

Université de Montréal

Effets digestifs moteurs et actions vasculaires du calcitonin gene-related
peptide

par

Marie-Claude L'Heureux

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en physiologie

Juin 1999

© Marie-Claude L'Heureux, 1999



3.335 2.11.5

W
4
058
1999
V.125

Université de Montréal

États signés en vertu de l'acte de l'Université de Montréal

1999

par

Mme. Marie L. Hébert

Département de la recherche

Faculté de médecine

M. Hébert présente à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en sciences (M.Sc.)

en psychologie

JUL 1999

Marie L. Hébert



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Effets digestifs moteurs et actions vasculaires du calcitonin gene-related
peptide

présenté par:
Marie-Claude L'Heureux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur : Mme Christiane Malo
Directeur de recherche : M. Pierre Poitras
Co-directeur : M. Serge St-Pierre
Co-directeur : M. Victor Plourde
Membre de jury : M. Jean Morisset

Mémoire accepté le: 23 septembre 1999

SOMMAIRE

Le calcitonin gene-related peptide (CGRP) est un peptide ubiquitaire de 37 acides aminés, majoritairement localisé au niveau des vaisseaux et des nerfs. Ce peptide est un neurotransmetteur. À l'heure actuelle, deux sous-types de récepteurs ont été caractérisés, soit les sous-types I et II. Le CGRP a un effet de vasodilatation qui est très bien documenté dans la littérature scientifique. Il a également un effet gastro-intestinal qui, semble-t-il, induirait une relaxation musculaire. Cependant, peu d'études se sont penchées sur cet effet et celles-ci ont été faites majoritairement chez le rat. Le CGRP est antagonisé par un peptide de synthèse, le CGRP8-37. Ce dernier a la même structure primaire que le CGRP1-37 à l'exception des sept premiers acides aminés qui ont été enlevés.

L'action du CGRP chez d'autres mammifères, tels le chien ou l'homme, demeure peu connue. Notre étude a pour but de clarifier le rôle du CGRP chez le chien conscient en explorant l'effet de son antagoniste, le CGRP8-37, 1) sur la motricité gastro-intestinale, interdigestive et post-prandiale et 2) sur le système vasculaire. Nous avons émis deux hypothèses: d'abord, le CGRP a un effet moteur digestif tout comme vasculaire puis, ces deux actions pourraient être médiées par des récepteurs différents.

Notre étude a été effectuée chez des chiennes éveillées de races croisées. On a d'abord estimé l'activité motrice interdigestive par l'enregistrement manométrique de la motricité gastro-duodénale et par la quantification de la motiline plasmatique à l'aide d'un essai radioimmunologique. Puis, nous avons évalué la vidange gastrique d'un repas solide par le dosage de l'acétaminophène plasmatique ingérée lors du repas via une méthode spectrophotométrique. Finalement, nous avons mesuré les paramètres hémodynamiques, c'est-à-dire la fréquence cardiaque et la tension artérielle, à l'aide d'un sphygmomanomètre brachial automatique.

En ce qui concerne l'effet digestif, le CGRP1-37 et le CGRP8-37 n'ont pas modifié la durée du complexe moteur migrant ni la relâche ou l'action motrice de la motiline plasmatique. Le CGRP1-37 a, par ailleurs, diminué la vidange gastrique, et cet effet était bloqué par l'antagoniste, le CGRP8-37. Quant à l'effet vasculaire, le CGRP1-37 a diminué la tension artérielle et augmenté la fréquence cardiaque, mais ces effets n'étaient pas bloqués par l'antagoniste, le CGRP8-37.

En conclusion, chez le chien, le CGRP ne change pas la motricité interdigestive. Par contre, le CGRP peut influencer la motricité post-prandiale

en retardant la vidange gastrique d'un repas via une action modulée par le récepteur de sous-type I, le CGRP8-37 étant spécifique pour ce sous-type. Les effets hémodynamiques du CGRP ne sont pas bloqués par le CGRP8-37 ce qui nous amène à penser qu'ils sont médiés par le récepteur de sous-type II. Le développement d'outils pharmacologiques spécifiques pour chacun des sous-types de récepteurs du CGRP sont d'une importance cruciale pour focaliser sur une activité biologique désirée. Ainsi, ces outils seront utiles pour développer des applications cliniques pour des pathologies où le CGRP pourrait jouer un rôle tel qu'une gastroparésie postopératoire et les problèmes d'hyperalgésie viscérale.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiv
DÉDICACE.....	xv
INTRODUCTION.....	16
CHAPITRE I: CGRP1-37	17
I.1 Biologie moléculaire.....	18
I.2 Structure.....	21
I.3 Localisation (distribution tissulaire).....	24
I.3a système nerveux.....	24
I.3b système cardio-vasculaire.....	26
I.3c système digestif.....	28
I.4 Récepteurs.....	30
I.4a pharmacologie.....	31
I.4b caractérisation moléculaire.....	36
I.4c transduction.....	38

I.5 Antagoniste du CGRP1-37: CGRP8-37.....	40
I.5a structure.....	40
I.5b propriétés antagonistes.....	41
CHAPITRE II: ACTIVITÉ BIOLOGIQUE (CGRP1-37 ET 8-37).....	44
II.1 Système cardio-vasculaire.....	46
II.2 Système digestif.....	49
II.2a effets sur la sécrétion.....	50
II.2b effets sur la motricité.....	52
CHAPITRE III: MOTRICITÉ.....	57
III.1 Profils de motricité digestive.....	57
III.1a motricité interdigestive.....	57
III.1b motricité digestive.....	59
III.2 Motiline.....	60
CHAPITRE IV: PROJET D'ÉTUDE.....	63
IV.1 But.....	65
IV.2 Modèle animal.....	65
IV.3 Hypothèses.....	67
ARTICLE.....	68
DISCUSSION.....	97
BIBLIOGRAPHIE.....	106

LISTE DES TABLEAUX

- TABLEAU I:** Distribution des sites de liaison du ^{125}I -CGRP-I et ^{125}I -CGRP-II dans le système nerveux central, le coeur et la rate chez l'humain.
(Henke *et al.*; *Brain Res.* 410: 404-408, 1987).....26
- TABLEAU II:** Caractéristiques pharmacologiques des sous-types de récepteurs du CGRP.
(Van Rossum *et al.*; *Neurosci. Biobehav. R.* 21(5): 649-678, 1997).....33
- TABLEAU III:** EC_{50} des effets du CGRP et les K_D des deux sous-types de récepteurs
 EC_{50} =concentration efficace pour atteindre 50% de la réponse maximale
 K_{D1} =constante de dissociation (haute affinité)
 K_{D2} =constante de dissociation (basse affinité).....35
- TABLEAU IV:** Résumé des effets biologiques du CGRP.
 + effet biologique - aucun effet biologique
 (Wimalawansa S. J. *Crit. Rev. Neurobiol.* 11(2&3): 167-239, 1997).....45

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1:** Épissage alternatif du gène humain calcitonine/ α -CGRP.
(Wimalawansa S. J.; *Crit. Rev. Neurobiol.* 11(2&3): 167-239, 1997).....20
- FIGURE 2:** Structure primaire du CGRP comparée entre neuf espèces.
(Wimalawansa S. J.; *Crit. Rev. Neurobiol.* 11(2&3): 167-239, 1997).....22
- FIGURE 3:** Structures secondaire et tertiaire du hCGRP (A) et du hCGRP8-37 (B) par résonance magnétique nucléaire et modélisation moléculaire.
(Boulanger *et al.*; *Peptide Res.* 8(4): 206-213, 1995).....23
- FIGURE 4:** Distribution des récepteurs du CGRP dans les systèmes (A) nerveux et (B) cardio-vasculaire chez l'humain.
(Wimalawansa S. J.; *Crit. Rev. Neurobiol.* 11(2&3): 167-239, 1997).....23
- FIGURE 5:** Sous-muqueuse d'iléon de cobaye démontrant l'innervation riche en CGRP dans les vaisseaux sanguins (BV), les fibres nerveuses et les cellules ganglionnaires (flèches) dans le plexus sous-muqueux.
(Sternini C.; *Ann. NY Acad. Sci.* 657:170-186, 1992a).....29
- FIGURE 6:**Modèle structural proposé pour le récepteur canin RDC1/CGRP-I.
(Wimalawansa S. J.; *Crit. Rev. Neurobiol.* 11(2&3): 167-239, 1997).....31
- FIGURE 7:** Le rôle de RAMP1 et CRLR pour la formation du récepteur du CGRP.
(McLatchie *et al.*; *Nature* 393:333-339, 1998).....38

FIGURE 8: Trois CMM débutant dans l'estomac et le duodénum et migrant dans l'iléon terminal pendant un enregistrement de six heures chez un chien à jeûn. Les boîtes foncées correspondent à une phase III.

