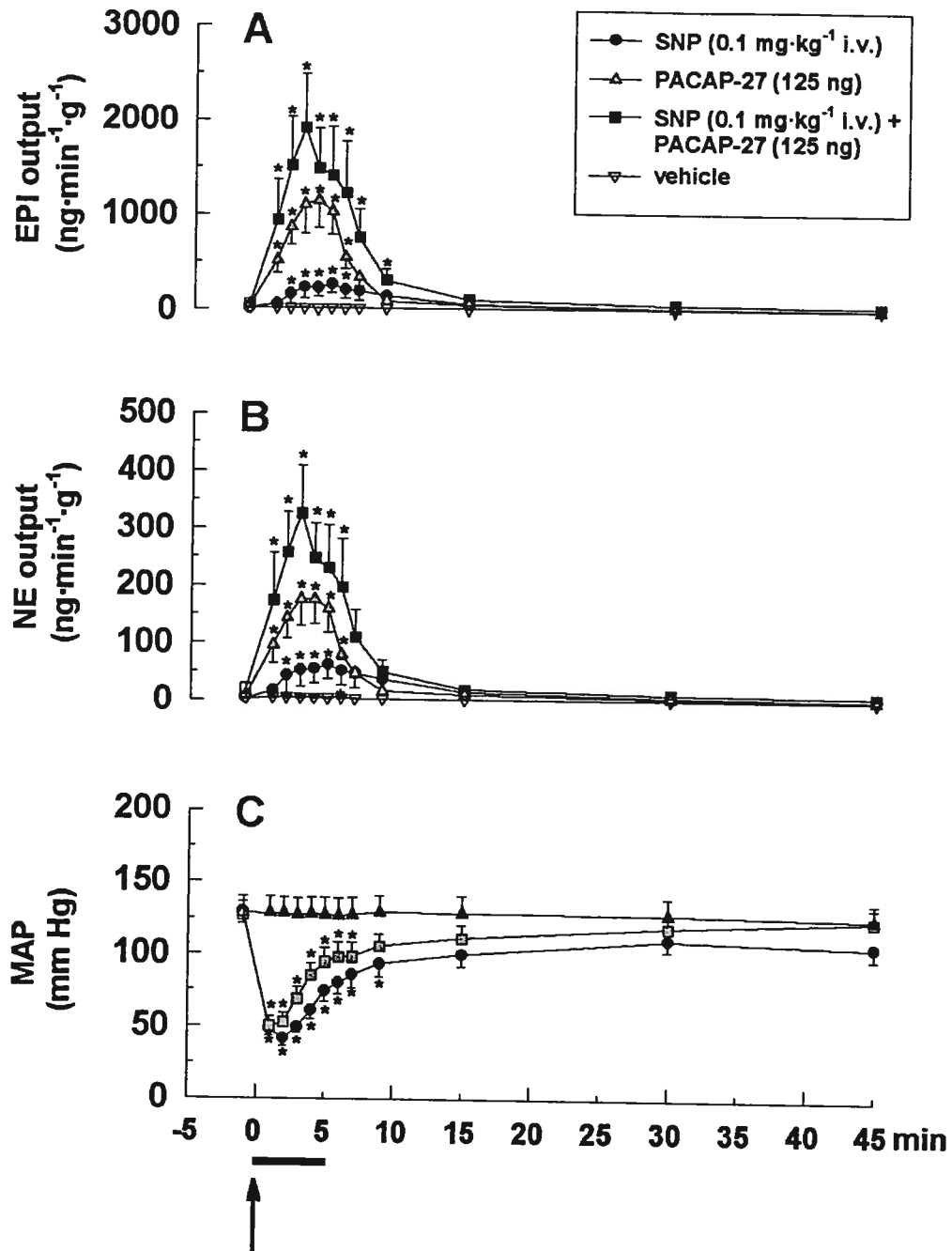


Figure 28. Adrenal epinephrine (EPI, *A*) and norepinephrine (NE, *B*) output and mean arterial pressure (MAP, *C*) in the group receiving the vehicle (inverted open triangle; $n = 8$); a single intravenous bolus dose of SNP (filled circle; $n = 8$); a local infusion of PACAP-27 into the left adrenolumbar artery (partially filled triangle; $n = 8$); and a local infusion of PACAP-27 combined with a bolus injection of SNP (partially filled square; $n = 8$). Arrow, injection of SNP. Horizontal bar, duration of PACAP-27 infusion. $*P < 0.05$ compared with corresponding initial values for each group (open symbols).

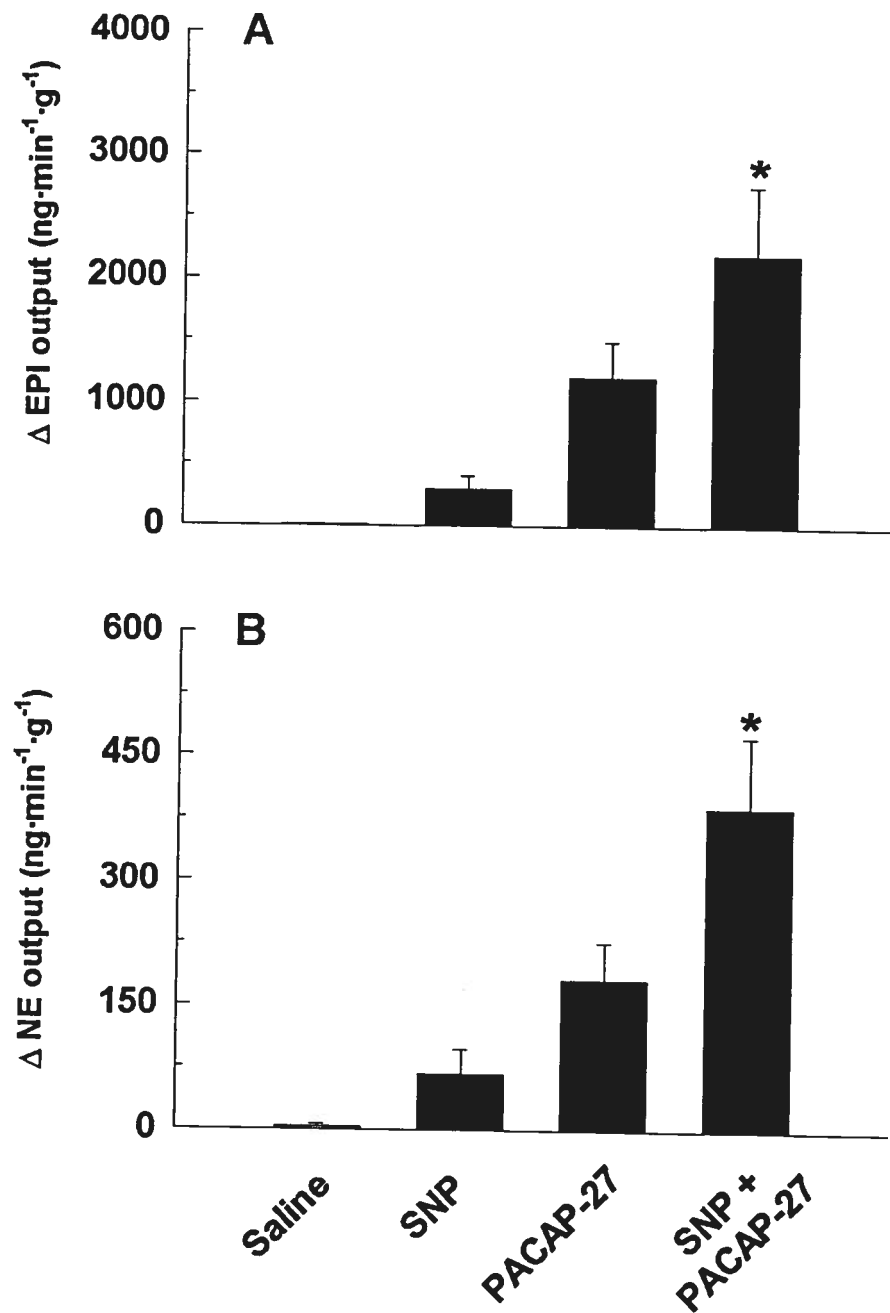


Figure 29. Maximum net increases (Δ) in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output obtained during the first 5 min following SNP administration and/or PACAP-27 infusion. Maximum net responses in each group were calculated with the data obtained from the second series of experiments. A significant interaction exists between PACAP-27 and SNP, * $P < 0.05$, two-way analysis of variance.

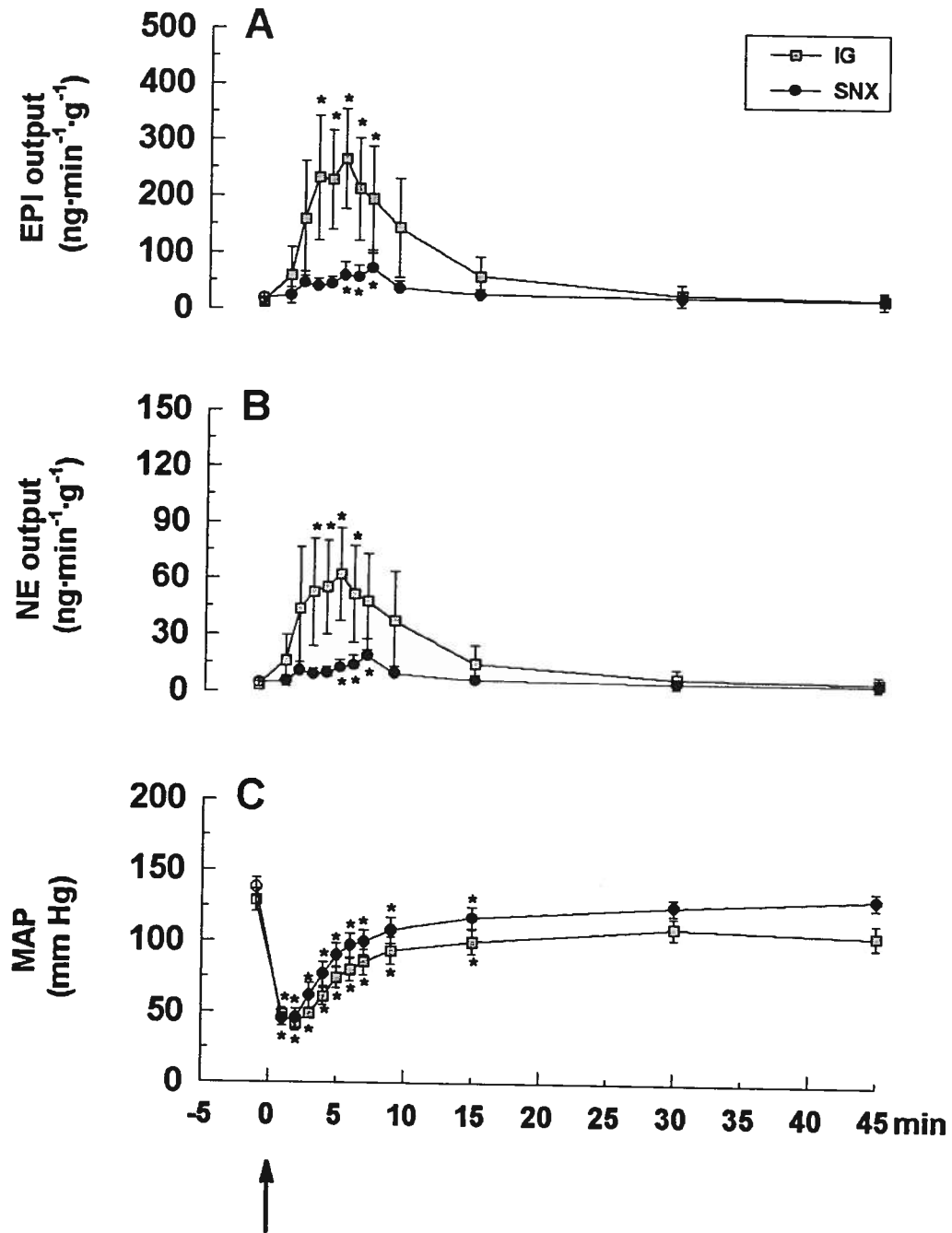


Figure 30. Adrenal epinephrine (EPI, *A*) and norepinephrine (NE, *B*) output and mean arterial pressure (MAP, *C*) in response to a single bolus dose of SNP given intravenously in the groups with either normal innervated (IG; partially filled square; $n = 8$) or acute denervated left adrenal gland (SNX; filled circle; $n = 8$). Arrow, injection of SNP. $*P < 0.05$ compared with corresponding initial values for each group (open symbols).

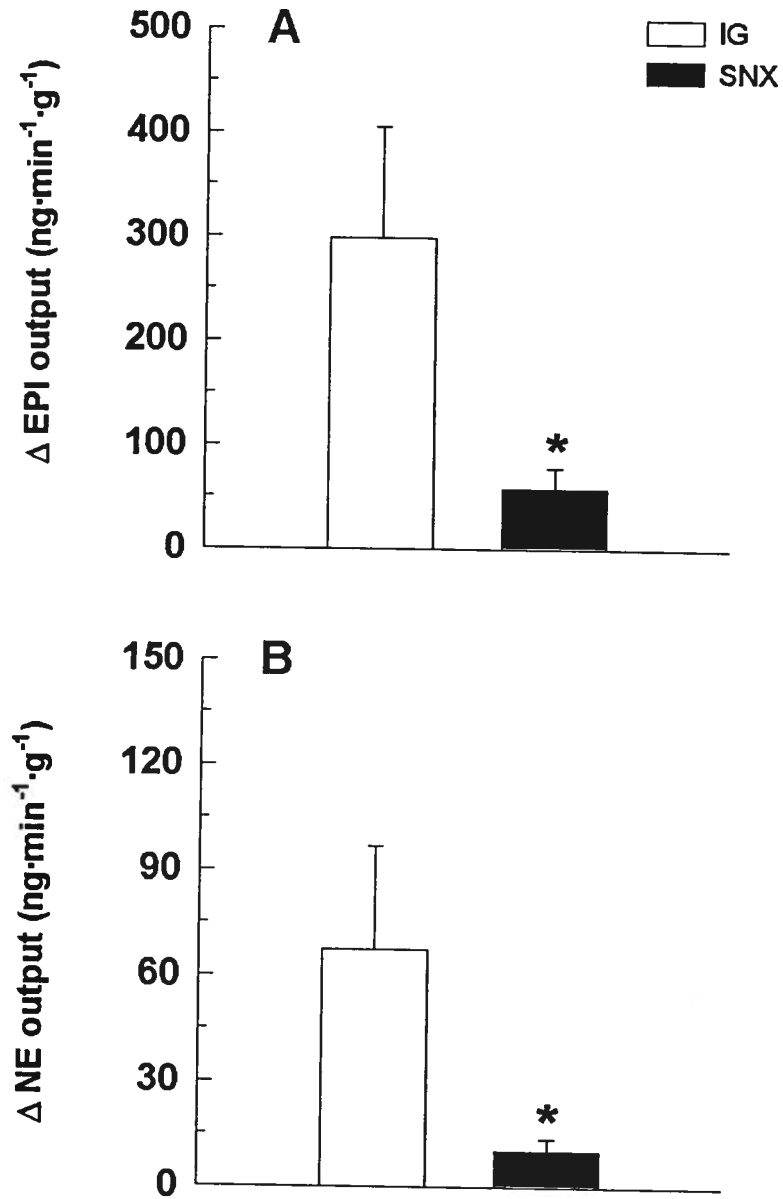


Figure 31. Maximum net increases (Δ) in epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) output obtained during the first 5 min following SNP administration. Maximum net response in the group with either the normally innervated (IG) or acutely denervated (SNX) left adrenal gland was calculated with the data obtained from the second and third series of experiments, respectively. * $P < 0.05$ between IG and SNX.

REFERENCES

1. **Al-sa'doni H, and Ferro A.** S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clin Sci (Lond)* 98: 507 – 520, 2000.
2. **Arimura A, Somogyvari VA, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, and Kitada C.** Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129: 2787-2789, 1991.
3. **Bagshaw RJ, Cox RH, and Campbell KB.** Sodium nitroprusside and regional arterial haemodynamics in the dog. *Br J Anaesth* 49(8): 735-743, 1977.
4. **Barnes RD, Ward LE, Frank KP, Tyce GM, Hunter LW, and Rorie DK.** Nitric oxide modulates evoked catecholamine release from canine adrenal medulla. *Neuroscience* 104: 1165-1173, 2001.
5. **Cox RH, and Bagshaw RJ.** Influence of anesthesia on the response to carotid hypotension in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 237: H424-H432, 1979.
6. **Dun NJ, Tang H, Dun SL, Huang R, Dun EC, and Wakade AR.** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-immunoreactive sensory neurons innervate rat adrenal medulla. *Brain Res* 716: 11-21, 1995.

7. **Feldberg W, Minz B, and Tsudzimura H.** The mechanism of nervous discharge of adrenaline. *J Physiol (Lond)* 81, 286-304, 1934.
8. **Fukushima Y, Hikichi H, Mizukami K, Nagayama T, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Kimura T, and Satoh S.** Role of endogenous PACAP in catecholamine secretion from the rat adrenal gland. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 281: R1562-R1567, 2001.**Gaspo R, Yamaguchi N, and de Champlain J.** Effects of nifedipine and BAY K 8644 on stimulation-induced adrenal catecholamine secretion in the dog. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 265: R28-R34, 1993.
10. **Gaspo R, Yamaguchi N, and de Champlain J.** Correlation between neural release of VIP and adrenomedullary catecholamine secretion in vivo. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 268: R1449-R1455, 1995.
11. **Geng G, Gaspo R, Trabelsi F, and Yamaguchi N.** Role of L-type Ca^{2+} channel in PACAP-induced adrenal catecholamine release in vivo. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 273: R1339-R1345, 1997.
12. **Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, and Eiden LE.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(1); 461-466, 2002.

13. **Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot T, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, and Waschek JA.** International Union of Pharmacology. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Pharmacol Rev* 50: 265–270, 1998.
14. **Hirose M, Furukawa Y, Nagashima Y, Yamazaki K, Hoyano Y, and Chiba S.** Effects of PACAP-38 on the SA nodal pacemaker activity in autonomically decentralized hearts of anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 29: 216-221, 1997.
15. **Hökfelt T, Broberger C, David Xu Z-Q, Sergejev V, Ubink R, and Diez M.** Neuropeptides – an overview. *Neuropharmacol* 39: 1337-1356, 2000.
16. **Ito K, Sato A, Shimamura K, and Swenson RS.** Reflex changes in sympatho-adrenal medullary functions in response to baroreceptor stimulation in anesthetized rats. *J Auton Nerv Syst* 10: 295-303, 1984.
17. **Lamouche S, Martineau D, and Yamaguchi N.** Modulation of adrenal catecholamine release by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vivo. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 276: R162-R170, 1999.

18. **Lamouche S, and Yamaguchi N.** Role of PAC₁ receptor in adrenal catecholamine secretion induced by PACAP and VIP in vivo. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 280: R510-R518, 2001.
19. **Moller K, and Sundler F.** Expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and PACAP type I receptors in the rat adrenal medulla. *Regul Pept* 63: 129-139, 1996.
20. **Nagayama T, Hosokawa A, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Kimura T, and Satoh S.** Role of nitric oxide in adrenal catecholamine secretion in anesthetized dogs. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 275: R1075-R1081, 1998.
21. **Oset GM, Parramon M, Hortelano S, Bosca L, and Gonzalez M.** Nitric oxide implication in the control of neurosecretion by chromaffin cells. *J Neurochem* 63: 1693-1700, 1994.
22. **Robberecht P, Gourlet P, De Neef P, Woussen-Colle MC, Vandermeers-Piret MC, Vandermeers A, and Christophe J.** Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *Eur J Biochem* 207: 239-246, 1992.

23. **Robberecht P, Woussen-Colle M-C, De Neef P, Gourlet P, Buscail L, Vandermeers A, Vandermeers-Piret M-C, and Christophe J.** The two forms of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP(1-27) and PACAP(1-38)) interact with distinct receptors on rat pancreatic AR 4-2J cell membranes. *FEBS Lett* 86: 133–136, 1991.
24. **Runcie MJ, Ulman LG, and Potter EK.** Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cardiovascular and respiratory responses in anesthetized dogs. *Regul Pept* 60: 193-200, 1995.
25. **Seki Y, Suzuki Y, Baskaya MF, Saito K, Takayasu M, Shibuya M, and Sugita K.** Central cardiovascular effects induced by intracisternal PACAP in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 38: H135-H139, 1995.
26. **Tabarin A, Chen D, Hakanson R, and Sundler F.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the adrenal gland of mammals: distribution, characterization and responses to drugs. *Neuroendocrinol* 59: 113-119, 1994.
27. **Tornoe K, Hannibal J, Jensen TB, Georg B, Rickelt LF, Andreasen MB, Fahrenkrug J, and Holst JJ.** PACAP-(1-38) as a neurotransmitter in the porcine adrenal glands. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1413-E1425, 2000.

28. **Tuzel IH.** Sodium nitroprusside: A review of its clinical effectiveness as a hypotensive agent. *J Clin Pharmacol* 14: 494 – 503, 1974.
29. **Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, and Vaudry H.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52: 269-324, 2000.
30. **Wakade AR, Gou X, Strong R, Arimura A, and Haycock J.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a neurotransmitter in rat adrenal medulla. *Regul Pept* 37: 327, 1992. (Abstract)
31. **Wakade AR.** Multiple transmitter control of catecholamine secretion in rat adrenal medulla. *Advances in Pharmacology* 45: 595-598, 1998.
32. **Wallenstein S, Zucker CL, and Fleiss J.** Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47: 1-9, 1980.
33. **Watanabe T, Masuo Y, Matsumoto H, Suzuki H, Ohtaki T, Masuda Y, Kitada C, Tsuda M, and Fujino M.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide provokes cultured rat chromaffin cells to secrete adrenaline. *Biochem Biophys Res Commun* 182 (1): 403-411, 1992.

34. **Yamaguchi N.** In vivo evidence for adrenal catecholamines release mediated by nonnicotinic mechanism: local medullary effect of VIP. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 265: R766-R771, 1993.
35. **Yamaguchi N, Lamarche L, and Briand R.** Simultaneous evaluation of medullary secretory functions of normal and acutely denervated adrenals. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 260: R306-R313, 1991.
36. **Yamaguchi N and Lamouche S.** Enhanced reactivity of the adrenal medulla in response to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide₁₋₂₇ (PACAP) during insulin-induced hypoglycemia in anesthetized dogs. *Can J Physiol Pharmacol* 77: 819-826, 1999.

SYNTHÈSE ET DISCUSSION GÉNÉRALE

Durant des épisodes de stress ou d'activités physiques, les médullosurrénales relâchent les catécholamines dans la circulation de façon à produire et à moduler une série de réponses physiologiques qui servent à augmenter les fonctions cardio-respiratoires et métaboliques. La sécrétion des catécholamines est sous le contrôle de divers stimuli physiologiques pouvant comporter un signal d'origine hormonale, neuronale et autocrinienne/paracrinienne. Bien que plusieurs facteurs soient reconnus pour leur capacité à initier une sécrétion de catécholamines par la médullosurrénale, le mécanisme prédominant de la sécrétion des catécholamines durant un stress est attribué à l'augmentation de l'activité neuronale dans les fibres pré-ganglionnaires sympathiques. Depuis les études de Feldberg *et al.* (1934), il fut accepté que ces fibres nerveuses étaient de nature cholinergique. L'acétylcholine libérée par les terminaisons nerveuses splanchniques active les récepteurs cholinergiques situés sur la cellule chromaffine, stimulant ainsi la sécrétion des catécholamines et autres fonctions biochimiques de la cellule. Cependant, au cours d'études antérieures où le nerf splanchnique fut stimulé afin de provoquer une sécrétion de catécholamines, le traitement avec des antagonistes cholinergiques n'a pu complètement bloquer la réponse de la médullosurrénale et, par conséquent, la présence d'autres substances sécrétrices libérées avec l'acétylcholine a été suggérée (Malhotra & Wakade, 1987). L'implication, qui peut être substantielle, d'une substance non-cholinergique dans la réponse sécrétrice de la médullosurrénale a été démontrée (Wakade, 1988). Initialement, le VIP fut considéré comme un neurotransmetteur non-cholinergique libéré conjointement avec l'acétylcholine par les fibres sympathiques pré-ganglionnaires dans la médullosurrénale (Wakade *et al.*, 1991). Malgré le fait que le VIP réponde à la majorité des critères pour être considéré comme un neurotransmetteur, des concentrations élevées (0,1 à 10 μM) sont requises afin de reproduire un mimétisme

pharmacologique capable d'induire une sécrétion de catécholamines par la médullosurrénale (Malhotra & Wakade, 1987). Nous avons montré chez le chien *in vivo* que la sécrétion des catécholamines induite par une perfusion locale de VIP était bloquée de façon significative par un antagoniste PAC₁ alors que celle-ci demeurerait inchangée en présence d'un antagoniste non-sélectif des récepteurs au VIP (VPAC₁ et VPAC₂) (Lamouche & Yamaguchi, 2001). Une étude antérieure effectuée dans notre laboratoire cette fois avec un autre antagoniste du VIP, le [Lys¹,Pro^{2,5},Arg^{3,4},Tyr⁶]VIP, a aussi montré une absence d'effets inhibiteurs sur la sécrétion des catécholamines induite par une perfusion de VIP (Gaspo *et al.*, 1997). Soulignons que les récepteurs VPAC démontrent ordinairement une affinité sensiblement élevée envers le VIP dans les tissus exprimant ces récepteurs. Par conséquent, ces observations suggèrent que les récepteurs VPAC spécifiques au VIP sont absents ou relativement peu impliqués de façon fonctionnelle dans la médullosurrénale chez le chien *in vivo*. En rapport avec ce concept, il a été rapporté que les récepteurs spécifiques au VIP étaient indétectables dans la médullosurrénale (Ishihara *et al.*, 1992; Nogi *et al.*, 1997). Comme on peut le constater, les effets positifs sur la sécrétion des catécholamines induite par une infusion de VIP semblent être médiés principalement via l'activation des récepteurs PAC₁. Par contre, l'affinité du récepteur PAC₁ envers le VIP est très faible, ce qui est reflétée dans une certaine mesure par les concentrations élevées de VIP requises afin d'exercer ses effets sécréteurs sur la médullosurrénale. Bien qu'aucune étude n'ait déterminé les concentrations intra-synaptiques du VIP, il est peu probable que celles-ci soient suffisamment élevées lors de situations physiologiques pour que le VIP soit actif au niveau des récepteurs PAC₁. Il est probable que les récepteurs spécifiques au VIP soient exprimés de façon inductible lors de **certaines conditions**, appuyant un rôle bien précis pour le VIP dans ces conditions. Néanmoins, les

études précédentes ainsi que les évidences expérimentales démontrées au cours de mes travaux de doctorat supportent une implication modeste, voir improbable pour le VIP dans la modulation de la médullosurrénale dans des conditions physiologiques.

À l'opposé, le PACAP est environ 1000 fois plus puissant que le VIP dans la stimulation de l'adénylcyclase et de la PLC dans diverses cellules, et il fut considéré comme un candidat alternatif au VIP dans la médullosurrénale. Le PACAP satisfait non seulement les mêmes critères que le VIP, de plus il imite, avec des concentrations de l'ordre du nanomolaire, la réponse sécrétrice endogène non-cholinergique observée à la suite d'une stimulation du nerf splanchnique. (Wakade *et al.*, 1992). La médullosurrénale contient des quantités importantes de PACAP endogène ainsi que de récepteurs PAC₁ spécifiques au PACAP (Vaudry *et al.*, 2000). Nous avons démontré *in vivo* qu'une perfusion de PACAP entraîne une augmentation importante de la sécrétion des catécholamines surrénaliennes, laquelle est inhibée par un antagoniste du récepteur PAC₁ (Lamouche & Yamaguchi, 2001). De plus, le PACAP endogène est présent dans les structures anatomiques appropriées, c'est-à-dire dans de grosses vésicules denses contenues dans les terminaisons nerveuses en contact étroit avec les cellules chromaffines, afin d'être considéré comme un cotransmetteur avec l'acétylcholine dans la médullosurrénale (Dun *et al.*, 1995; Tornøe *et al.*, 2000; Hamelink *et al.*, 2002). En lien avec ces observations, nous avons démontrés chez le chien anesthésié que le PACAP endogène était libéré dans l'effluent veineux de la surrénale lors d'une stimulation directe du nerf splanchnique (Lamouche & Yamaguchi, 2003). Quelques études *in vitro* avaient démontré auparavant que le PACAP pouvait être libéré lors d'une stimulation électrique de la glande surrénale isolée et perfusée de porc et de rat (Tornøe *et al.*, 2000;

Wakade *et al.*, 1992). Toutefois, nos résultats sont les premiers à démontrer dans des conditions *in vivo* que le neuropeptide PACAP semble être impliqué en tant que neurotransmetteur dans la médullosurrénale. Cependant, il est impossible de conclure selon ces résultats sur une implication fonctionnelle du PACAP endogène dans le contrôle des fonctions médullaires au cours d'une réelle activation physiologique et/ou pathophysiologique du système sympatho-surrénalien.