(Code et Marlett; *J. Physiol.* 246: 289-309, 1975).....59

FIGURE 9: Changement sur huit heures de l'activité contractile dans l'antré gastrique et l'intestin grêle chez le chien conscient.

(Itoh Z. Hormones, peptides, opiods and protaglandins in normal gastric contractions. Dans *Gastric and Gastroduodenal Motility*. Édité par Akkermans, Johnson et Read, Praeger: 41-59, 1984).....60

FIGURE 10: Variations de la motiline plasmatique pendant la période interdigestive chez un chien. Les phases III sont indiquées par les carrés vides dans la moitié supérieure de la figure.

(Poitras P. Motilin. Dans *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*. Édité par Walsh J. H. et Dockray G. J. New York, Raven Press: 261-304, 1994)..61

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	acides aminés
Ach	acétylcholine
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	acide ribonucléique messenger
CCK-8	octapeptide de la cholécystokinine
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CGRP-I (α CGRP)	calcitonin gene-related peptide sous-type 1
CGRP-II (β CGRP)	calcitonin gene-related peptide sous-type 2
CMM	complexe moteur migrant
CRLR	calcitonin receptor-like receptor
CT	calcitonine
[Cys(ACM ^{2,7})]hCGRP	[acétamidométhyl-cystéine ^{2,7}]hCGRP
EC ₅₀	concentration efficace pour atteindre 50% de la réponse maximale
fmol/ml	femtomole par millilitre
g	grammes
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
hCGRP	calcitonin gene-related peptide humain
hres	heures
ic	intracisternale
icv	intracérébroventriculaire
IP ₃	inositol triphosphate
it	intrathécale
iv	intraveineuse

KCl	chlorure de potassium
K_D	affinité apparente = constante de dissociation
K_{D1}	constante de dissociation (haute affinité)
K_{D2}	constante de dissociation (basse affinité)
kDa	kiloDaltons
kg	kilogrammes
K_i	constante d'inhibition
$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hre}$	microgramme par kilogramme par heure
mg	milligrammes
min	minutes
NEP	endopeptidase neutre
nM	nanomolaire
NO	oxyde nitrique
p	page
pA_2	constante d'affinité
pM	picomolaire
$\text{pmol}/\text{kg}/\text{hre}$	picomoles par kilogramme par heure
pmol/L	picomoles par litre
RAMP	receptor activity modifying protein
r-CGRP	calcitonin gene-related peptide de rat
RDC1	putative dog CGRP-I receptor
RIA	radioimmunoessai
SP	substance P
TRH	thyrotropin-releasing hormone
TTX	térodotoxine
VIP	peptide vasoactif intestinal

REMERCIEMENTS

Toute ma gratitude au Dr Pierre Poitras, mon directeur de maîtrise, pour l'intérêt manifesté à ma formation scientifique, ainsi qu'aux Drs Victor Plourde et Serge St-Pierre, en co-direction, pour leur soutien tout au long de mon projet.

Un merci particulier à Mme Louise Trudel et M. Richard Mongeau pour leur aide technique et pour leurs précieux conseils.

Je remercie tout le personnel du Centre de recherche du CHUM (Hôpital St-Luc) pour les facilités techniques et administratives qui m'ont permis d'effectuer mes études.

Je souligne enfin la Fédération canadienne des femmes diplômées des universités pour son soutien financier.

À tous les gens qui croient en moi.

INTRODUCTION

CHAPITRE I: CGRP1-37

Les premiers indices de l'existence du calcitonin gene-related peptide (CGRP) sont arrivés en 1981. À cette époque, il était connu que dans certains cas d'hyperplasie des cellules C de la thyroïde, les niveaux de calcitonine (CT) passent d'un état élevé à bas. En analysant la biosynthèse de la CT dans les tumeurs, Rosenfeld *et al.* (1981), à l'aide d'une sonde d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) spécifique au messenger de la CT, détectèrent la présence de transcrits de tailles plus grandes. Ils en ont alors conclu que la chute de production de CT par les cellules C est associée à l'expression altérée du gène de la CT. Plus tard, soit en 1982, le même groupe (Rosenfeld *et al.*) a démontré que les nouveaux transcrits produisent une protéine d'environ 16 kDa (kiloDaltons) à laquelle ils ont donné le nom de CGRP. Ils ont ensuite démontré que les acides ribonucléiques messagers (ARNm) de la CT et du CGRP sont les produits d'un même gène, qu'ils dérivent d'un transcrit primaire commun et que le point de divergence entre les deux correspond à une jonction d'épissage (Amara *et al.*; 1982). Il fut ensuite démontré que l'expression de l'ARNm du CGRP est spécifique au tissu neural (Amara *et al.*; 1982), dans les systèmes nerveux central et périphérique (Rosenfeld *et al.*; 1983). Enfin,

en 1984, Morris *et al.* sont parvenus à isoler et à caractériser la forme humaine du CGRP.

Le CGRP est un des premiers exemples de peptide biologiquement actif identifié par une approche relevant de la biologie moléculaire et en l'absence d'information concernant les effets biologiques. Ce fut aussi la première démonstration de l'épissage alternatif d'un gène selon le tissu. Ce premier chapitre présente la molécule d'intérêt, le CGRP, selon les divisions suivantes: biologie moléculaire, structure, localisation, récepteurs et l'antagoniste du CGRP: le CGRP8-37.

I.1 Biologie moléculaire

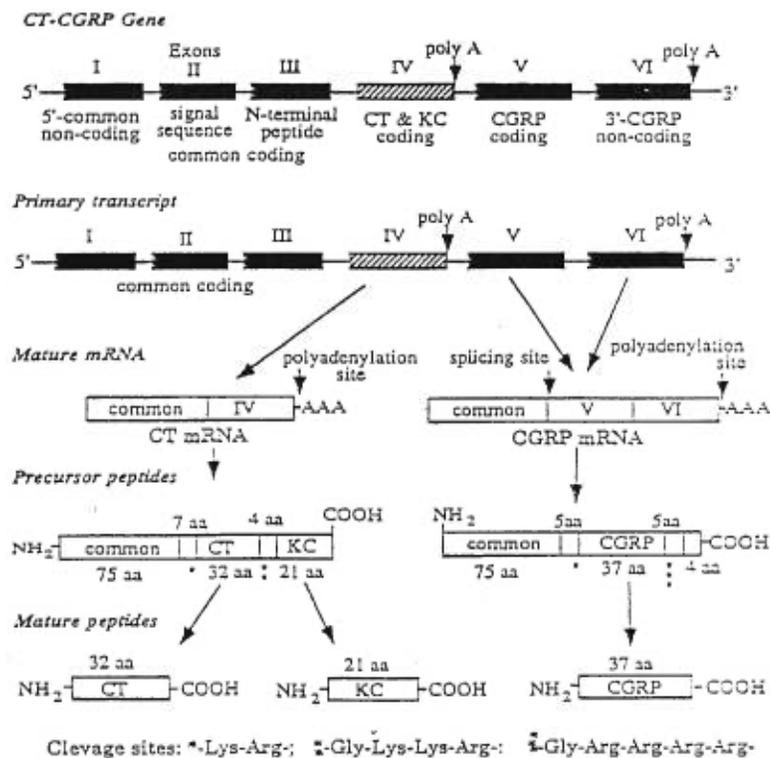
Il existe deux formes moléculaires du CGRP: le CGRP-I (α CGRP) et le CGRP-II (β CGRP). Tous deux sont des peptides de 37 acides aminés (AA) qui, chez l'humain, ne diffèrent que par 3 AA. Les deux formes de CGRP sont produites par deux gènes spécifiques, soit les gènes calcitonine/ α -CGRP et β -CGRP pour les formes I et II du CGRP, respectivement. Ces deux gènes sont situés sur le chromosome 11.

Le gène calcitonine/ α -CGRP est composé de six exons avec un site de polyadénylation aux exons 4 et 6. Un transcrit primaire, recopiant toutes

les portions du gène, c'est-à-dire exons et introns, est d'abord produit. Celui-ci subit ensuite une maturation menant à l'élimination des introns (épissage) et à la formation de l'un ou l'autre des messagers: calcitonine ou CGRP. Si les exons 1-2-3-4 sont associés, il y a formation de la calcitonine. Par contre, l'association des exons 1-2-3-5-6 donne naissance au CGRP (figure 1; p.20). L'épissage alternatif est donc un mécanisme utilisé par les cellules eukaryotes pour permettre de diversifier les produits géniques. Suite à une maturation post-traductionnelle, trois peptides matures sont obtenus: la calcitonine, la katacalcine et le CGRP. Alors que la calcitonine est essentiellement synthétisée par les cellules C de la thyroïde, la synthèse du CGRP-I s'effectue principalement dans les neurones du système nerveux central et périphérique. La katacalcine est cosécétrée avec la calcitonine par les cellules C de la thyroïde (Iltner *et al.*; 1985). Ces deux peptides ont des propriétés hypocalcémiantes.

La sélection d'un épissage entre la calcitonine et le CGRP dépend probablement de facteurs propres à certains tissus. Par exemple, il a été démontré que deux polypeptides cérébraux (extraits de cerveaux de rats) se lient au site accepteur d'épissage spécifique à la calcitonine, empêchant l'inclusion de l'exon 4 dans le transcrit mature (régulation trans) (Roesser *et al.*, 1993). De plus, la séquence du transcrit primaire semble importante dans

ce processus (régulation cis). En effet, il a été montré que la formation d'une tige-boucle thermodynamiquement stable dans l'exon 4 est nécessaire pour un épissage adéquat. Deux rôles hypothétiques sont proposés pour cette structure, soit assurer une orientation optimale des signaux d'épissage pour une reconnaissance adéquate par la machinerie effectuant l'épissage et/ou réduire la distance entre les sites d'épissage pour accomplir le bon épissage (Coleman et Roesser; 1998).



A schematic representation of the structural organization of the human α -CT/CGRP gene. Two different mRNAs may be produced from the alternative processing of the single primary transcript and use of two polyadenylation sites—one coding for the CT precursor and the other for the CGRP precursor. Posttranslational modifications include intramolecular disulfide bridge formation at the N-terminus and amidation of the C-terminal residue. (CT = calcitonin, KC = katecalcitonin, CGRP = calcitonin gene-related peptide).

FIGURE 1: Épissage alternatif du gène humain calcitonine/ α -CGRP.
(Wimalawansa S. J.; *Crit. Rev. Neurobiol.* 11(2&3): 167-239, 1997)

I.2 Structure

Comme mentionné précédemment, le CGRP est un peptide de 37 AA où, chez l'humain, le CGRP-I et le CGRP-II se différencient par trois AA aux positions 3, 22 et 25. La structure primaire du CGRP a été conservée au cours de l'évolution et ce, chez différentes espèces tel qu'illustré par la figure 2 (p.22).

Les structures secondaire et tertiaire du CGRP humain (hCGRP) sont présentées à la figure 3A (p.23). Elles se distinguent par un pont disulfure entre les cystéines en positions 2 et 7 et une hélice- α amphiphilique impliquant les résidus 8 à 18. Des études conformationnelles rapportées par Van Rossum *et al.* (1997) indiquent la présence possible de deux coudes β (résidus 17-21 et 29-34) et d'un segment en hélice irrégulière (résidus 23-29). Suite à une caractérisation structurale de divers fragments du hCGRP-I dont, entre autres, le CGRP8-37 (figure 3B; p.23), Mimeault *et al.* (1993) proposent que les résidus 1-7 et le pont disulfure jouent un rôle dans la stabilisation de l'hélice- α . De plus, la position sept du pont disulfure permet au CGRP d'adopter une conformation et une topographie spécifiques cruciales pour sa liaison avec le récepteur, d'activer ce dernier, et subséquemment, de produire un effet biologique (Saha *et al.* ; 1998). Il est à

souligner que les AA 9 à 37 sont importants pour une reconnaissance appropriée du récepteur (Dennis *et al.*; 1989).

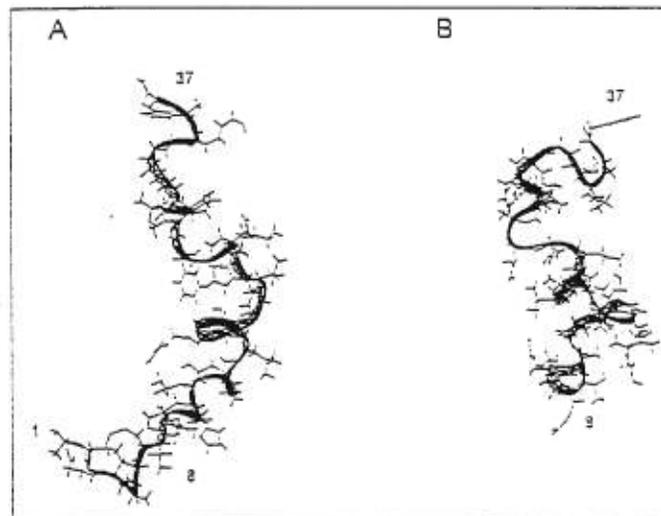
Amino acid sequences of nine calcitonin gene-related peptides (CGRP)

AA No	Human CGRP- α	Human CGRP- β	Rat CGRP- α	Rat CGRP- β	Porcine CGRP	Chicken CGRP	Frog CGRP	Rabbit CGRP	Bovine CGRP
1	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	-	-	Gly	Ser
2	Cys	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Asp	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn
4	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Ala	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Cys	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Val	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-
10	His	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Arg	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Leu	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Ala	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Gly	-	-	-	-	Asp	Asp	-	-
15	Leu	-	-	-	-	Phe	Phe	-	-
16	Leu	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Arg	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Gly	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Gly	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Val	Met	-	-	-	-	Met	Met	-
23	Val	-	-	-	-	Gly	Ala	-	-
24	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Asn	Ser	Asp	Asp	Ser	-	-	Ser	Ser
26	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Phe	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Val	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Pro	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Asn	-	-	-	Asp	-	-	-	-
32	Val	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Gly	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Lys	-	Glu	-	Glu	-	-	Glu	Glu
36	Ala	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Phe	-	-	-	-	-	-	-	-

Primary amino acid sequence comparisons of nine calcitonin gene-related peptides (CGRP) showing remarkable conservation of the amino acid residues throughout the species studied.

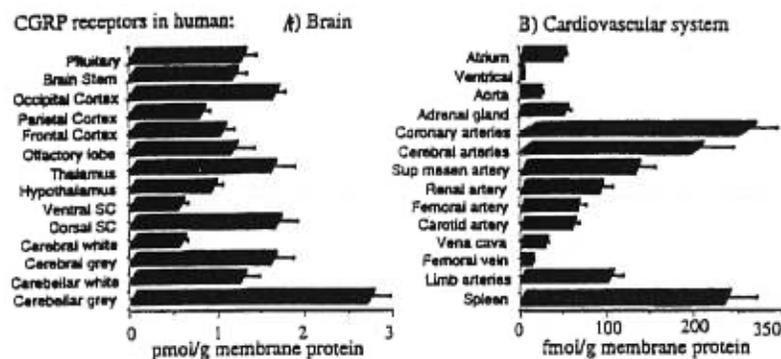
FIGURE 2: Structure primaire du CGRP comparée entre neuf espèces.

(Wimalawansa S. J.; *Cri. Rev. Neurobiol.* 11(2&3): 167-239, 1997)



Lowest energy structures of (A) hCGRP and (B) hCGRP 8-37 following molecular modelling by simulated annealing and energy minimization calculations using NOE constraints from NMR.

FIGURE 3: Structures secondaire et tertiaire du hCGRP (A) et du hCGRP8-37 (B) par résonance magnétique nucléaire et modélisation moléculaire. (Boulanger Y. *et al.*; *Peptide Res.* 8(4):206-213, 1995)



Distribution of CGRP receptors in (A) nervous system and (B) cardiovascular system in humans.