Afin d'élucider le rôle du PACAP endogène dans la réponse médullaire à une stimulation nerveuse, nous avons entrepris au cours de quelques études préliminaires d'administrer divers antagonistes du PACAP au cours d'une stimulation directe du nerf splanchnique avec des fréquences de stimulation croissantes. Bien que ces études soient demeurées à un stade préliminaire, aucune tendance notable d'inhibition n'a pu être observée dans la sécrétion des catécholamines lors d'une administration concomitante d'antagonistes du PACAP, PACAP6-27 et PACAP6-38. Cette absence d'effets inhibiteurs des antagonistes PAC₁ n'exclue pas cependant un rôle physiologique potentiel pour le PACAP endogène pour plusieurs raisons. Il est possible en effet que la contribution réelle du PACAP endogène dans la sécrétion des catécholamines soit masquée par la réponse médiée par l'acétylcholine qui demeure quand même considérable dans la neurotransmission splanchnique. Une autre explication réside probablement dans une étude faite chez le cochon d'Inde concernant la répartition des récepteurs PAC₁ et qui démontre que ceux-ci seraient présents non-seulement dans la synapse médullo-surrénalienne, mais aussi distribués de façon diffuse à la surface des cellules chromaffines, contrairement aux récepteurs nicotiniens qui eux sont présents exclusivement dans l'espace intra-synaptique (Inoue *et al.*, 2000). Cette notion de récepteurs

PAC₁ « extra-synaptique » implique que ceux-ci, à cause de leur disposition anatomique, sont plus susceptibles d'être activés par une infusion de PACAP exogène et, par conséquent, les effets médiés par leur activation sont plus facilement bloqués par l'infusion d'antagonistes PAC₁. À l'opposé, la population de récepteurs PAC₁ présents dans l'espace intra-synaptique est peut-être plus difficile d'accès aux molécules relativement grosses que sont les antagonistes peptidiques et, de ce fait, maintiennent leur affinité envers le PACAP endogène libéré à proximité par les terminaisons nerveuses splanchniques.

Étonnamment, la sécrétion des catécholamines suite à une stimulation transmurale à 10 Hz de la glande isolée et perfusée de rat fut diminuée d'environ 60% en présence du PACAP6-38, un antagoniste des récepteurs PAC₁ (Fukushima *et al.*, 2001). Cette observation intéressante, bien que contradictoire avec les énoncés précédent, suggère un rôle majeur pour le PACAP endogène dans le contrôle des fonctions sécrétrices de la médullosurrénale. Toutefois, si le PACAP endogène soutient effectivement une portion aussi considérable de la sécrétion des catécholamines, comment expliquer notre incapacité à observer au moins une tendance d'inhibition sur la sécrétion des catécholamines en présence d'un antagoniste PAC₁ dans notre étude *in vivo* mentionnée précédemment? L'explication la plus simple mais néanmoins fort possible pour ces observations discordantes serait une différence d'espèce. Aussi, le modèle expérimental utilisé par Fukushima *et al.* (2001) consiste en une perfusion de manière rétrograde de la glande surrénale, c'est-à-dire par la veine surrénale, de la solution physiologique dans laquelle l'antagoniste du PACAP était incorporé. Il est possible que ce modèle *in vitro* facilite l'observation de certains phénomènes à cause de la présence ou l'absence de barrière de diffusion de même que l'absence de certaines protéines présentes

normalement dans le plasma *in vivo* pouvant nuirent à ce genre d'étude. Enfin, dans le modèle *in vitro* utilisé par Fukushima *et al.* (2001), la perfusion continue du PACAP6-38 dans la glande surrénale a probablement permis d'atteindre une saturation des récepteurs PAC₁, ce qui n'aurait pu être accompli dans notre modèle de chien *in vivo* à cause d'une administration aiguë de l'antagoniste. En lien avec cette dernière affirmation, il a été rapporté au niveau du pancréas que les effets antagonistes du PACAP6-38 sont aussitôt levés suivant l'arrêt de sa perfusion (Tornøe *et al.*, 2000).

D'autre part, Tornøe *et al.* (2000) a démontré une libération considérable de PACAP endogène dans l'effluent veineux de glandes isolées et perfusées de porc suite à l'administration aiguë de capsaïcine. La capsaïcine étant reconnue pour activer les fibres nerveuses sensorielles primaires et le PACAP étant effectivement exprimé dans ces fibres (Fig. 13, page 55), il fut suggéré que la libération du PACAP dans ces conditions expérimentales était causée par la stimulation antidromique des afférences sensibles contenues dans le nerf splanchnique. Cette allégation pourrait également s'appliquer à l'étude de Fukushima *et al.* (2001), où la glande surrénale de rat isolée et perfusée a été soumise à un champ électrique, stimulant par conséquent tout tissu excitable présent entre les électrodes. Ainsi, il est concevable qu'une fraction appréciable de PACAP endogène libérée par les fibres des afférences sensibles ait diffusée, à cause de l'absence de certaines barrières de diffusion normalement présentes *in vivo*, jusqu'à cette population de récepteurs PAC₁ extra-synaptique à la surface des cellules chromaffines. Dès lors, on peut soupçonner que cette quantité additionnelle de PACAP endogène qui, dans des conditions *in vivo* est normalement non-disponible à cause de barrières de diffusion, ait pu stimuler davantage la sécrétion de

catécholamines, se traduisant par une diminution plus importante qu'envisagée à priori en présence d'un antagoniste PAC₁.

Toujours est-il que nos travaux ainsi que les quelques études *in vitro* ont démontré de façon similaire une libération préférentielle du PACAP endogène à des fréquences de stimulations relativement élevées (10 – 20 Hz), un concept dans la libération des neuropeptides. Ces observations placent dans un contexte physiologique ou pathophysiologique bien précis, caractérisé par une activité intense dans les fibres nerveuses splanchniques, où le PACAP endogène serait apte à agir en tant que neurotransmetteur peptidique. Une implication du PACAP dans de telles situations serait conforme au rôle général attribué aux neuropeptides, stipulant que ceux-ci sont libérés et agissent de façon prédominante lors d'un stress intense et/ou d'états pathophysiologiques (Hökfelt *et al.*, 2000). En lien avec cette dernière considération, chez des souris « *knock-out* » pour le gène codant le PACAP, une sécrétion adéquate de catécholamines semble être obtenue dans des conditions normales ou de repos et les souris apparaissent viables. Toutefois, ces mêmes souris sont incapables de survivre à un stress métabolique telle qu'une hypoglycémie induite par une injection d'insuline (Hamelink *et al.*, 2002). Dans le même ordre d'idées, une étude similaire a démontrée un très haut taux de mortalité seulement chez des souris déficientes pour le gène du PACAP lorsque celles-ci sont exposées à des baisses de températures (Gray *et al.*, 2002). Comme on peut le constater, le PACAP endogène semble ne pas occuper une fonction vitale dans la médullosurrénale dans des conditions physiologiques de bases, alors que sa présence devient essentielle lors de stress métaboliques prolongés. L'extrapolation de ces résultats nous permet d'émettre l'hypothèse que le PACAP semble fonctionner tel un co-transmetteur de

« réactions d'urgences » soutenant la réponse sécrétrice initiée par l'acétylcholine dans la médullosurrénale lorsque le système sympatho-surrénalien est fortement activé. Cette affirmation serait en accord avec l'hypothèse voulant que la composante non-cholinergique soit impliquée de façon significative dans la neurotransmission seulement lorsque le système nerveux est fortement activé (Lundberg 1996).

Comme nous l'avons souligné précédemment, l'équipe de Fukushima *et al.* (2001) a montré une inhibition relativement importante (~ 60%) de la sécrétion des catécholamines induite par une stimulation électrique transmurale en présence d'un antagoniste PAC₁. Alors que la sécrétion des catécholamines suite à la stimulation électrique transmurale de la glande surrénale est médiée principalement via l'activation des récepteurs nicotiques (O'Farrell & Marley, 1997), ces résultats révèlent que le PACAP endogène d'origine neuronale induit non seulement une sécrétion directe des catécholamines, mais module également la réponse cholinergique impliquée dans la sécrétion des catécholamines. Les résultats présentés dans la première étude de cette thèse montrent effectivement que la présence du PACAP durant la stimulation directe du nerf splanchnique amplifie la sécrétion des catécholamines (Lamouche *et al.*, 1999). Auparavant, il fut rapporté que l'administration de PACAP augmentait la libération de neurotransmetteurs parasympathiques cardiaques (i.e. l'acétylcholine) dans des modèles *in vitro* (Runcie *et al.*, 1995; Yonezawa *et al.*, 1996) et *in vivo* (Hirose *et al.*, 1997). Ces observations antérieures nous ont suggéré un mécanisme similaire pour le PACAP dans la médullosurrénale, lequel pourrait agir directement sur les terminaisons nerveuses splanchniques afin d'augmenter la libération d'acétylcholine neuronale. Malgré le fait qu'un quelconque mécanisme présynaptique soutenant un tel effet facilitateur reste à être confirmé

dans la médullosurrénale, un mécanisme dépendant du Ca^{2+} , sensible à la tétrodontoxine (donc faisant intervenir les canaux Na^+) a été suggéré dans les effets chronotropes négatifs induits par le PACAP dans le cœur de chien isolé et perfusé (Hirose *et al.*, 1997). Un mécanisme similaire a aussi été suggéré dans l'augmentation induite par le PACAP de la libération d'acétylcholine dans l'iléon de cobaye *in vitro* (Katsoulis *et al.*, 1993). Ces résultats sont corroborés par la démonstration que des ionophores du Ca^{2+} peuvent augmenter à eux seul la libération d'acétylcholine des terminaisons nerveuses (Lefkowitz *et al.*, 1998). Bien qu'une comparaison directe entre ces divers tissus et la médullosurrénale soit simpliste, voire risquée, il n'en demeure pas moins que la capacité du PACAP à augmenter les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} dans plusieurs types de cellules n'exclue pas l'existence d'un mécanisme présynaptique médié par le PACAP, dépendant du Ca^{2+} , contribuant à faciliter la libération de l'acétylcholine, augmentant de ce fait la sécrétion des catécholamines. Cette hypothèse qui propose une interaction du PACAP au niveau présynaptique peut également être supportée par l'existence de fibres nerveuses pré-ganglionnaires exprimant les récepteurs PAC_1 (Moller & Sundler, 1996). Afin de vérifier cette possibilité, il serait plus approprié d'étudier la libération de l'acétylcholine endogène suite à la stimulation du nerf splanchnique simultanément avec une administration du PACAP.

Nous avons entrepris au cours de mes travaux de mettre au point une technique de détection de l'acétylcholine par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) couplée à une détection électrochimique (DE). Cette technique était associée au développement d'un modèle de la glande surrénale gauche isolée et perfusée du chien avec la préservation de l'innervation splanchnique fonctionnelle. Ce modèle *in vitro* devait nous

permettre de quantifier directement la libération d'acétylcholine en étroite relation avec la sécrétion des catécholamines au cours d'une stimulation du nerf splanchnique en éliminant la majeure partie des substances connues et inconnues présentes dans le plasma qui pourraient nuire à la détection de l'acétylcholine endogène. De plus, il était techniquement plus réalisable en comparaison avec des conditions *in vivo*, de perfuser continuellement la glande surrénale isolée avec un inhibiteur de l'acétylcholinesthérase de façon à protéger l'acétylcholine endogène. L'élaboration d'une courbe standard pour l'acétylcholine exogène nous a révélé une sensibilité très élevée du système (limite de détection: 0,625 nM dans une solution standard). Toutefois, la quantité d'acétylcholine endogène recueillie par écoulement passif hors de la glande surrénale isolée et perfusée était si petite qu'elle fluctuait régulièrement en dessous de la limite de détection du système. Par conséquent, la reproductibilité de la méthode était grandement influencée, compliquant ainsi l'analyse des résultats. Par contre, le profil de sécrétion des catécholamines surrénaliennes en réponse à une stimulation directe du nerf splanchnique dans ce modèle *in vitro* s'est montrée stable et hautement reproductible. De ce fait, on peut supposer que la quantité d'acétylcholine libérée au niveau de la synapse médullo-surrénalienne, bien que très élevée localement, ne réussit pas à diffuser librement hors de l'espace synaptique en concentration suffisante pour être détectée par le système de CLHP-DE. Suite à cet important obstacle d'ordre technique, nous avons envisagé la possibilité d'utiliser en alternative une méthode impliquant l'acétylcholine marquée au tritium (O'Farrell & Marley, 1997). Selon la théorie, une augmentation du taux de radioactivité durant une stimulation nerveuse devrait refléter la libération de l'acétylcholine marquée préalablement incorporée dans les vésicules de sécrétions. Hors, la spécificité d'une telle technique est encore débattue dans la littérature. En effet, il a été démontré que les

vésicules neuronales n'incorporaient pas de façon uniforme l'acétylcholine marquée et que les variations du taux de radioactivité ne reflétaient pas nécessairement les variations de la libération d'acétylcholine endogène (Giaroni *et al.*, 1997). À cause de la faible spécificité de cette technique, nous avons donc décidé de ne pas l'utiliser. Ainsi, malgré des résultats préliminaires très prometteurs, l'absence d'une technique fiable pour la détection de l'acétylcholine a fait en sorte que le projet fut suspendu indéfiniment.