FIGURE 4: Distribution des récepteurs du CGRP dans les systèmes (A) nerveux et (B) cardio-vasculaire chez l'humain. (Wimalawansa S. J.; *Crit. Rev. Neurobiol.* 11 (2&3): 167-239, 1997)

I.3 Localisation (distribution tissulaire)

Le CGRP et ses récepteurs spécifiques sont omniprésents dans l'organisme; ils abondent particulièrement dans les systèmes nerveux et cardio-vasculaire. Il est à noter que la distribution tissulaire des récepteurs du CGRP coïncide généralement avec celle du CGRP lui-même. Cette section abordera la localisation du CGRP dans les systèmes nerveux, cardio-vasculaire et digestif.

I.3a système nerveux

D'abord, rappelons que le CGRP est un neuropeptide synthétisé de façon prédominante dans le système nerveux. Il est un neurotransmetteur ayant, entre autres, une action importante au niveau des afférences, notamment au niveau du système nerveux entérique. D'ailleurs, Grider (1994) a clairement démontré son rôle sensoriel en ce qui concerne le réflexe péristaltique intestinal. En réponse à la distension intestinale ou à l'activation des récepteurs muqueux sérotoninergiques, le CGRP est sécrété des afférences entériques pour enclencher la réponse efférente motrice impliquant la contraction intestinale d'amont (via l'acétylcholine (Ach) et les neurokinines) et la relaxation segmentaire d'aval (via le peptide vasoactif intestinal (VIP) et l'oxyde nitrique (NO)).

Chez plusieurs espèces, la localisation du CGRP a été mise en évidence par des méthodes immunologiques et pharmacologiques. La plus grande densité de récepteurs du CGRP se retrouve dans le cervelet et la corne dorsale de la moëlle épinière (figure 4A; p.23). Selon une étude comparant la distribution des récepteurs entre cinq espèces animales, la plus grande densité a été observée dans le cerveau de porc suivi par le rat, l'humain, le mouton et le bovin (Wimalawansa et El-Kholy; 1993a). Il s'avère que le CGRP est abondant dans les terminaisons nerveuses des nerfs sensitifs et présent, en quantité moindre toutefois, au niveau des nerfs moteurs ainsi qu'au niveau du système nerveux autonome. De plus, en utilisant une méthode de traçage rétrograde, on démontre que plusieurs voies nerveuses manifestent une immunoréactivité pour des fibres riches en CGRP. C'est le cas, par exemple, des fibres situées entre le noyau thalamique ventromédian et le cortex insulaire ou entre l'hypothalamus et l'aire septale latérale. Le CGRP est fréquemment colocalisé avec d'autres neuropeptides, dont la substance P (SP). En immunohistochimie, par double marquage, il a été démontré que le CGRP et la SP coexistent dans les neurones sensitifs cutanés, vasculaires ou viscéraux (Gibbins *et al.*; 1985). Aussi, il est intéressant de noter qu'Henke *et al.* (1987), en comparant la distribution du CGRP-I et II chez l'humain, ont observé les deux formes du peptide dans le système nerveux central, le coeur ou la rate (tableau I; p.26).

Au niveau du système nerveux central, ils ont trouvé des différences significatives entre les deux formes du peptide à deux endroits seulement, à savoir le colliculus inférieur et le cervelet. Bref, le CGRP est présent en abondance dans le système nerveux, avec certaines variations quantitatives selon la région étudiée (pour des revues: Van Rossum *et al.*; 1997 et Ishida-Yamamoto et Tohyama; 1989).

Regional distribution of ¹²⁵I-CGRP-I and ¹²⁵I-CGRP-II binding sites in the human central nervous system, heart and spleen

Values are the means \pm S.E.M. of 2-3 experiments. Each point was determined in duplicate. The binding was measured with 50 pM ¹²⁵I-CGRP-I and -II in membranes obtained from 1-13 mg of wet tissue.

Region	Specific binding (fmol/mg wet tissue)	
	¹²⁵ I-CGRP-I	¹²⁵ I-CGRP-II
Cerebral cortex (area 4)	0.18 \pm 0.12	0.20 \pm 0.13
Caudate nucleus	0.43 \pm 0.38	0.49 \pm 0.35
Hippocampus	0.31 \pm 0.09	0.20 \pm 0.08
Thalamus	0.32 \pm 0.14	0.15 \pm 0.10
Hypothalamus	0.31 \pm 0.10	0.37 \pm 0.09
Superior colliculus	0.30 \pm 0.07	0.19 \pm 0.06
Inferior colliculus	0.80 \pm 0.10*	0.51 \pm 0.14*
Cerebellum	2.01 \pm 0.30*	1.35 \pm 0.28*
Spinal cord,		
thoraco-lumbar	1.21 \pm 0.20	1.42 \pm 0.45
Spinal cord,		
thoraco-ventral	1.09 \pm 0.18	1.31 \pm 0.31
Spinal ganglia	<0.10	<0.10
Heart atrium	0.18 \pm 0.04	0.12 \pm 0.06
Heart ventricle	<0.10	<0.10
Spleen	0.23 \pm 0.09	0.22 \pm 0.07

*P < 0.05.

TABLEAU I: Distribution des sites de liaison du ¹²⁵I-CGRP-I et ¹²⁵I-CGRP-II dans le système nerveux central, le coeur et la rate chez l'humain. (Henke *et al.*; *Brain Res.* 410: 404-408, 1987)

I.3b système cardio-vasculaire

Le CGRP et ses récepteurs sont largement distribués dans le système cardio-vasculaire, où la plus importante densité de récepteurs est retrouvée dans les artères coronaires et la rate (figure 4B; p.23). Le CGRP se trouve en abondance dans les nerfs périvasculaires, où ces fibres nerveuses sensorielles ont leurs corps cellulaires, principalement dans les ganglions

spinaux et le ganglion trijumeau. D'ailleurs, il a été suggéré que le CGRP présent dans la circulation sanguine n'a pas d'origine endocrine, mais dériverait plutôt des terminaisons nerveuses périvasculaires (Zaidi M. *et al.*; 1985). Dans le plasma humain, on estime que le CGRP est présent à une concentration variant entre 0.4 et 100 pmol/L (picomoles par litre), selon la technique de dosage utilisée. Wimalawansa (1991) a montré que la concentration moyenne plasmatique chez l'homme alimenté trois fois par jour est de 7.3 ± 0.28 pmol/L, alors qu'à jeûn cette valeur est significativement réduite (environ 6.5 pmol/L). Sa demi-vie est de huit à neuf min (minutes) et sa durée d'action est de 20 min (Cohen *et al.*; 1992). Il est à souligner que la sécrétion de CGRP suit un rythme nyctéméral, où la concentration maximale est atteinte durant la nuit (Trasforini *et al.*; 1991). Les formes α et β du CGRP sont, semble-t-il, présentes en quantités approximativement égales dans le plasma humain (Wimalawansa *et al.*; 1989).

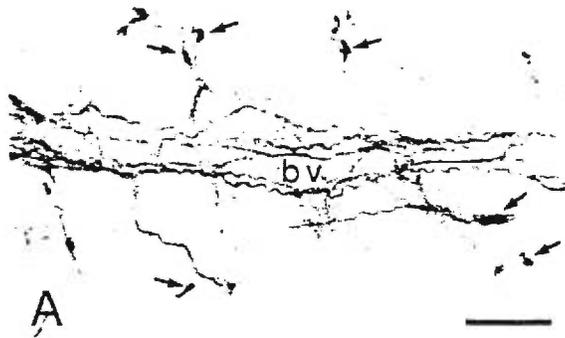
La majorité des études concernant la distribution du CGRP dans le système cardio-vasculaire ont été effectuées chez le rat et le cobaye (pour une revue: Bell et Mcdermott; 1996). Les fibres nerveuses contenant du CGRP, toutes formes confondues du peptide, semblent davantage associées aux artères qu'aux veines. Dans les vaisseaux sanguins, des varicosités et des fibres immunoréactives au CGRP ont été observées à la jonction de

l'adventice et de la média et passent dans la couche musculaire. Au niveau du coeur, le CGRP est présent dans les oreillettes (davantage que dans les ventricules), dans les noeuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire, ainsi que dans le système de conduction. Le CGRP coexiste avec la SP dans les fibres innervant le coeur, entre autres. Donc, le CGRP est omniprésent dans le système cardio-vasculaire.

1.3c système digestif

Le CGRP est distribué dans toutes les régions du système digestif où il innerve tant les organes de ce système que leur vascularisation. Par exemple, la figure 5 (p.29) met en évidence une coupe d'iléon de cobaye où le CGRP est détecté dans le plexus nerveux sous-muqueux et dans les vaisseaux sanguins. Il existe des différences de distribution tissulaire selon l'organe étudié, l'espèce et aussi entre les formes moléculaires du CGRP (α et β). Pour le système digestif, les sources neuronales de CGRP sont intrinsèques (entériques) et extrinsèques (afférences sensibles). Les fibres nerveuses extrinsèques afférentes et intrinsèques entériques expriment préférentiellement le CGRP-I et le CGRP-II, respectivement (Mulderry *et al.*; 1988). Gates *et al.* (1989) ont montré la présence de sites de liaison au hCGRP-I dans le tractus gastro-intestinal chez le chien. Le CGRP est

colocalisé avec la SP dans les fibres extrinsèques afférentes (Sternini C.; 1991).



Whole-mount preparation of guinea pig ileum submucosa, showing the rich CGRP innervation of blood vessels (bv) and CGRP-immunoreactive fibers and ganglion cells (arrows) in the submucous plexus.

FIGURE 5: Sous-muqueuse d'iléon de cobaye démontrant l'innervation riche en CGRP dans les vaisseaux sanguins (BV), les fibres nerveuses et les cellules ganglionnaires (flèches) dans le plexus sous-muqueux.

(Sternini C.; *Ann. NY Acad. Sci.* 657: 170-186, 1992a)

Par immunohistochimie, chez le chien, Sternini *et al.* (1992b) ont résumé la densité d'innervation par le CGRP de la façon suivante: intestin >> pancréas = vésicule biliaire ≥ antre > cardia > corps gastrique = oesophage distal. Voyons plus en détail la contribution de chacune des régions du système gastro-intestinal quant au contenu en CGRP. Dans l'oesophage et l'estomac, le CGRP est confiné aux fibres nerveuses ayant une source extrinsèque, alors que pour le petit et le gros intestins le CGRP a une origine mixte (fibres extrinsèques et intrinsèques). Les fibres afférentes d'origine extrinsèque innervent, généralement parlant, les vaisseaux sanguins, les muqueuses, les muscles lisses et les plexus nerveux

entériques. Les fibres intrinsèques forment la composante sensorielle du système nerveux entérique, impliqué, entre autres, dans le réflexe péristaltique tel que discuté précédemment à la p.24. L'intestin humain (principalement dans l'épithélium des cryptes de la partie proximale de l'intestin grêle; Timmermans *et al.*; 1992) et le pancréas de rat (cellules D des îlots de Langerhans; Holzer P.; 1994) sont les seuls endroits où on a pu identifier des cellules endocrines exprimant le CGRP.

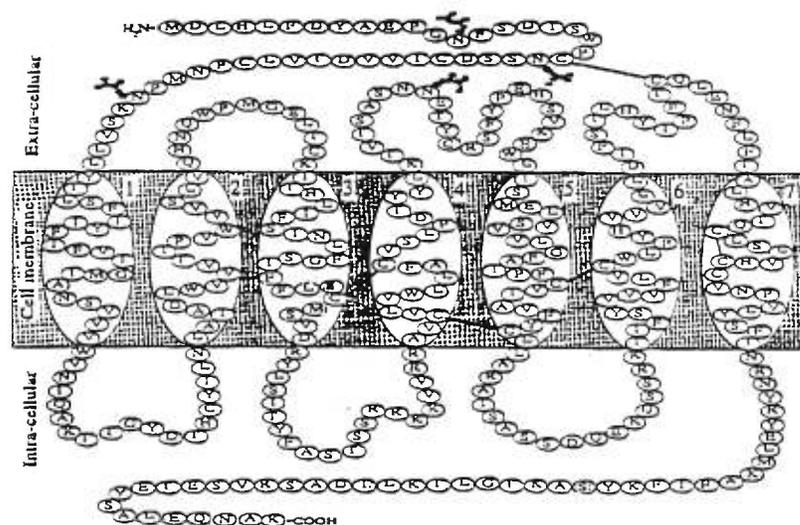
RÉSUMÉ

En conclusion, le CGRP est un peptide ubiquitaire dans l'organisme, mais surtout localisé dans les systèmes nerveux et cardio-vasculaire. Dans le tube gastro-intestinal, les CGRP-I et -II sont majoritairement exprimés dans les neurones extrinsèques afférents et le système nerveux entérique, respectivement. La quasi omniprésence de ce neuropeptide laisse entrevoir son importance physiologique et ce, pour différents aspects. Le chapitre II développera certains rôles spécifiques au CGRP.

1.4 Récepteurs

L'identification moléculaire d'un récepteur spécifique au CGRP s'est avérée assez difficile. À la lumière des études récentes à ce sujet, le récepteur du CGRP serait un récepteur à sept passages transmembranaires

couplé aux protéines G, traduisant surtout les signaux extracellulaires via l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), possédant des sites de glycosylation et associé à une protéine membranaire appelée RAMP (receptor activity modifying protein). De plus, il est probable que plusieurs sous-types de récepteurs existent. La figure 6 (p.31) présente un aperçu de la structure que pourrait adopter le récepteur du CGRP.



Proposed structural model for the canine RDC1/CGRP-1 receptor. N-terminal domain is located extracellularly and contains 3 potential N-linked glycosylation sites (shown as branched chains). Positive disulfide bridges are indicated with lines. Amino acids segments forming each of 7 putative membrane-spanning helices are indicated in ellipses within the membrane (shaded area).

FIGURE 6:Modèle structural proposé pour le récepteur canin RDC1/CGRP-I.

(Wimalawansa S. J.; *Crit. Rev. Neurobiol.* 11 (2&3): 167-239, 1997)

I.4a pharmacologie

Une grande partie des travaux portant sur la pharmacologie des récepteurs du CGRP a été accomplie par le groupe du Dr Quirion à l'Université McGill de Montréal. Celui-ci divise les récepteurs du CGRP en sous-types I et II, tel que nous les classons depuis le début de cet ouvrage.

Cette division est basée sur le fait que le fragment C-terminal tronqué du CGRP-I, le CGRP8-37 (la dernière section de ce chapitre lui est consacrée) est un antagoniste démontrant une haute affinité pour le récepteur de sous-type I, alors que l'agoniste linéaire [Cys(ACM^{2,7})]hCGRP ([acétaminodométhyl-cystéine^{2,7}]hCGRP) se lie préférentiellement au récepteur de sous-type II. Même si ceci est un modèle de travail valable, il faut évidemment être critique à l'effet que le CGRP8-37 et le [Cys (ACM^{2,7})]hCGRP sont relativement spécifiques pour leur sous-type de récepteur respectif, mais certes pas exclusifs. Pour illustrer cet énoncé, à titre d'exemple, notons que le CGRP8-37 est un antagoniste puissant [pA_2 (constante d'affinité) jusqu'à 7.8 dans les oreillettes de rat ou de cobaye] pour le récepteur CGRP-I, de même qu'il est un antagoniste faible [pA_2 6.0 (parfois inactif); dans le canal déférent de rat ou de cobaye] pour le récepteur CGRP-II (Quirion *et al.*; 1992).

En référence à ce qui vient d'être énoncé, il est important de souligner que le CGRP-I et le CGRP-II s'apparient aux récepteurs de sous-type I et II, respectivement. Les deux sous-types de récepteurs décrits ci-dessus sont exprimés différemment dans plusieurs tissus de l'organisme. On peut très certainement s'attendre à ce que des travaux futurs mèneront à la découverte d'autres sous-types de récepteurs homologues. D'ailleurs,

Dennis *et al.* (1991) avaient proposé l'existence d'un troisième sous-type, identifié dans le noyau accumbens, qui ne partage pas les propriétés pharmacologiques des deux autres sous-types.