Toujours dans la première étude de cette thèse, l'augmentation de la sécrétion des catécholamines suite à une stimulation du nerf splanchnique a aussi été affectée par un effet post-synaptique du PACAP sur les cellules chromaffines. En effet, la sécrétion des catécholamines en réponse à la perfusion d'acétylcholine a également été augmentée de façon synergique en présence de PACAP exogène (Lamouche *et al.* 1999). Ces résultats suggèrent que le PACAP modulerait la sécrétion des catécholamines en amplifiant la réponse sécrétrice initiée par l'acétylcholine. Nos résultats sont en accord avec une étude récente dans la glande surrénale du cobaye qui a démontré que le PACAP facilitait la sécrétion induite par l'acétylcholine (Inoue *et al.*, 2000). Selon cette même étude, l'augmentation de la sécrétion de catécholamines induite par l'acétylcholine en présence de PACAP serait due à l'activation d'une voie faisant intervenir la protéine kinase A, suite à la formation d'AMPC. Ensemble, ces résultats démontrent que le PACAP agit en tant que neuromodulateur, facilitant la sécrétion des catécholamines par les médullosurrénales.

La portée physiologique de ces observations peut être étendue à des situations où le système sympatho-surrénalien est fonctionnellement impliqué. Dans ce contexte, il est

concevable que la sécrétion des catécholamines soit augmentée lors d'une activation du système sympatho-surrénalien en présence du PACAP de manière à restaurer l'homéostasie. Nous avons effectivement démontré que la sécrétion de catécholamines suite à une hypoglycémie induite par l'insuline chez le chien anesthésié était augmentée en présence de PACAP exogène (Yamaguchi & Lamouche, 1999). Toujours chez le chien anesthésié, la sécrétion des catécholamines produite durant un choc hypotensif sévère fut aussi augmentée de façon synergique en présence de PACAP exogène (Lamouche & Yamaguchi, 2003). Selon ces observations, il en ressort que le PACAP interagit localement sur les mécanismes de transmissions cholinergiques, facilitant la réponse sécrétrice de la médullosurrénale durant une activation réflexe du système sympatho-surrénalien. De façon intéressante, il fut rapporté, dans des conditions *in vitro*, que la réponse soutenue par les récepteurs nicotiques exhibait une désensibilisation (Livett & Marley, 1993) lorsque ces récepteurs étaient exposés à des concentrations élevées d'acétylcholine (10^{-5} M). Par conséquent, il est possible que le PACAP endogène puisse intervenir lorsque la transmission cholinergique classique semble déficiente ou inadéquate afin de maintenir une sécrétion de catécholamines en réponse à un stress pathophysiologique prolongé.

PERSPECTIVES

Les évidences expérimentales exposées au cours de mes travaux montrent, dans des conditions *in vivo*, que le neuropeptide PACAP joue un rôle en tant que neurotransmetteur et neuromodulateur peptidique au niveau de la médullosurrénale. Toutefois, des travaux

supplémentaires doivent être entrepris afin de préciser davantage nos connaissances sur le sujet.

Notre modèle expérimental comporte des avantages certains par rapport aux modèles *in vitro* pour les études de co-transmissions dans la médullosurrénale. Dans le modèle de glande surrénale isolée et perfusée, la stimulation électrique transmurale a ce désavantage que tout tissu potentiellement excitable présent dans le champ de stimulation pourra libérer de façon concomitante de multiples neurotransmetteurs. Ainsi, une réponse excitatrice peut être complètement masquée par l'action d'un neurotransmetteur inhibiteur et vice versa. Ces complications sont réduites dans notre approche expérimentale chez le chien anesthésié où l'on procède à la stimulation axonale d'un nerf majeur, dans ce cas-ci le nerf splanchnique. Par contre, là aussi, à cause d'arrangements anatomiques, les fibres sympathiques, sensorielles et probablement parasympathiques sont souvent co-activées. Les axones des nerfs pré- et post-ganglionnaires ainsi que des fibres sensorielles possèdent un seuil d'excitation différent, à cause du degré de myélinisation, et la libération fréquence-dépendante des divers neuromédiateurs peut diverger (Lundberg, 1996). L'activation réflexe de la médullosurrénale au cours d'une hypoglycémie ou d'une hypotension sévère par exemple, demeure la méthode idéale afin de stimuler de façon sélective les différentes voies nerveuses. Ainsi, il serait intéressant de vérifier dans ces conditions expérimentales la contribution réelle du PACAP endogène en introduisant localement divers antagonistes sélectifs du PACAP, préférentiellement non-peptidiques et stables. En fait, l'une des raisons expliquant le peu de données sur le rôle physiologique des neuropeptides en général provient de cette absence de bloqueurs spécifiques pouvant influencer les événements induit par les neuropeptides dans les synapses.

Comme nous l'avons souligné précédemment, le site d'action du PACAP au niveau des terminaisons splanchniques (site présynaptique) ou des cellules chromaffines (site postsynaptique) ne peut être clairement défini dans les présentes conditions expérimentales. La mise au point d'une technique hautement sensible et spécifique pour la détection de l'acétylcholine endogène devrait permettre de quantifier directement la libération d'acétylcholine en étroite relation avec la sécrétion des catécholamines au cours d'une stimulation du nerf splanchnique. Par conséquent, il serait possible de déterminer de façon précise une action potentielle du PACAP dans la cinétique de la libération de l'acétylcholine par les terminaisons nerveuses splanchniques.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans la première étude du présent travail de recherche, nous avons montré que le PACAP pouvait moduler la sécrétion des catécholamines dans des conditions *in vivo*. En effet, les résultats indiquent qu'une perfusion locale du PACAP dans la glande surrénale amplifiait la sécrétion des catécholamines induite soit par une stimulation directe du nerf splanchnique ou soit par l'administration d'acétylcholine exogène. Ces résultats sont compatibles avec le concept que le PACAP accroît la sécrétion des catécholamines induite par une stimulation nerveuse soit en facilitant la relâche d'acétylcholine neuronale ou par l'interaction entre divers seconds messagers intracellulaires initiée au niveau postsynaptique. Cette étude suggère que le PACAP agirait en tant que neuromodulateur dans la régulation locale de la sécrétion des catécholamines par la glande surrénale du chien *in vivo*, possiblement à niveau postsynaptique. Toutefois, une implication présumée d'un effet présynaptique facilitateur sur la libération de l'acétylcholine par le PACAP ne peut être complètement écartée dans les présentes conditions expérimentales.

Les résultats de la deuxième étude ont permis de mieux caractériser l'implication fonctionnelle du récepteur PAC₁ *in vivo* ainsi que l'importance relative des récepteurs PAC₁ et VPAC impliqués dans la réponse de la médullosurrénale au PACAP et au VIP. La réponse des catécholamines tant au PACAP qu'au VIP fut bloquée de façon significative par le PACAP6-27, un antagoniste peptidique spécifique aux récepteurs PAC₁. Cependant, en présence du VIP10-28, un antagoniste non-sélectif des récepteurs VPAC, la sécrétion des catécholamines induite soit par le PACAP ou soit par le VIP est demeurée inchangée. Cette étude suggère que les récepteurs VPAC ne sont pas impliqués de façon fonctionnelle dans la

régulation locale de la sécrétion des catécholamines surrenaliennes induite par le PACAP et le VIP. À la lumière de ces résultats, il est conclu que le récepteur PAC₁ joue un rôle majeur dans la médiation de la sécrétion des catécholamines induite par le PACAP ainsi que par le VIP dans la médullosurrénale du chien *in vivo*.

Enfin, dans la troisième et dernière étude, nous avons démontré une libération du PACAP endogène dans l'effluent veineux de la glande surrénale suite à une stimulation directe du nerf splanchnique. Cette libération du PACAP endogène augmente en fonction de la fréquence de stimulation imposée et atteint un seuil significatif seulement à la plus haute fréquence testée (20 Hz). De plus, nous avons montré que la présence de PACAP exogène dans la glande surrénale durant un choc hypotensif sévère amplifiait la sécrétion des catécholamines. Ensemble, ces résultats sont en accord avec la notion que le PACAP est impliqué fonctionnellement en tant que neuromodulateur local, facilitant ou soutenant la sécrétion des catécholamines durant une activation intense du système sympatho-surrénalien. Toutefois, l'implication pathophysiologique réelle du PACAP endogène reste à confirmer au cours de diverses conditions d'activation réflexe du système sympatho-surrénalien.

En conclusion, sur les bases de l'ensemble des observations rapportées de concert avec nos présents résultats, nous proposons dans la Figure 32 (page 231) un modèle où sont présentés les sites d'actions ainsi que les mécanismes cellulaires qui sous-tendent l'implication du PACAP dans la sécrétion des catécholamines surrenaliennes.

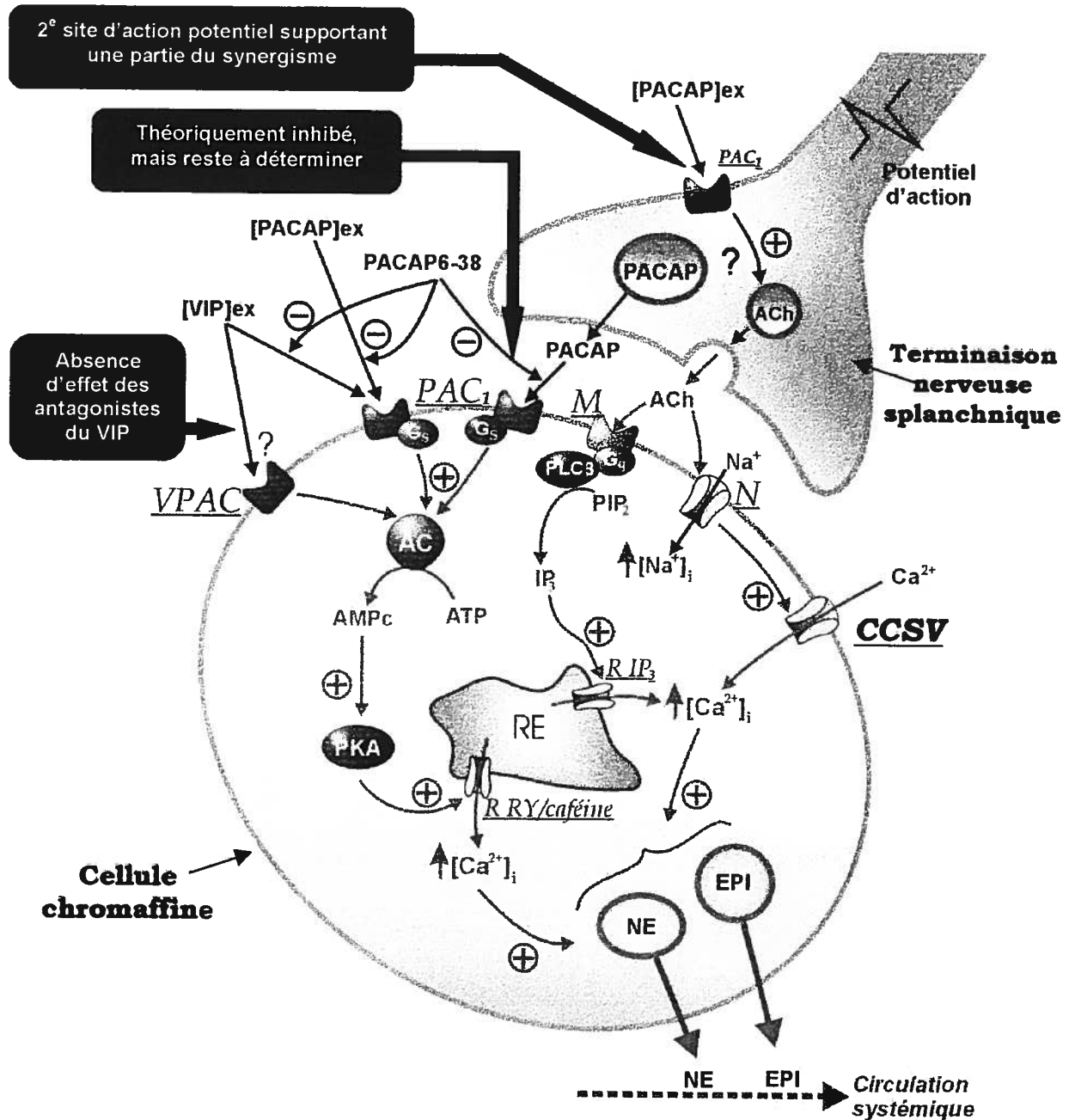


Figure 32. Illustration schématique des mécanismes qui sous-tendent l'implication du PACAP dans la sécrétion des catécholamines surrenaliennes. Durant une stimulation intense des fibres nerveuses splanchniques, le PACAP endogène est co-libéré avec l'acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique. Le PACAP peut faciliter la réponse cholinergique suite à l'interaction de divers médiateurs intracellulaires contrôlant la sécrétion des catécholamines via l'activation des récepteurs au PACAP de type I (PAC₁) postsynaptiques localisés sur la cellule chromaffine. Ces récepteurs PAC₁ postsynaptiques sont fonctionnellement impliqués dans la réponse sécrétrice induite par le PACAP d'origine exogène ([PACAP]ex). D'autre part, l'activation de récepteurs PAC₁ pré-synaptiques, situés sur les terminaisons nerveuses splanchniques, pourrait également faciliter la libération d'ACh durant une activation nerveuse, laquelle peut stimuler par la suite les récepteurs nicotiniques (N) et muscariniques (M), augmentant la sécrétion d'épinéphrine (EPI) et de norépinéphrine (NE). AC, adénylcyclase; PLCβ, isoforme β de la phospholypase C; G_s, protéine G de type s; G_q, protéine G de type q; PKA, protéine-kinase A; [Na⁺]_i, concentration intracellulaire du sodium; [Ca²⁺]_i, concentration intracellulaire du calcium; R RY/caféine, récepteur à la ryanodine/caféine; PIP₂, phosphatidyl-inositol-4-biphosphate; IP₃, inositol 1,4,5-triphosphate; R IP₃, récepteur à l'IP₃; RE, réticulum endoplasmique; [VIP]ex, VIP d'origine exogène; VPAC récepteurs au PACAP et au VIP, CCSV, canaux calciques sensibles au voltage.