Comme spécifié précédemment, tout au long du présent document, nous avons opté pour la classification de Quirion *et al.*. Par conséquent, les informations pharmacologiques élaborées dans cette section font référence à sa plus récente revue sur le CGRP (Van Rossum *et al.*; 1997). Par ailleurs, le tableau II (p.33) résume les caractéristiques pharmacologiques des trois sous-types de récepteurs du CGRP (le troisième est moins bien détaillé).

PHARMACOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PUTATIVE CGRP AND RELATED PEPTIDES RECEPTOR SUBTYPES

	CGRP ₁	CGRP ₂	Atypical
Relatively selective agonists	none	[Cys ³⁵ ACM ¹⁻²⁷]hCGRP _α	hCGRP _α >CT amylin
Relatively selective antagonists	hCGRP ₁₋₂₇ (pA ₂ 7.5-8.5) hCGRP ₉₋₂₇	hCGRP ₁₋₃₇ (pA ₂ 5.5-6.2)	none
Prototypical assays	atrium, spleen mesenteric artery SK-N-MC cells analgesia (in vivo)	rat deferens liver, kidney urinary bladder colonic epithelium (HCA-7) hyperthermia (in vivo) (?) (see Note added in proof)	nucleus accumbens
Receptor cDNA	362 amino acids 41 kD 7 putative transmembrane domains K _D 9 × 10 ⁻⁸ M EC ₅₀ 3 × 10 ⁻⁸ M		(?)

NOTE ADDED IN PROOF

Following the acceptance of the present manuscript, we became aware of a report on the cloning of a novel protein that interacts with CGRP (Luecke, A.E., Dahl, G.P., Ross, B.A., Dickerson, I.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press). This small (146 amino acids), largely hydrophilic protein is believed to be either a CGRP receptor or a component of a CGRP receptor complex. This novel protein does not belong to the typical seven transmembrane domain G protein-coupled receptor superfamily, as it possesses a single transmembrane domain and a very short intracellular C-tail. Further biochemical and pharmacological characterization is required in order to relate this novel protein to the previously defined CGRP receptor subtypes.

TABLEAU II: Caractéristiques pharmacologiques des sous-types de récepteurs du CGRP.

(Van Rossum *et al.*; *Neurosci. Biobehav. R.* 21 (5): 649-678, 1997)

D'abord, précisons que l'affinité apparente ou constante de dissociation (K_D) pour les sous-types de récepteurs du CGRP varie considérablement selon le tissu (responsable majeur de l'amplitude) et

l'espèce (tableau III; p.35). Les études de liaison du CGRP à ses sous-types de récepteurs montrent deux états d'affinité, à savoir une haute (K_{D1}) et une basse (K_{D2}) affinité. L'explication de ces deux états d'affinité n'est pas connue à l'heure actuelle. Les effets biologiques du CGRP sont dépendants de sa concentration, tel qu'illustré par la différence des EC_{50} (concentration efficace pour atteindre 50% de la réponse maximale) pour obtenir une réponse chronotrope versus inotrope dans l'oreillette droite de cobaye (tableau III: p.35). La liaison de CGRP radiomarqué est réversible et saturable et dépend du temps et de la température (Zaidi et al.; 1990). Enfin, à concentration élevée, le CGRP peut se lier au récepteur de la calcitonine par un processus de réaction croisée.

En référence aux travaux de Chatterjee *et al.* (1991), le récepteur du CGRP peut subir un processus de désensibilisation homologue. L'incubation de cellules exprimant le récepteur du CGRP dans un milieu contenant du CGRP atténue la réponse cellulaire lors d'un deuxième contact avec le peptide. Ce processus de désensibilisation est dû à une perte de réponse maximale (efficacité) et à une diminution des sites de liaison. De plus, Foulkes *et al.* (1991) ont montré qu'une exposition prolongée d'anneaux d'artères coronaires de petits diamètres au CGRP8-37 provoquait une désensibilisation au CGRP-I s'expliquant par une perte de puissance.

Espèce	Tissu	Sous-type de récepteur du CGRP	K _D	EC ₅₀	Référence
Rat	Cerveau	?	K _{D1} =3.7±0.9x10 ⁻¹⁰ M K _{D2} =3.2±0.8x10 ⁻⁸ M		Van Rossum et al.; 1994
Rat	Système nerveux central	?	K _{D1} =3.2±2.3x10 ⁻¹⁰ M K _{D2} =1.7±0.5x10 ⁻⁸ M		Dennis et al.; 1990
Rat	Rate	?	K _{D1} =1.4±0.6x10 ⁻⁹ M K _{D2} =8.1±1.0x10 ⁻⁸ M		Dennis et al.; 1990
Rat	Canal déférent	II		1.5±0.1x10 ⁻⁹ M	Boulanger et al.; 1996
Rat	Canal déférent	II		1.20±0.07x10 ⁻⁹ M	Dennis et al.; 1990
Rat	Canal déférent	II		1.4±0.3x10 ⁻⁹ M	Mimeault et al.; 1992
Cobaye	Oreillettes	I	K _{D1} =4.0±0.4x10 ⁻¹⁰ M K _{D2} =5.6±1.8x10 ⁻⁸ M		Van Rossum et al.; 1994
Cobaye	Oreillettes	I	K _{D1} =8.0±3.0x10 ⁻¹¹ M K _{D2} =1.5±1.0x10 ⁻⁸ M		Dennis et al.; 1990
Cobaye	Oreillette droite	I		7.56±1.32x10 ⁻⁹ M	Dennis et al.; 1990
Cobaye	Oreillette droite	I		7.9±0.2x10 ⁻⁹ M (réponse inotrope) 19±2x10 ⁻⁹ M (réponse chronotrope)	Mimeault et al.; 1992
Cobaye	Oreillette gauche	I		14.7±1.77x10 ⁻⁹ M	Dennis et al.; 1990
Cobaye	Oreillette gauche	I		8.7±1.0x10 ⁻⁹ M (réponse inotrope) 10.4±0.7x10 ⁻⁹ M	Mimeault et al.; 1992
Cobaye	Oreillette gauche	I	K _{D1} =2.5±0.6x10 ⁻¹⁰ M K _{D2} =9.4±4.0x10 ⁻⁹ M		Boulanger et al.; 1996
Cobaye	Canal déférent	II	K _{D1} =2.6±1.2x10 ⁻¹⁰ M K _{D2} =1.7±0.7x10 ⁻⁸ M		Van Rossum et al.; 1994
Cobaye	Canal déférent	II		3.83±0.48x10 ⁻⁹ M	Dennis et al.; 1990
Cobaye	Iléon	?			Dennis et al.; 1990

TABLEAU III: EC_{50} des effets du CGRP et les K_D des deux sous-types de récepteurs.

EC_{50} =concentration efficace pour atteindre 50% de la réponse maximale

K_{D1} =constante de dissociation (haute affinité)

K_{D2} =constante de dissociation (basse affinité)

I.4b caractérisation moléculaire

La caractérisation moléculaire d'un récepteur spécifique au CGRP a été, jusqu'à présent, très controversée. Les premières études sur ce sujet portaient sur l'identification et la caractérisation d'un récepteur du CGRP provenant de différents tissus. Par exemple, Foord et Craig (1987) rapportaient la purification partielle d'un récepteur de 62-68 kDa (par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyle sulfate de sodium), à partir de placentae humains, liant préférentiellement le CGRP-II. Aussi, Wimalawansa *et al.* (1993b) ont isolé, à partir de membranes neurales de porcs, un récepteur de CGRP de 66 kDa (par chromatographie sur gel perméable).

Le développement des techniques de clonage moléculaire a permis d'identifier des séquences d'ADN qui s'apparentent à des récepteurs à sept passages transmembranaires et l'absence de ligands connus pour certains de ces récepteurs permet de les qualifier de récepteurs orphelins. Kapas et

Clark (1995) ont accolé l'étiquette de récepteur de CGRP à l'un de ces récepteurs orphelins appelé RDC1 (putative dog CGRP-I receptor). Lorsqu'exprimé dans des cellules COS-7, RDC1 présente la pharmacologie d'un récepteur de CGRP de sous-type I. Par contre, lorsque RDC1 est exprimé dans des cellules endothéliales vasculaires lisses, la perte complète de l'ARNm du récepteur dans ces cellules, induite par l'angiotensine II ou à l'aide d'oligonucléotides anti-sens, n'affecte pas l'élévation d'AMPc provoquée par le CGRP. Ceci suggère que RDC1 n'est pas un récepteur spécifique au CGRP (Hall et Smith; 1998). Un autre récepteur orphelin a été proposé par Aiyar *et al.* (1996) comme récepteur de CGRP. Cette protéine, appelée CRLR (calcitonin receptor-like receptor), lorsqu'exprimée de façon hétérologue dans les cellules HEK293, a la capacité de faire augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc suite à une stimulation par le CGRP. Cependant, cette caractéristique n'est pas observée dans les cellules COS-7. L'existence d'un co-facteur, présent dans les cellules HEK293, mais absent des cellules COS-7, a donc été postulée (Hall et Smith; 1998). Récemment, l'équipe du Dr Foord (Glaxo-Wellcome, Royaume-Uni) a cloné une protéine à un seul passage transmembranaire de 148 AA abrégée RAMP1 (McLatchie *et al.*; 1998). RAMP1, seule, n'est pas un récepteur de CGRP. Toutefois, en s'associant avec CRLR, elle rend le récepteur de CGRP fonctionnel. Le rôle de RAMP1 serait d'effectuer le transport de CRLR vers la membrane

plasmique et de le présenter à la surface cellulaire sous sa forme mature (glycosylée), lui permettant ainsi d'agir comme récepteur de CGRP. La figure 7 (p.38) schématise cette hypothèse. Ce récepteur de CGRP, RAMP1 plus CRLR, présente des caractéristiques pharmacologiques qui s'apparentent au CGRP-1. Il est de plus intéressant de noter que l'ARNm de RAMP1 est retrouvé dans plusieurs tissus, dont le système gastro-intestinal.

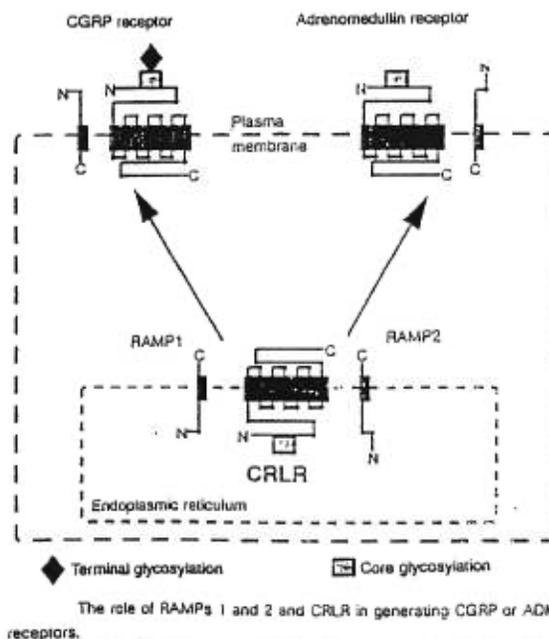


FIGURE 7: Le rôle de RAMP1 et CRLR pour la formation du récepteur du CGRP.

(McLatchie *et al.*; *Nature* 393:333-339, 1998)

I.4c transduction

Il n'y a aucun doute que les récepteurs de CGRP sont en mesure d'activer l'adénylate cyclase et de produire l'AMPc comme second messager. Par exemple, il a été décrit que le CGRP pouvait induire l'activation de

l'adénylate cyclase et/ou une augmentation en AMPc intracellulaire dans plusieurs préparations tissulaires, comme les cellules endothéliales de rat, les muscles lisses de vaisseaux bovins (Hirata *et al.*; 1988), les muscles lisses longitudinaux et circulaires d'iléon de cobaye (Rekik *et al.*; 1997) ou les muqueuses fundiques d'estomac canin (Chiba *et al.*; 1989).

Le CGRP peut induire une vasorelaxation dépendante ou indépendante de l'endothélium, selon le type de lit vasculaire. Holzer *et al.* (1995) ont proposé que les seconds messagers AMPc et GMPc (guanosine monophosphate cyclique) seraient impliqués dans l'action dilatatrice du CGRP (indépendant et dépendant de l'endothélium, respectivement) où l'NO agirait comme intermédiaire vasorelaxant du CGRP dans la microcirculation gastrique, mais non pas cutanée. Aussi, l'étude de Quayle *et al.* (1994) suggère que le CGRP agirait sur les canaux K_{ATP}^+ dans les cellules musculaires lisses artérielles (lapin). Le CGRP aurait une action indirecte sur ces canaux, c'est-à-dire via une élévation de l'AMPc qui, grâce à la protéine kinase A, activerait les canaux K_{ATP}^+ . Également, une population de récepteurs de CGRP couplés au second messenger inositol triphosphate (IP_3) a été détectée dans le muscle squelettique (Laufer et Changeux; 1989). Le mécanisme physiologique demeure incertain, mais le CGRP semblerait agir

indirectement en induisant une augmentation d'AMPc qui, à son tour, stimulerait la formation d'IP₃ en activant la phospholipase C.

RÉSUMÉ

Bref, le rôle précis de l'AMPc dans les effets relaxants du CGRP demeure obscur. Une chose est certaine: le CGRP peut activer plusieurs voies de signalisation intracellulaires. Peut-être cela reflète-t-il l'existence de plusieurs sous-types de récepteurs capables d'interconnexions?

1.5 Antagoniste du CGRP1-37: CGRP8-37

Nous insistons ici sur le CGRP8-37, puisqu'il a un rôle central dans l'établissement des paradigmes de travail de notre étude.

1.5a structure

Le CGRP8-37 est un peptide de synthèse ayant la même structure primaire que le peptide original (CGRP1-37) à l'exception des sept premiers AA qui sont absents. La portion N-terminale n'est pas essentielle pour l'interaction du CGRP avec son récepteur, ce qui explique que le segment 8-37 peut effectuer un contact spécifique avec celui-ci. La portion C-terminale du segment hCGRP8-37 semble être critique pour l'activité antagoniste du récepteur de sous-type I (Boulangier *et al.*; 1996). Mimeault *et al.* ont

démonstré que les résidus 9-12 N-terminaux sont les plus importants pour stabiliser l'hélice- α amphiphilique et assurer l'affinité du hCGRP8-37 pour son récepteur (1991 et 1992). Par contre, des travaux récents de Rist *et al.* (1998) ont montré que des fragments contenant certains des 10 résidus C-terminaux du CGRP se comportent comme des antagonistes de haute affinité pour le récepteur de sous-type I du CGRP.

I.5b propriétés antagonistes

Rappelons qu'en référence à la classification du Dr Quirion, le CGRP8-37 est un antagoniste puissant pour le récepteur de sous-type I, mais non pas exclusivement pour ce sous-type. En effet, il présente une affinité très faible, parfois nulle, pour le sous-type II. Il a été démontré que le hCGRP8-37 a une grande affinité pour le site de liaison du [125 I]-hCGRP-I [K_i (constante d'inhibition) inférieur à 1 nM] (Quirion *et al.*; 1992). À l'heure actuelle, le CGRP8-37 représente l'outil pharmacologique de référence pour caractériser les rôles physiologiques du CGRP, spécialement ceux qui sont médiés via l'activation des récepteurs de sous-type I. Récemment, une série d'antagonistes CGRP-I non-peptidiques ont été développés par une société pharmaceutique (R. Quirion, communication personnelle).

Le CGRP8-37 a des propriétés antagonistes puissantes et compétitives envers l'action du hCGRP-I dans des préparations auriculaires et iléales de cobaye ainsi que dans le système nerveux central médiant la satiété alimentaire (Dennis *et al.*; 1990). Par conséquent, le CGRP8-37 a la capacité d'antagoniser certaines actions induites par le hCGRP-I *in vitro*. Il est à noter que le prochain chapitre abordera les activités biologiques du CGRP et de son antagoniste, le CGRP8-37.