Conclusions générales

RÉFÉRENCES

- Abel, J.J., et Crawford, A.C.** *On the blood-pressure-raising constituent of the suprarenal capsule. Bull. John Hopkins Hosp.*, 8: 151-157, 1897.
- Ahlquist, R.P.** *A study of adrenotropic receptors. Am. J. Physiol.*, 153: 586-600, 1948.
- Allen, J.M. Adrian, T., Polak, J., et Bloom, S.R.** *Neuropeptide Y (NPY) in the adrenal gland. J. Auton. Nerv. Syst.*, 9: 559-563, 1983.
- Allen, J., Tatemoto, K., Polak, J., Hughes, J., et Bloom, S.** *Two novel related peptide, neuropeptide Y (NPY) and peptide YY (PYY) inhibit the contraction of the electrically stimulated mouse vas deferens. Neuropeptides*, 3: 71-77, 1982.
- Arimura, A.** *Perspectives on pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) in the Neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. Jpn. J. Physiol.*, 48: 301-331, 1998.
- Arimura, A., Somogyvari-Vigh, A., Miyata, A., Mizuno, K., Coy, D.H., et Kitada, C.** *Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. Endocrinology*, 129: 2787-2789, 1991.
- Aunis, D. et Langley, K.** *Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. Acta Physiol. Scand.*, 167: 89-97, 1998.
- Axelrod, J.** *Methylation reaction in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines. Pharmacol. Rev.*, 18:95-113, 1966.
- Axelrod, J., et Reisine, I.D.** *Stress hormones: their interaction and regulation. Science*, 224: 452-459, 1984.
- Ballesta, J.J., Borger, R., Garcia, A.G., et Hidalgo, M.J.** *Secretory and radioligand binding studies on muscarinic receptors in bovine and feline chromaffin cells. J. Physiol. (London)*, 418, 411-426, 1989.

Barbara, J.-G., Lemos, V.S., et Takeda, K. *Pre- and post-synaptic muscarinic receptor in thin slices of rat adrenal gland.* *Eur. J. Neurosc.*, 10: 3535-3545, 1998.

Barger, G., et Dale, H.H. *Chemical structure and sympathomimetic action of amines.* *J. Physiol. (Lond)*, 41: 19-59, 1910.

Bauer, F.E., Hacker, G.W., Terenghi, G., Adrian, T.E., Polak, J.M., et Bloom, S.R. *Localization and molecular forms of galanin in human adrenals: elevated levels in pheochromocytomas.* *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63: 1372-1378, 1986.

Beamish, R.E. and Dhalla, N.S. *Involvement of catecholamines in coronary spasm under stressful conditions.* Dans: Beamish, R.H., Singal, P.K., Dhalla, N.S. (eds), *Stress and Heart Disease*, pp129-141, Martinus Nijhoof Publishing, Boston, 1985.

Bennett, M.R., Burnstock, G., et Holman, M.E. *Transmission from intramural inhibitory nerves to the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli.* *J. Physiol. (London)*, 182: 541-558, 1966.

Bernard, C. *Leçon sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux.* Paris: Ballière, 1878.

Berridge, M.J. *Inositol triphosphate and calcium signaling.* *Nature*, 361: 315-325, 1993.

Blaschko, H. *The specific action of L-dopa-decarboxylase.* *J. Physiol., (Lond)* 96: 50P-51P, 1939.

Blombery, P.A., Kopin, I.J., Gordon, E.K., Markey, S.P., et Erbert, M.H. *Conversion of MHPG to vanillylmandelic acid. Implications for the importance of urinary MHPG.* *Arch. Gen. Psychiatry.*, 37: 1095-1098, 1980.

Boonyaviroj, P., et Gutman, Y. α - and β -adrenoceptors and PGE_2 in the modulation of catecholamine secretion from bovine adrenal medulla in vitro. *J. Pharm. Pharmacol.*, 31: 719-171, 1979.

Bönisch, H., Boer, R., Dobler, M., et Schdt, C. Pharmacological characterization of muscarine receptors of PC12 (rat phæochromocytoma) cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 341: 158-164, 1990.

Briand, R., Yamaguchi, N., Gagné, J., Kimura, T., Farley, L., Foucart, S., Nadeau, R., et de Champlain, J. Corelease of neuropeptide Y like immunoreactivity with catecholamines from the adrenal gland during splanchnic nerve stimulation in anesthetized dogs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 68: 363-369, 1990.

Brenner, M.G. Adrenal medulla. Dans: Gass, G.H., et Kaplan, H.M (eds), *CRC Handbook of Endocrinology*, pp229-240, 1982.

Brown, A.M. et Birnbauner, L. Direct G protein gating of ion channels. *Am. J. Physiol.*, 254: H401-H410, 1988.

Brown, M.J., Jenner, D.A., Allison, D.J., et Dollery, C.T. Variations in individual organ release of noradrenaline measured by an improved radioenzymatic technique; limitations of peripheral venous measurements in the assessment of sympathetic nervous activity. *Clin. Sci.*, 61: 585-590, 1981.

Buck, S.H., et Burk, T.F. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol. Rev.*, 38: 179-226, 1986.

Burgoyne, R.D. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1071: 174-202, 1991.

- Burnstock, G.** *Mechanism of interaction of peptide and nonpeptide vascular neurotransmitter systems. J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 10: S74-S81, 1987.
- Burnstock, G., Hökfelt, T., Gershon, M.D., Iversen, L.L., Kosterlitz, H.W., et Szurszewski, J.H.** *Non-adrenergic, non-cholinergic autonomic neurotransmission mechanisms. Neurosci. Res. Program Bull.*, 17: 377-519, 1979.
- Calne, D.B.** *Neurotransmitters, neuromodulators, and neurohormones. Neurology*, 29: 1517-1521, 1979.
- Cannon, W.B.** *The Wisdom of the Body*, New York: WW Norton, 1939.
- Cannon, W.B., Newton, H.F., Bright, E.M., Menkin, V., et Moore, R.M.** *Some aspects of the physiology of animals surviving complete exclusion of sympathetic nerve impulses. Am. J. Physiol.*, 89: 84-107, 1929.
- Cardenas, A.M., Montiel, C., Esteban, C., Borges, R., et Garcia, A.G.** *Secretion from adrenaline and noradrenaline-storing adrenomedullary cells is regulated by a common dihydropyridine-sensitive calcium channel. Brain Res.*, 456: 364-366, 1988.
- Cardell, L.O., Uddman, R., Luts, A., et Sundler, F.** *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in guinea-pig lung: distribution and dilatory effects. Regul. Pept.*, 36: 379-390, 1991.
- Caulfield, M.P.** *Muscarinic receptors, characterisation, coupling and function. Pharmacol. Ther.*, 58: 319-379, 1993.
- Chatterjee, T.K., Sharma, R.V., et Fisher, R.A.** *Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. J. Biol. Chem.*, 271: 32226-32232, 1996.

Choi, A.Y., Cahill, A.L., Perry, B.D., et Perlman, R.L. *Histamine evokes greater increases in phosphatidylinositol metabolism and catecholamine secretion in epinephrine-containing than in norepinephrine-containing chromaffin cells. J. Neurochem.*, 61, 541-549, 1993.

Collett, A.R., Rand, M.J., et Story, D.F. *Catecholamine secretion from the rabbit adrenal gland is not modulated by a mechanism involving β -adrenoceptors. Arch. Int. Pharmacodyn.*, 269: 63-69, 1984.

Cryer, P.E. *Glucose homeostasis and hypoglycemia.* Dans: Wilson, J.D., Foster, D.W. (eds) *Williams Testbook of Endocrinology*, Saunders Company, Philadelphia, pp, 1992.

Dagerlind, A., Pelto-Huikko, M., Diez, M., et Hökfelt, T. *Adrenal medullary ganglion neurons project into the splanchnic nerve and to the adrenal cortex. Neuroscience*, 69: 1019-1023, 1995.

Dale, H.H. *The action of certain esters and esters of choline and their relation to muscarine. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 6: 147-190, 1914.

Dale, H.H. *Nomenclature of fibers in the autonomic system and their effects. J. Physiol. (Lond)*, 80: 10-11, 1934.

Delmendo, R.E., Michel, A.D., et Whiting, R.L. *Heterogeneity of muscarinic receptors in bovine adrenal medulla. Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 32: 273, 1989.

Duckles, S.P., et Garcia-Villalon, A.L. *Characterization of vascular muscarinic receptors: rabbit ear artery and bovine coronary artery. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 253: 608-613, 1990.

Dun, N.J., Tang, H., Dun, S.L., Huang, R., Dun, E.C., et Wakade, A.R. *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-immunoreactive sensory neurons innervate rat adrenal medulla. Brain. Res.*, 716: 11-21, 1995.

Edwards, A.V., et Jones, C.T. *Autonomic control of adrenal function. J. Anat.*, 183, 291-307, 1993.

Edwards, S.L., Anderson, C.R, Southwell, B.R. et Mcallen, R.M. *Distinct preganglionic neurons innervate noradrenaline and adrenaline cells in the cat adrenal medulla. Neuroscience*, 70: 825-832, 1996.

Eipper, B.A., Stoffers, D.A., et Mains, R.E. *The biosynthesis of neuropeptides: peptide α -amidation. Annu. Rev. Neurosci.*, 15: 57-85, 1992.

Eisenhofer, G., Huynh, T.-T., Hiroi, M., et Pacak, K. *Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma. Rev. Endocrinol. Metab. Disor.*, 2: 297-311, 2001.

Eisenhofer, G., Rundquist, B., Aneman, A., Friberg, P., Dakak, N., Kopin, I.J., Jacobs, M.C., et Lenders, J.W. *Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal metabolism to metanephrines. J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80: 3009-3017, 1995.

Elliot, T.R. *The innervation of the adrenal glands. J. Physiol. (London)*, 46: 285-290, 1913.

Emorine, L.J., Marullo, S., Briend-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C., et Strosberg, A.D. *Molecular characterization of the human β 3-adrenergic receptor. Science*, 245: 1118-1121, 1989.

von Euler, U.S. *A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relation to adrenaline and noradrenaline. Acta. Physiol. Scand.*, 12, 1946.

von Euler, U.S. *Historical remarks. Dans: Thomas, C.C. (ed) Noradrenaline*, Springfield, Illinois, pp 3-7, 1956.

von Euler, U.S. *Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves, the effect of drugs.* Dans: *Eichler, O., Farah, A., Herken, H., et Welch, A.D. (eds) Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol XXXIII, Springer-Verlag, New York, pp 186-230, 1972.

Fedida, D., Shimoni, Y., et Giles, W.R. *A novel effect of norepinephrine on cardiac cells is mediated by α_1 -adrenoceptors.* *Am. J. Physiol.*, 256: H1500-H1504, 1989.

Feldberg, W., Munz, B., et Tsudzimura, H. *The mechanism of nervous discharge of adrenaline.* *J. Physiol. (London)*, 81: 286-304, 1934.

Felder, C. *Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors.* *FASEB J.*, 9: 619-625, 1995.

Fernando, J.C.R., Abdallah, E.-S.A.M., Evinger, M.J., Forray, C., et El-Fakahany, E.E. *The presence of an M4 subtype muscarinic receptor in the bovine adrenal medulla revealed by mRNA and receptor binding analysis.* *Eur. J. Pharmacol.*, 207: 297-303, 1991.

Feuerstein, G. et Gutman, Y. *Preferential secretion of adrenaline or noradrenaline by the cat adrenal in vivo in response to different stimuli.* *Br. J. Pharmacol.*, 43: 764-775, 1971.

Filipsson, K., Tornoe, K., Holst, J.J., et Ahrén, B. *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates insulin and glucagon secretion in humans.* *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82: 3093-3098, 1997.

Fillenz, M. et Howe, P.R.C. *Depletion of noradrenaline stores in sympathetic nerve terminals.* *J. Neurochem.*, 24: 683-688, 1975.

Folkow, B., et von Euler, U.S. *Selective activation of noradrenaline and adrenaline producing cells in the cat's adrenal by hypothalamic stimulation.* *Circ. Res.*, 2: 191-195, 1954.

Fontaine, P., Wemeau, J.L., Racadot, A., et Fossati, P. *Les catécholamines dans l'expression cardio-vasculaire des phéochromocytomes : 1- Rôle physiologique de la noradrénaline, de l'adrénaline et de la dopamine. Ann. Endocrinol. (Paris), 47: 188-196, 1986.*

Foucart, S., de Champlain, J., et Nadeau, R. *Modulation by β -adrenoceptors and angiotensin II receptors of splanchnic nerve evoked catecholamine release from the adrenal medulla. Can. J. Physiol. Pharmacol., 69: 1-7, 1991.*

Foucart, S., de Champlain, J., et Nadeau, R. *In vivo modulation by α -adrenoceptors of adrenal catecholamine release in the anesthetized dog. Can. J. Physiol. Pharmacol., 66: 380-384, 1988a.*

Foucart, S., Nadeau, R., et de Champlain, J. *The release of catecholamines from the adrenal medulla and its modulation by α_2 -adrenoceptors in the anesthetized dog. Can. J. Physiol. Pharmacol., 65: 550-557, 1987.*

Foucart, S., Nadeau, R., et de Champlain, J. *Local modulation of adrenal catecholamines release by β_2 -adrenoceptors in the anesthetized dog. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 337: 29-34, 1988b.*

Fridolf, T., Sundler, F., et Ahrén, B. *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): Occurrence in rodent pancreas and effects on insulin and glucagons secretion in the mouse. Cell Tissue Res., 269: 275-279, 1992.*

Fried, G., Lundberg, J.M., et Theodorsson-Norheim, E. *Subcellular storage and axonal transport of neuropeptide Y (NPY) in relation to catecholamines in the cat. Acta. Physiol. Scand., 125: 145-154, 1985.*

- Fried, G., Terenius, L., Hökfelt, T., et Goldstein, M. *Evidence for differential localization of noradrenaline and neuropeptide Y in neuronal storage vesicles isolated from rat vas deferens. J. Neurosci.*, 5: 450-458, 1985.
- Frielle, T., Collins, S., Daniel, K.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., et Kobilka, B.K. *Cloning of the cDNA for the β_1 -adrenergic receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84: 7920-7924, 1987.
- Fryer, A.D., et MacLagan, J. *Muscarinic inhibitory receptors in pulmonary parasympathetic nerves in the guinea pig. Br. J. Pharmacol.*, 83: 973-978, 1984.
- Fukushima, Y., Hikichi, H., Mizukami, K., Nagayama, T., Yoshida, M., Suzuki-Kusaba, M., Hisa, H., Kimura, T., et Satoh, S. *Role of endogenous PACAP in catecholamine secretion from the rat adrenal gland. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 281: R1562-R1567, 2001a.
- Fukushima, Y., Nagayama, T., Kawashima, H., Hikichi, H., Yoshida, M., Suzuki-Kusaba, M., Hisa, H., Kimura, T., et Satoh, S. *Role of calcium channels and adenylate cyclase in the PACAP-induced adrenal catecholamine secretion. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 281: R495-R501, 2001b.
- Gaspo, R., Lamarche, L., de Champlain, J., et Yamaguchi, N. *Canine adrenal catecholamine response to VIP is blocked by PACAP-(6-27) in vivo. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 272: R1606-R1612, 1997.
- Gaspo, R., Yamaguchi, N., et de Champlain, J. *Correlation between neural release of VIP and adrenomedullary catecholamine secretion in vivo. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 268: R1449-R1455, 1995.

- Gaytan, F., Martinez-Fuentes, A.J., Gracia-Navarro, F., Vaudry, H., et Aguilar, E. *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunolocalization in lymphoid tissues of the rat. Cell. Tissues Res.*, 276: 223-227, 1994.
- Geng, G., Gaspo, R., Trabelsi, F., et Yamaguchi, N. *Role of L-type Ca^{2+} channel in PACAP-induced adrenal catecholamine release in vivo. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 273: R1339-R1345, 1997.
- Gerber, S.H. et Südhof, T.C. *Molecular determinants of regulated exocytosis. Diabetes*, 51(1): S3-S11, 2002.
- Ginda, W.J., Nussdorfer, G.G., et Malendowicz, L.K. *Effect of bilateral splanchnic-nerve section and chemical sympathectomy on PACAP₃₈ content in the rat adrenals. Horm. Metab. Res.*, 31: 483-485, 1999.
- Giaroni, C., Somaini, L., Marino, F., Cosentino, M., Leoni, O., De Ponti, F., Lecchini, S., et Frigo, G. *Acetylcholine detection by a modified HPLC-ED method improves the assessment of cholinergic function in the myenteric plexus of the guinea-pig colon. Neurosci. Letters*, 232: 9-12, 1997.
- Gourlet, P., Vandermeers, A., Robberecht, P., et Deschodt-Lanckman, M. *Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP-27, but not PACAP-38) degradation by the neutral endopeptidase EC 3.4.24.11. Biochem. Pharmacol.*, 54: 509-515, 1997.
- Goyal, R.K. *Muscarinic receptor subtypes. Physiology and clinical implications. N. Engl. J. Med.*, 321: 1022-1029, 1989.
- Graefe, K.-H., et Bonisch, H. *The transport of amines across the axonal membranes of noradrenergic and dopaminergic neurons. Dans: Trendelenburg, U., Weiner, N. (eds), Catecholamines I*, pp193-245, Springer-Verlag, New York, 1988.

- Graefe, K.-H. et Henseling, M.** *Neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. Gen. Pharmac.*, 14: 27-33, 1983.
- Gray, S.L., Yamaguchi, N., Vencova, P., et Sherwood, N.M.** *Temperature-sensitive phenotype in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Endocrinology*, 143: 3946-3954, 2002.
- Greenberg, A., et Zinder, O.** *α - and β -receptor control of catecholamine secretion from isolated adrenal medulla cells. Cell Tissue Res.*, 226: 655-665, 1982.
- Hamelink, C., Tjurmina, O., Damadzic, R., Young, W.S., Weihe, E., Lee, H.W., et Eiden, L.E.** *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. Proc Natl Acad Sci USA*, 99(1): 461-466, 2002.
- Hannibal, J., Ekblad, E., Mulder, H., Sundler, F., et Fahrenkrug, J.** *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: Distribution and effects of capsaicin or denervation. Cell Tissue Res.*, 291: 65-79, 1998.
- Harkins, A.B., et A.P., Fox.** *Activation of purinergic receptors by ATP inhibits secretion in bovine adrenal chromaffin cells. Brain Res.*, 885 (2): 231-239, 2000.
- Harmar, A.J., Arimura, A., Gozes, I., Journot, T., Laburthe, M., Pisegna, J.R., Rawlings, S.R., Robberecht, P., Said, S.I., Sreedharan, S.P., Wank, S.A., et Waschek, J.A.** *International Union of Pharmacology. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). Pharmacol. Rev.*, 50: 265-270, 1998.
- Harrison, R.G., et Hoey, M.J.** *The adrenal circulation. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1960.*

- Hausser-Kronberger, C., Albegger, K., Saria, A., et Hacker, G.W.** *Neuropeptides in human salivary (submandibular and parotid) glands. Acta Otolaryngol.*, 112: 343-348, 1992.
- Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E. et Matthews, G.** *Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. Nature*, 371, 513-515, 1994.
- Hinson, J.P., Cameron, L.A., Purbriek, A., et Kapas, S.** *The role of neuropeptides in the regulation of adrenal vascular tone: Effects of vasoactive intestinal polypeptide, substance P, neuropeptide Y, neurotensine, Met-enkephalin, and Leu-enkephalin on perfusion medium flow rate in the intact perfused rat adrenal. Regul. Pept.*, 57: 55-61, 1994.
- Hirning, L.D., Fox, A.P., McCleskey, E.W., Olivera, B.M., Thayer, S.A., Miller, R.J., et Tsien, R.W.** *Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. Science*, 239: 57-61, 1988.
- Hirose, M., Furukawa, Y., Nagashima, Y., Yamazaki, K., Hoyano, Y., et Chiba, S.** *Effects of PACAP-38 on the SA nodal pacemaker activity in autonomically decentralized hearts of anesthetized dogs. J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 29: 216-221, 1997.
- Hökfelt, T.** *Neuropeptides in perspective: The last ten years. Neuron*, 7: 867-879, 1991.
- Hökfelt, T., Broberger, C., David Xu, Z.-Q., Sergeev, V., Ubink, R., et Diez, M.** *Neuropeptides – an overview. Neuropharmacol.*, 39: 1337-1356, 2000.
- Holets, V., et Elde, R.** *The differential distribution and relationship of serotonergic and peptidergic fibers to sympathoadrenal neurons in the intermediolateral cell column of the rat: a combined retrograde axonal transport and immunofluorescence study. Neuroscience*, 7: 1155-1174, 1982.

- Holgert, H., Dagerlind, A., et Hökfelt.** *Immunohistochemical characterization of the peptidergic innervation of the rat adrenal gland.* *Horm. Metab. Res.*, 30: 315-322, 1998.
- Hollinshead, W.H.** *The innervation of the adrenal glands.* *J. Comp. Neurol.*, 64: 449-465, 1936.
- Holzbauer, M., et Sharman, D.F.** *The distribution of catecholamines in vertebrates.* Dans: Blaschko H. & Muscholl E. (eds) *Catecholamines, Handb. Exp. Pharm.* Vol XXXIII, pp. 110-185. Springer-Verlag Berlin, 1972.
- Hosoya, M., Kimura, C., Ogi, K., Ohkubo, S., Miyamoto, Y., Kugoh, H., Shimizu, M., Onda, H., Oshimura, M., Arimura, A., et Fujino, M.** *Structure of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene.* *Biochim. Biophys. Acta*, 1129: 199-206, 1992.
- Houchi, H., Okuno, M., Kitamura, K., Ishimura, Y., Ohuchi, T., et Oka, M.** *Calcium efflux from cultured bovine adrenal chromaffin cells induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): Possible involvement of an $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange mechanism.* *Life Sci.*, 56: 1825-1834, 1995.
- Huganir, R.L. et Greengard, P.** *Regulation of receptor function by rotein phosphorylation.* *Trends Pharmacol. Sci.*, 8: 470-477, 1989.
- Hutchins, C.** *Three-dimensional models of the D1 and D2 dopamine receptors.* *Endocrinol. J.*, 2: 7-23, 1994.
- Idelman, S.** *Ultrastructure of the mammalian adrenal cortex.* *Int. Rev. Cytol.*, 27: 181-221, 1970.

- Inoue, M., Fujishiro, N., Ogawa, K., Muroi, M., Sakamoto, Y., Imanaga, I., et Shioda, S.** *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide may function as a neuromodulator in guinea-pig adrenal medulla. J. Physiol. (London), 528 (3): 473-487, 2000.*
- Inoue, M., Sakamoto, Y., et Imanaga, I.** *Phosphatidylinositol hydrolysis is involved in production of Ca^{2+} -dependent currents, but not non-selective cation currents, by muscarine in chromaffin cells. Eur. J. Pharmacol., 276: 123-129, 1995.*
- Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K., et Nagata, S.** *Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. Neuron, 8: 811-819, 1992.*
- Isobe, K., Nakai, T., et Takuwa, Y.** *Ca^{2+} -dependent stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in catecholamine secretion from cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. Endocrinology, 132: 1757-1765, 1993.*
- Isobe, K., Nomura, F., Takekoshi, K., et Nakai, T.** *Pertussis pretreatment enhances catecholamine secretion induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells: A possible role of the inositol lipid cascade. Neuropeptides, 27: 269-275, 1994.*
- Iversen, L.L.** *Catecholamine uptake processes. Br. Med. Bull., 29:130-135, 1973.*
- Jansen-Olensen, I., Goadsby, P.J., Uddman, R., et Edvinsson, L.** *Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like peptides in the cerebral circulation of the cat. J. Auton. Nerv. Syst., 49: S97-S103, 1994.*
- Joh, T.H., Park, D.H., et Reis, D.J.** *Direct phosphorylation of brain tyrosine hydroxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase: Mechanism of enzyme activation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75: 4744-4748, 1978.*

- Kalin, A.** *Structure of nicotinic acetylcholine receptors. Curr. Opin. Neurobiol.*, 3: 299-309, 1993.
- Kaplan, G.P., Hartman, B.K., et Creveling, C.R.** *Immunohistochemical demonstration of catechol-O-methyltransferase in mammalian brain. Brain Res.*, 167: 241-250, 1979.
- Katsoulis, S., Clemens, A., Schwörer, H., Creutzfeldt, W., et Schmidt, W.E.** *PACAP is a stimulator of neurogenic contraction in guinea pig ileum. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 265: G295-G302, 1993.
- Kellaway, C.H., et Cowell, S.J.** *On the concentration of the blood and the effects of histamine in adrenal insufficiency. J. Physiol. (London)*, 57: 82-99, 1923.
- Khalil, Z., Livett, B.G., et Marley, P.D.** *The role of sensory fibers in the rat splanchnic nerve in the regulation of adrenal medullary secretion during stress. J. Physiol. (London)*, 370: 201-215, 1986a.
- Khalil, Z., Marley, P.D., et Livett, B.G.** *Elevation in plasma catecholamines in response to insulin stress is under both neuronal and nonneuronal control. Endocrinology*, 119: 159-167, 1986b.
- Kimura, S., Ohshige, Y., Lin, L., Okumura, T., Yanaihara, C., Yanaihara, N., et Shiotani, Y.** *Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the hypothalamus-pituitary system in rats: Light and electron microscopic immunocytochemical studies. J. Neuroendocrinol.*, 6: 503-507, 1994.
- Koganei, H., Kimura, T., et Satoh, S.** *Effects of beta adrenoceptor agonists and antagonists on adrenal catecholamine release in response to splanchnic nerve stimulation in anesthetized dogs: role of beta-1 and beta-2 adrenoceptors. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273(3): 1337-1344, 1995.

- Kohn A.** *Das chromaffine Gewebe. Ergebnisse Anat Entwickl* 12: 253-348, 1902.
- Kopin, I.J.** *Catecholamine metabolism: Basic aspects and clinical significance. Pharmacol. Rev.*, 37: 333-364, 1985.
- Köves, K., Arimura, A., Vigh, S., Somogyvari-Vigh, A., et Miller, J.** *Immunohistochemical localization of PACAP in the ovine digestive system. Peptides*, 14: 449-455, 1993.
- Kuramoto, K., Kondo, H^o, et Fujita, T.** *Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in scattered chromaffin cells and nerve fibers in the adrenal gland of rats. Cell Tissue Res.*, 247: 309-315, 1987.
- Lamouche S, Martineau D, et Yamaguchi N.** *Modulation of adrenal catecholamine release by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vivo. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 276: R162-R170, 1999.
- Lamouche S, et Yamaguchi N.** *Role of PAC₁ receptor in adrenal catecholamine secretion induced by PACAP and VIP in vivo. Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 280: R510-R518, 2001.
- Lamouche, S., et Yamaguchi, N.** *PACAP release from the canine adrenal gland in vivo : its functional role in severe hypotension. Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 284: R1-R10, 2003.
- Lands, A.M., Luduena, F.P., et Buzzo, H.H.** *Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. Life Sci.*, 6: 2241-2249, 1967.
- Landsberg, L., et Young, J.B.** *Catecholamines and the adrenal medulla.* Dans: Wilson J.D. & Foster D.W. (eds) *Textbook of Endocrinology*, 8^{ième} ed., pp. W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1992.

- Langer, S.Z.** *Presynaptic regulation of catecholamine release. Biochem. Pharmacol.*, 23: 1793-1800, 1974.
- Lefkowitz, R.J., Hoffman, B.B., et Taylor, P.** *La neurotransmission: les systèmes nerveux autonome et moteur somatique.* Dans: Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., et Gilman, A. G. (eds), Goodman & Gilman, *Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments*, 9^{ième} édition, pp105-139, McGraw-Hill International (UK) Ltd, Berkshire, 1998.
- Leon, C., Grant, N.J., Aunis, D., et Langley, O.K.** *L1 cell adhesion molecule is expressed by noradrenergic but not adrenergic chromaffin cells: a possible major for L1 in adrenal medullary design. Eur. J. Neurosc.*, 4: 201-209, 1992.
- Lerner, E.A., Ribeiro, J.M.C., Nelson, J.R., et Lerner, M.R.** *Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly Lutzomyia longipalpis. J. Biol. Chem.*, 266(17): 11234-11236, 1991.
- Levey, A.I.** *Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. Life Sci.*, 52: 441-448, 1993.
- Lhoste, F.** *Études physiologiques et pharmacologiques de la médullo-surrénale par la mesure des taux plasmatiques des catécholamines. J. Pharmacol. Paris*, 16, Suppl. I: 139-151, 1985.
- Linnoila, R.I., Diaugustine, R.P., Hernoven, A., et Miller, R.J.** *Distribution of [Met⁵]- and [Leu⁵]-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. Neuroscience*, 5: 2247-2259, 1980.
- Livett, B.G.** *Adrenal medullary cells in-vitro. Physiol. Rev.*, 64: 1103-1161, 1984.

- Livett, B.G.** *The secretory process in adrenal medullary cells.* Dans: Cantin, M. (eds), *Cell biology of the secretory process*, pp309-358, Basel, Karger, 1990.
- Livett, B.G., et Marley, P.D.** *Noncholinergic control of adrenal catecholamine secretion.* *J.Anat.*, 183: 277-289, 1993.
- Lledo, P.M.** *Exocytosis in excitable cells: a conserved molecular machinery from yeast to neuron.* *Eur. J. Endocrinol.*, 137: 1-9, 1997.
- Loewi, O.** *Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I Mitt* *Pflügers Arch. ges Physiol.*, 189: 239-242, 1922.
- Loewi, O.** *Quantitative und qualitative Untersuchungen über den Sympaticusstoff. Zugleich XIV, Mitt. über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung.* *Pflügers Arch. ges Physiol.*, 237: 504-514, 1936.
- Loewi, O., et Navratil, E.** *Über den Mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin.* *Pflügers Arch. ges Physiol.*, 214: 689-696, 1926.
- Lotta, T., Vidgren, J., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Melen, K., Julkunen, I., et Taskinen, J.** *Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: A revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme.* *Biochemistry*, 34: 4202-4210, 1995.
- Lovenberg, W., Bruckwick, E.A., et Hanbauer, I.** *ATP, cyclic-AMP, and magnesium increase the affinity of rat striatal tyrosine hydroxylase for its cofactor.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 2955-2958, 1982.
- Lundberg, J.M.** *Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide.* *Pharmacol. Review*, 48 (1): 113-178, 1996.

Lundberg, J.M., Franco-Cereceda, A., Lou, Y.-P., Modin, A., et Pernow, J. *Differential release of classical transmitters and peptides.* Dans: Stjärne, L. Greengard, P., Grillner, S., Hökfelt, T., et Ottoson, D. (eds), *Advances in second messenger and phosphoprotein research: Molecular and cellular mechanism of neurotransmitter release*, vol. 29, pp.223-234, Raven Press, New York, 1994.

Lundberg, J.M., Fried, G., Fahrenkrug, J., Holmstedt, B., Hökfelt, T., Lagercrantz, H., Lundgren, G., et Änggard, Å. *Subcellular fractionation of cat submandibular gland: comparative studies on the distribution of acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide (VIP).* *Neuroscience*, 6: 1001-1010, 1981.

Lundberg, J.M., Hedlund, B., Änggard, Å., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T., Tatemoto, K., et Bartfai, T. *Costorage of peptides and classical transmitters in neurons.* Dans: Bloom, S.R., Polak, J.M., et Lindenlaub, E. (eds): *Systemic role of regulatory peptides*, pp.93-119, Schattauer, Stuttgart, 1982.

Lundberg, J.M., Rokaeus, A., Hökfelt, T., Rosell, S., Brown, M., et Goldstein, M. *Neurotensin-like immunoreactivity in the preganglionic sympathetic nerve and in the adrenal medulla of the cat.* *Acta Physiol. Scand.*, 114: 153-155, 1982.

Luts, L., et Sundler, F. *Peptide-containing fibers in the parathyroid glands of different species.* *Regul. Pept.*, 50: 147-158, 1994.

Mains, R.E., Dickerson, I.M., May, V., Stoffers, D.A., Perkins, S.N., Ouafik, L., Husten, E.J., et Eipper, B.A. *Cellular and molecular aspects of peptide hormone biosynthesis.* *Front. Neuroendocrinol.*, 11: 52-89, 1990.

Majewski, H., Rand, M.J., et Tung, L.H. *Activation of prejunctional b-adrenoceptors in rat atria by adrenaline applied exogenously or released as a co-transmitter.* *Br. J. Pharmacol.*, 73: 669-679, 1981.

- Malhotra, R.K., et Wakade, A.R.** *Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the secretion of catecholamines from the rat adrenal gland. J. Physiol. (Lond.)*, 388: 285-294, 1987.
- Malhotra, R.K., Wakade, T.D., et Wakade, A.R.** *Vasoactive intestinal polypeptide and muscarine mobilize intracellular Ca^{2+} through breakdown of phosphoinositides to induce catecholamine secretion. Role of IP_3 in exocytosis. J. Bio. Chem.*, 263: 2123-2126, 1988.
- Marley, P.D., Bunn, S.J., Wan, D.C.C., Allen, A.M., et Mendelsohn, F.A.O.** *Localization of angiotensin II binding sites in the bovine adrenal medulla using a labeled specific antagonist. J. Neurosci.*, 28: 777-787, 1989.
- Marley, P.D. et Livet, B.G.** *Neuropeptides in the autonomic nervous system. CRC Crit. Rev. Clin. Neurobiol.*, 1: 2001-283, 1985.
- Marley, P.D., et Prout, G.I.** *Physiology and pharmacology of the splanchnic-adrenal medullary junction. J. Physiol.*, 180: 483-513, 1965.
- Marley, P.D., et Prout, G.I.** *Innervation of the cat's adrenal medulla. J. Anat.*, 102: 257-273, 1968.
- Martineau, D., Lamouche, S., Briand, R., et Yamaguchi, N.** *Functional involvement of angiotensin AT_2 receptor in adrenal catecholamine secretion in vivo. Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 77: 367-374, 1999.
- Matteoli, M, Haimann, C., Torri, T.F., Polak, J.M., Ceccarelli, B., et De Camilli, P.** *Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7366-7370, 1988.

- Maycock, W.D.A., et Heslop, T.S. *An experimental investigation of the nerve supply of the adrenal medulla of the cat. J. Anat.*, 73, 551-558, 1939.
- McRory, J., et Sherwood, N.M. *Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. Endocrinology*, 138: 2380-2390, 1997.
- Minneman, K.P., Hegstrand, L.R., et Molinoff, P.B. *Simultaneous determination of beta₁ and beta₂ adrenergic receptors in tissues containing both receptor subtypes. Mol. Pharmacol.*, 16: 34-46, 1979.
- Mirkin, B.L. *Factors influencing the selective secretion of adrenal medullary hormones. J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, 132: 218-225, 1961.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., et Coy, D.H. *Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164: 567-574, 1989.
- Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R.D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Minamino, N., et Arimura, A. *Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170: 643-648, 1990.
- Mohamed, A.A., Parker, T.L., et Coupland, R.E. *The innervation of the adrenal gland. II. The source of spinal afferent nerve fibres to the guinea-pig adrenal gland. J. Anat.*, 160: 51-58, 1988.
- Moller K, and Sundler F. *Expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and PACAP type I receptors in the rat adrenal medulla. Regul. Pept.*, 63: 129-139, 1996.

- Moller, K., Zhang, Y.Z., Häkanson, R., Luts, A., Sjölund, B., Uddman, R. et Sundler, F. *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is a sensory neuropeptide: Immunocytochemical and immunochemical evidence. Neuroscience*, 57: 725-732, 1993.
- Morita, K., Dohi, T., Kitayama, S., Koyarra, Y., et Tsujimoto, A. *Enhancement of stimulation-evoked catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells by forskolin. J. Neurochem.*, 48: 243-247, 1987.
- Moro, O., et Lerner, E.A. *Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. J. Biol. Chem.*, 272: 966-970, 1997.
- Moro, O., Wakita, K., Ohnuma, M., Denda, S., et Lerner, E.A. *Functional characterization of structural alterations in the sequence of the vasodilatory peptide maxadilan yields a pituitary adenylate cyclase-activating peptide type I receptor-specific antagonist. J. Biol. Chem.*, 274: 23103-23110, 1999.
- Murad, F., Chi, Y.M., Rall, T.W., et Sutherland, E.W. *Adenylcyclase III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine-3'-5'-phosphate by preparations from cardiac muscle and liver. J. Biol. Chem.*, 237: 1233-1238, 1962.
- Musso, N.R., Vergassola, C., Pende, A., et Lotti, G. *Simultaneous measurement of plasma catecholamine (norepinephrine, epinephrine, and dopamine) and free N-methyl dopamine (epinephrine) levels, by HPLC with electrochemical detection. J. Liq. Chromatogr.*, 13: 2217-2228, 1990.
- Nagatsu, T., Levitt, M., et Udenfriend, S. *Tyrosine hydroxylase: The initial step in norepinephrine biosynthesis. J. Biol. Chem.*, 239: 2910-2917, 1964.
- Nedeljkovic, Z.S., Gokce, N., et Loscalzo, J. *Mechanism of oxidative stress and vascular dysfunction. Postgrad. Med. J.* 79:195-200, 2003.

- Nestler, E.J., et Greengard, P.** *Protein phosphorylation and the regulation of neuronal function.* Dans: Sigel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Molinoff, P.B. (eds), *Basic Neurochemistry*, pp373-398, Raven Press, New York, 1989.
- Nishizuka, Y.** *Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C.* *Science*, 258: 607-614, 1992.
- Nogi, H., Hashimoto, H., Fujita, T., Hagihara, N., Matsuda, T., et Baba, A.** *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor mRNA in the rat adrenal gland: localization by in situ hybridization and identification of splice variants.* *Jpn. J. Pharmacol.*, 75: 203-207, 1997.
- O'Farrell, M. et Marley, P.D.** *Multiple calcium channels are required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced catecholamine secretion from bovine cultured adrenal chromaffin cells.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 356: 536-542, 1997.
- Okamoto, T., Murayama, Y., Hayashi, Y., Inagaki, M., Ogata, E., et Nishimoto, I.** *Identification of a G_s activator region of the β_2 -adrenergic receptor that is autoregulated via a protein kinase A-dependent phosphorylation.* *Cell*, 67: 723-730, 1991.
- Olsson, C., et Holmgren, S.** *Distribution of PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)-like and helospectin-like peptides in the teleost gut.* *Cell Tissue Res.*, 277: 539-547, 1994.
- Osswald, W., et Guimarães, S.** *Adrenergic mechanism in blood vessels: morphological and pharmacological aspects.* *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 96: 5-122, 1983.
- Pacholczyk, T., Blakely, R.D., et Amara, S.G.** *Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter.* *Nature*, 350: 350-354, 1991.

- Palade, G.E.** *Intracellular aspects of the process of protein secretion.* *Science*, 89: 347-358, 1975.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., et Moncada, S.** *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor.* *Nature* 327: 524-526, 1987.
- Parker, T.L., Kesse, W.K., A.A., Mohamed, et Afework, M.** *The innervation of the mammalian adrenal gland.* *J. Anat.*, 183: 265-276, 1993.
- Parson, S.M., Prior, C., et Marshall, I.G.** *Acetylcholine transport, storage, and release.* *Int. Rev. Neurobiol.*, 35: 279-390, 1993.
- Payet, M.D., Bilodeau, L., Breault, L., Fournier, A., Yon, L., Vaudry, H., et Galot-Payet, N.** *PAC1 receptor activation by PACAP-38 mediates Ca²⁺ release from a camp-dependent pool in human fetal adrenal gland chromaffin cells.* *J. Biol. Chem.*, 278(3): 1663-1670, 2003.
- Peach, M.J.** *Adrenal medullary stimulation induced by angiotensin I, angiotensin II and analogues.* *Circ. Res.*, 29 (suppl. II): 107-117, 1971.
- Pelto-Huikko, M.** *Immunocytochemical localization of neuropeptides in the rat adrenal medulla.* *J. Electron. Micro. Tech.*, 12: 364-379, 1989.
- Pisegna, J.R., et Wank, S.A.** *Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6345-6349, 1993.
- Philippu, A., et Matthaei, A.** *Transport and storage of catecholamines in vesicles.* Dans: Trendelenburg, U., Weiner, N. (eds), *Catecholamines I*, pp1-42, Springer-Verlag, New York, 1988.

- Phillips, J.H.** *Dynamic aspects of chromaffin granule structure. Neuroscience*, 7: 1595-1609, 1982.
- Porter, J.C., Kedzierski, W., Aguila-Mansilla, N., et Kozlowski, G.P.** *Stimulation of molecular events associated with secretion by catecholaminergic cells in culture.* Dans: Kvetnansky, R., McCarty, R., et Axelrod, J. (eds), *Stress: Neuroendocrine and Molecular Approaches*, pp351-362, Gordon and Breach, New York, 1992.
- Przywara, D. S., X. Guo, M. L. Angelilli, T. D. Wakade, et A. R. Wakade.** *A non-cholinergic transmitter, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, utilizes a novel mechanism to evoke catecholamine secretion in rat adrenal chromaffin cells. J. Biol. Chem.*, 271: 10545-10550, 1996.
- Rand, M.J., Majewski, H., et Story, D.F.** *Modulation of neuroeffector transmission.* Dans: Antonaccio, M., (ed), *Cardiovascular. Pharmacology.* Pp229-292, Raven Press. Ltd., New York, 1990.
- Remie, R., et Zaagsma, J.** *A new technique for the study of vascular presynaptic receptors in freely moving rats. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 251: H463-H467, 1986.
- Rhodin, J.A.G.** *The ultrastructure of the adrenal cortex of the rat under normal and experimental conditions. J. Ultrastruct. Res.*, 34: 23-71, 1971.
- Rius, R.A., Guidotti, A., et Costa, E.** *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) potently enhances tyrosine hydroxylase (TH) expression in adrenal chromaffin cells. Life Sci.*, 54: 1735-1743, 1994.
- Robberecht P, Wousen-Colle MC, De Neef P, Gourlet P, Buscail L, Vandermeers A, et Vandermeers-Piret MC.** *The two forms of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-(1-27) and PACAP-(1-38)) interact with distinct receptors on rat pancreatic AR4-2J cell membranes. FEBS Lett.*, 286: 133-136, 1991.

- Runcie, M.J., Hulman, L.G., et Potter, E.K.** *Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cardiovascular and respiratory responses in anesthetized dogs. Regul. Pept.*, 60: 193-200, 1995.
- Sabban, E., Kvetnansky, R., McMahon, A., Fukuhara, K., Kilbourne, E., et Kopin, I.J.** *Stressors regulate mRNA levels of tyrosine hydroxylase and dopamine β -hydroxylase in adrenals both in vivo and in PC12 cells.* Dans: Kvetnansky, R., McCarty, R., et Axelrod, J. (eds), *Stress: Neuroendocrine and Molecular Approaches*, pp325-335, Gordon and Breach, New York, 1992.
- Said, S.I.** *Evidence for secretion of vasoactive intestinal peptide by tumours of pancreas, adrenal, thyroid and lung: support for the unifying APUD concept. Clin. Endocrinol.*, 5: 201-204, 1976.
- Sapirstein, L.A., et Goldman, H.** *Adrenal blood flow in the albino rat. Am. J. Physiol.*, 196: 159-162, 1959.
- Sargent, P.B.** *The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Ann. Rev. Neurosci.*, 16: 403-443, 1993.
- Schneider, A.** *Muscarinic receptor mechanism in adrenal chromaffin cells.* Dans: Rosenheck, K. et Lelkes, P.I. (eds), *Stimulus-secretion coupling in chromaffin cells*, pp51-86, Boca Raton, CRC Press, 1987.
- Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M., et Chretien, M.** *Precursor convertases: An evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 839: 9-24, 1998.
- Serck-Hanssen, G., et Sovik, O.** *Specific insulin binding in bovine chromaffin cells: demonstration of preferential binding to adrenal-storing cells. Life Sci.*, 41: 2799-2806, 1987.

- Sharma, T.R., Wakade, T.D., Malhotra, R.K., et Wakade, A.R.** *Secretion of catecholamine from the perfused adrenal gland of the rat is not regulated by α -adrenoceptors.* *Eur. J. Pharmacol.*, 122: 167-172, 1987.
- Shearman, M.S., Sekiguchi, K., et Nishizuka, Y.** *Modulation of ion channel activity: a key function of the protein kinase C enzyme family.* *Pharmacol. Rev.*, 41: 211-237, 41.
- Shen, Z., Larsson, L.T., Malmfors, G., Absood, A., Häkanson, R., et Sundler, F.** *A novel neuropeptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), in human intestine: Evidence for reduced content in Hirschsprung's disease.* *Cell Tissue Res.*, 269: 369-374, 1992.
- Shigyo, M., Aizawa, H., Inoue, H., Matsumoto, K., Takata, S., et Hara, N.** *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide regulates neurally mediated airway responses.* *Eur. Respir. J.*, 12: 64-70, 1998.
- Shiotani, Y., Kimura, S., Ohshige, Y., et Yanaihara, N.** *Immunohistochemical localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the adrenal medulla of the rat.* *Peptides*, 16: 1045-1050, 1995.
- Silverberg, A.B., Shah, S.D., Haymond, M.W., et Cryer, P.E.** *Norepinephrine: hormone and neurotransmitter in man.* *Am. J. Physiol.*, 234: E252-E256, 1978.
- Shivers, B.D., T.J. Görcs, P.E. Gottshall, et A. Arimura.** *Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions.* *Endocrinology*, 128: 3055-3065, 1991.
- Skøtt, O.** *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and adrenomedullary function.* *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284: R586-R587, 2003.

- Slotkin, T.A., et Kirshner, N.** *Uptake, storage, and distribution of amines in bovine adrenal medullary vesicles. Mol. Pharmacol.*, 7: 581-595, 1971.
- Smith, A.D.** *Mechanisms involved in the release of noradrenaline from sympathetic nerves. Br. Med. Bull.* 29: 123-129, 1973.
- Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H., et Journot, L.** *Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. Nature*, 365: 170-175, 1993.
- Starke, K.** *Alpha sympathomimetic inhibition of adrenergic and cholinergic transmission in the rabbit heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 274: 18-45, 1972.
- Starke, K., Gothert, M., et Kilbinger, H.** *Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. Physiol. Rev.*, 69: 864-989, 1989.
- Stolz, F.** *Synthesen der wirksamen Substanz der Nebennieren – Syntetisches Suprarenin. Chem. Z.*, 2: 981-982, 1906.
- Strack, A.M., Sawyer, W.B., Hughes, J.J., Platt, K.B., et Loewy, A.B.** *A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. Brain Res.*, 491, 156-162, 1989.
- Sundler, F., Ekblad, E., Absood, A., Häkanson, R., Köves, K., et Arimura, A.** *Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: A novel vasoactive intestinal peptide-like neuropeptide in the gut. Neurosciences*, 46: 439-454, 1992.
- Summers, R.J., et McMartin, L.R.** *Adrenoceptors and their second messenger systems. J. Neurochem.*, 60: 10-23, 1993.
- Swinyard, C.A.** *The innervation of the suprarenal glands. Anat. Rec.*, 68: 417-430, 1937.

- Tabarin, A., D. Chen, R. Hakanson, et F. Sundler.** *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the adrenal gland of mammals: distribution, characterization and responses to drugs.* *Neuroendocrinol.* 59: 113-119, 1994.
- Takamine, J.** *The isolation of the active principle of the suprarenal gland.* *J. Physiol. (Lond)*, 27: 30P-39P, 1901.
- Tams, J.W., Johnsen, A.H., et Fahrenkrug, J.** *Identification of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 1-38 binding factor in human plasma, as ceruloplasmin.* *Biochem. J.*, 341, 271-276, 1999.
- Tanaka, C., et Nishizuka, Y.** *The protein kinase C family for neuronal signaling.* *Annu. Rev. Neurosci.*, 17: 551-567, 1994.
- Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., et Sowadki, J.M.** *Structural framework for the protein kinase family.* *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 8: 429-462, 1992.
- TerBush, D.R., et Holz, R.W.** *Activation of protein kinase C is not required for exocytosis from bovine adrenal chromaffin cells.* *J. Biol. Chem.*, 265: 21179-21184, 1990.
- Thonen, H.** *Induction of tyrosine hydroxylase in peripheral and central adrenergic neurons by cold-exposure in rats.* *Nature*, 228: 861-862, 1970.
- Thureson-Klein, A.** *Exocytosis from large and small dense cored vesicles in noradrenergic nerve terminals.* *Neuroscience*, 10: 245-252, 1983.
- Tomlinson, A., et Coupland, R.E.** *The innervation of the adrenal gland. IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age: a descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats.* *J. Anat.*, 169: 209-236, 1990.

- Tomlinson, A., Durbin, J., et Coupland, R.E.** *A quantitative analysis of rat adrenal chromaffin tissue: morphometric analysis at tissue and cellular level correlated with catecholamine content. Neuroscience*, 20: 895-904, 1987.
- Tornøe K., Hannibal J., Jensen T.B., Georg B., Rickelt L.F., Andreasen M.B., Fahrenkrug J., et Holst JJ.** *PACAP-(1-38) as a neurotransmitter in the porcine adrenal glands. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 279: E1413-E1425, 2000.
- Trendelenburg, U.** *The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines.* Dans: Trendelenburg, U., Weiner, N. (eds), *Catecholamines I*, pp279-319, Springer-Verlag, New York, 1988.
- Tseng, C.J., Chan, J.Y., Lo, W.C., Jan, C.R.** *Modulation of catecholamine release by endogenous adenosine in the rat adrenal medulla. J. Biomed. Sci.*, 8 (5): 389-394, 2001.
- Tuominen, R.K., McMillian, M.K., Ye, H., Stachowiak, M.K., Hudson, R.K. et Hong, J.S.** *Long-term activation of protein kinase C by nicotinic in bovine adrenal chromaffin cells. J. Neurochem.*, 58: 162-52-1658, 1992.
- Uddman, R., Luts, A., Absood, A., Arimura, A., Ekelund, M., Desai, H., Häkanson, R., Hambreaus, G., et Sundler, F.** *PACAP, a VIP-like peptide, in neurons of the esophagus. Regul. Pept.*, 39: 415-422, 1991a.
- Uddman, R., Luts, A., Arimura, A., et Sundler, F.** *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a new vasoactive intestinal peptide (VIP)-like peptide in the respiratory tract. Cell Tissue Res.*, 265: 197-201, 1991b.
- Unwin, N.** *Nicotinic acetylcholine receptor at 9Å resolution. J. Mol. Biol.*, 229: 1101-1124, 1993.

Vanhoutte, P.M., et Miller, W.M. *Alpha 2-adrenoceptors and endothelium derived relaxing factor. Am. J. Med.*, 87: 1S-5S, 1989.

Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Yon, R., Fournier, A., et Vaudry, H. *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: From structure to functions. Pharmacol. Rev.*, 52 (2): 269-324, 2000.

Vaudry, D., et Taupenot, L. *Fast-breaking results on the PACAP/VIP/secretin peptide family in chromaffin cells. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 971: 460-466, 2002.

Verhage, M., McMahon, H.T., Ghijsen, W.E.J.M., Boomsma, F., Scholten, G., Wiegant, V.M., et Nicholls, D.J. *Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals. Neuron*, 6: 517-524, 1991.

Vandermeers, A., Vandendorre, S., Hou, X., De Neef, P., Robberecht, P., Vandermeers-Piret, M.C., et Christophe, J. *Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Eur. J. Biochem.*, 208: 815-819, 1992.

Verhofstad, A.A.J., Coupland, R.E., Parker, T.R. et Goldstein, M. *Immunohistochemical and biochemical study of the development of the noradrenaline- and adrenaline-storing cells of the adrenal medulla of the rat. Cell Tissue Res.*, 242: 233-243, 1985.

Vinson, G.P., Pudney, J.A., et Whitehouse, B.J. *The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis. J. Endocrinol.*, 105: 285-294, 1985.

Wada, A., Takara, H., Izumi, F., Kobayashi H., et Yanagihara, N. *Influx of $^{22}\text{Na}^+$ through acetylcholine receptor-associated Na^+ channels: relationship between $^{22}\text{Na}^+$ influx, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx and secretion of catecholamines in cultured bovine adrenal medulla cells. Neuroscience*, 15: 283-292, 1985.

- Wakade, A.R.** *Noncholinergique transmitter(s) maintains secretion of catecholamines from rat adrenal medulla for several hours of continuous stimulation of splanchnic neurons.* *J. Neurochem.*, 50: 1302-1308, 1988.
- Wakade, A.R., Gou, X., Strong, R., Arimura, A., et Haycock, J.** *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a neurotransmitter in rat adrenal medulla.* *Regul. Pept.*, 37: 327, 1992. (Résumé)
- Wakade, T.D., Blank, M.A., Malhotra, R.K., Pourcho, R., et Wakade, A.R.** *The peptide VIP is a neurotransmitter in rat adrenal medulla: physiological role in controlling catecholamine secretion.* *J. Physiol. (Lond)*, 444: 349-362, 1991.
- Waki, S.** *Spinal root pathway of the adrenal medullary secretory nerve fibers in the dog.* *Tohoku J. Exp. Med.*, 104: 341-348, 1971.
- Watanabe, T., Shimamoto, N., Takahashi, A., et Fujino, M.** *PACAP stimulates catecholamine release from adrenal medulla: a novel noncholinergic secretagogue.* *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 269: E903-E909, 1995.
- Watanabe, T., Masuo, Y., Matsumoto, H., Suzuki, H., Ohtaki, T., Masuda, Y., Kitada, C., Tsuda, M., et Fujino, M.** *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide provokes cultured rat chromaffin cells to secrete adrenaline.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182 (1): 403-411, 1992.
- Wikberg, J.E.S., Andersson, J.R., et Lundholm, L.** *Differentiation of adrenergic alpha-receptors in guinea pig intestine and rabbit aorta.* *Blood Vessels*, 12: 383-384, 1975.
- Wurtman, R.J., et Axelrod, J.** *Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids.* *J. Biol. Chem.*, 241: 2301-2305, 1966.

- Wurtman, R.J., Hefti, F., et Melamed, E.** *Precursor control of neurotransmitter synthesis. Pharmacol. Rev.*, 32: 315-335, 1981.
- Yamaguchi, N.** *Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 70(2): 167-206, 1992.
- Yamaguchi, N.** *In vivo evidences for adrenal catecholamine release mediated by nonnicotinic mechanism: local medullary effect of VIP. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 265: R766-R771, 1993.
- Yamaguchi, N., et Brassard, M.** *A differential effect of yohimbine on adrenal and neuronal catecholamine release during bilateral carotid occlusion in the dog. J. Auton. Nerv. Sys.*, 25: 141-153, 1988.
- Yamaguchi, N., Lamarche, L., et Briand, R.** *Simultaneous evaluation of medullary secretory functions of normal and acutely denervated adrenals. Am. J. Physiol. Regul. Interg. Comp. Physiol.*, 260: R306-R313, 1991.
- Yamaguchi, N., et Lamouche, S.** *Enhanced reactivity of the adrenal medulla in response to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide1-27 (PACAP) during insulin-induced hypoglycemia in anesthetized dogs. Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 77: 819-826, 1999.
- Yon, L., Chartel, N., Freuilley, M., De Marchis, S., Fournier, A., De Rijk, E., Pelletier, G. Roubos, E., et Vaudry, H.** *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates both adrenocortical cells and chromaffin cells in the frog adrenal gland. Endocrinology*, 135: 2749-2758, 1994.
- Yonezawa, T., Furukawa, Y., Lakhe, M., Nagashima, Y., Hirose, M., et Chiba, S.** *PACAP38 activates parasympathetic nerves in isolated, blood-perfused dog atria. Eur. J. Pharmacol.*, 315: 289-296, 1996.

Zhou, X.F., et Livett, B.G. *Substance P increases catecholamine secretion from perfused rat adrenal glands evoked by prolonged field stimulation. J. Physiol. (London), 425, 321-334, 1990.*

Zimanyi, I., Folly, G., et Vizi, E.S. *Inhibition of K⁺ permeability diminishes alpha2-adrenoceptor mediated effects on norepinephrine release. J. Neurosci. Res., 20: 102-108, 1988.*