RÉSUMÉ

En conclusion, le chapitre I a mis l'emphase sur les faits suivants: le CGRP est un peptide de 37 AA, obtenu par épissage alternatif, ubiquitaire (particulièrement localisé au niveau des vaisseaux et des nerfs), ayant deux sous-types de récepteurs (où les CGRP-I et II s'associent aux récepteurs de sous-type I et II, respectivement) et dont le CGRP8-37 est un antagoniste spécifique pour le récepteur de sous-type I. Le développement de nouveaux outils pharmacologiques (agonistes et antagonistes) pour chacun des sous-types de récepteurs du CGRP permet une meilleure compréhension de l'hétérogénéité des récepteurs de CGRP. De plus, le développement des recherches concernant le clonage de récepteurs présentant les caractéristiques pharmacologiques d'un des sous-types documentés par

Quirion *et al.* devrait nous permettre de confirmer les résultats recueillis jusqu'à maintenant.

CHAPITRE II: ACTIVITÉ BIOLOGIQUE (CGRP1-37 ET 8-37)

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que le CGRP est un peptide ubiquitaire, ce qui laisse entrevoir qu'il pourrait jouer plusieurs rôles physiologiques. Le tableau IV (p.45) résume ses effets biologiques connus. L'activation des récepteurs du CGRP induit habituellement une vasodilatation et/ou une relaxation musculaire, mais ses effets chez le chien (espèce utilisée dans notre étude) et sur la motricité gastro-duodénale sont encore peu caractérisés. La majorité des études ont été effectuées chez le rat et ses effets hémodynamiques sont les mieux documentés dans la littérature scientifique.

L'activité biologique du CGRP via ses divers sous-types de récepteurs reste à être définie précisément. Cependant, il semble y avoir une tendance des données accumulées jusqu'à maintenant à confirmer que les effets cardio-vasculaires du CGRP sont médiés par le récepteur de sous-type I, mais dépendamment du lit vasculaire et de l'espèce. En ce qui concerne les effets du CGRP sur l'inhibition de la sécrétion d'acide gastrique et la relaxation des muscles lisses intestinaux, ceux-ci seraient majoritairement effectués par l'intermédiaire du récepteur de sous-type I, mais la variabilité entre les espèces est très importante.

Spécifions que, pour le présent chapitre, nous avons choisi de nous attarder uniquement sur l'activité biologique du CGRP et de son antagoniste, le CGRP8-37, dans les systèmes cardio-vasculaire et digestif, car l'étude que nous avons accomplie concerne uniquement ces systèmes. Mentionnons que le CGRP a, généralement parlant, un effet biologique inhibiteur, alors que son antagoniste peut bloquer cet effet. Peu d'études relatent l'utilisation du CGRP8-37 *in vivo*; probablement parce qu'une dose pharmacologique cent à mille fois supérieure à celle de son agoniste est habituellement utilisée pour bloquer l'effet du CGRP1-37, ce qui représente une quantité prohibitive d'un peptide de synthèse de coût élevé.

Summary of Biological Effects of CGRP

Biological effect	CGRP
Vasodilatation	++++
Chronotropic	++
Inotropic	++
Inhibit bone resorption	+
Stimulate bone formation	-
Calcium-lowering effect	-
Growth factor-like effect	+
Neural regeneration	++
Thermoregulation	+
Inflammation	++
Gastric mucosal protection	++
Effects on β cells	+
Skeletal muscle	+
Glucose metabolism	+
Anorectic effect	+
Analgesic effect	-

TABLEAU IV: Résumé des effets biologiques du CGRP.

+ effet biologique - aucun effet biologique

(Wimalawansa S. J.; *Crit. Rev. Neurobiol.* 11 (2&3): 167-239, 1997)

Avant de débiter la section concernant l'hémodynamie, rappelons que, chez l'homme, la demi-vie du CGRP *in vivo* est de huit à neuf min (Cohen *et al.*; 1992). Le catabolisme du CGRP-I, qui abolit son activité biologique, semble médié par l'endopeptidase neutre (NEP), une peptidase liée à la membrane cellulaire (Le Grèves *et al.*, 1989; Katayama *et al.*, 1991). Quatre sites possibles de clivage du CGRP-I ont été identifiés. La NEP clive également la SP, mais comparativement au CGRP-I, elle le fait 88 fois plus rapidement. Sachant que le CGRP est souvent colocalisé avec la SP, il a donc été suggéré que le CGRP compétitionne avec la SP pour son hydrolyse enzymatique. Ceci engendrerait une augmentation et une prolongation de l'action de la SP. Le ou les sites où se produit la dégradation du CGRP ne sont pas connus avec exactitude, mais il semblerait que ce soit là où la NEP et le CGRP sont colocalisés. Cependant, puisque la NEP clive le CGRP lentement, il se pourrait que d'autres enzymes protéolytiques modulent également l'action du CGRP.

II.1 Système cardio-vasculaire

Le CGRP est abondamment distribué dans le système cardio-vasculaire. L'activation des récepteurs du CGRP induit une vasodilatation et des effets chronotropes et inotropes positifs qui sont très bien définis chez le rat, mais qui demeurent obscurs chez d'autres mammifères, tels le chien et

l'homme (pour une revue voir Bell et McDermott; 1996). Il a même été avancé que le CGRP serait le plus puissant vasodilatateur jusqu'alors connu.

L'infusion intraveineuse (iv) de CGRP engendre une diminution de la pression artérielle moyenne et de la résistance vasculaire systémique, en plus d'augmenter la fréquence et le débit cardiaques chez le rat (Lappe *et al.*; 1987) et le chien (Wang *et al.*; 1989) conscients. Chez l'homme, l'administration iv de CGRP engendre une tachycardie et une baisse des pressions artérielles, tant systolique que diastolique (Gennari et Fischer; 1985). Franco-Cereceda *et al.* (1987) ont également trouvé une action inotrope positive sur le coeur humain. De plus, chez l'homme, l'injection intradermale de CGRP induit un érythème qui persiste pendant plusieurs heures (Brain *et al.*; 1986). Aussi, le CGRP (iv) cause une redistribution du flux sanguin vers le cerveau et la peau, aux dépens du tube gastro-intestinal, chez des sujets normaux (Jäger *et al.*; 1990).

Avec des préparations de tissus humains, il a été démontré que le CGRP cause une relaxation des artères cérébrales (Jansen *et al.*; 1992), des artères mésentériques (Miyachi T. *et al.*; 1996) et des petites artères des muscles squelettiques (Franco-Cereceda *et al.*; 1987). Dans cette dernière étude, les auteurs ont également démontré que le CGRP induisait des effets

inotropes positifs dans des morceaux de l'oreillette droite humaine. Les résultats de Marshall *et al.* (1986) ont relaté des effets chronotropes positifs pour les organes isolés suivants: coeur et oreillette droite de rat ainsi qu'oreillette droite de cobaye. De plus, le CGRP semble être un facteur hypertrophique pour les cardiomyocytes de rat en culture (Ito *et al.*; 1997). Effectivement, lors d'une incubation de 48 heures avec 100pM ou 1nM de CGRP, la surface cellulaire des cardiomyocytes a pratiquement doublée. Ils ont également observé, par buvardage de type *Northern*, une augmentation de l'expression des ARNm de deux marqueurs génétiques de l'hypertrophie cardiaque, à savoir l' α -actine squelettique et le peptide natriurétique de l'oreillette.

Il a été rapporté que le CGRP-I causait des changements hémodynamiques plus importants que le CGRP-II chez le rat (Gardiner *et al.*; 1989) et le chien (Nakamura *et al.*; 1996) conscients. L'étude de Gardiner *et al.* (1991), chez le rat conscient, suggère que les effets hémodynamiques carotidiens produits par le hCGRP-I sont majoritairement dus à l'activation du récepteur de sous-type I, puisque le CGRP8-37 a complètement aboli la tachycardie ainsi que l'hypotension causées par le hCGRP-I exogène. *In vitro*, le CGRP8-37 est également capable d'atténuer la vasodilatation induite, dans ce cas-ci, par le CGRP dans un lit vasculaire mésentérique

isolé et perfusé de rat (Han *et al.*; 1990). Ces résultats démontrent que le récepteur de sous-type I du CGRP, pour certaines espèces, est impliqué dans la physiologie cardio-vasculaire.

RÉSUMÉ

Bref, le CGRP a une action tant vasculaire (vasodilatation) que cardiaque (effets chronotropes et inotropes positifs) et ce, tant *in vivo* que *in vitro*. Il semblerait que, chez le rat, le récepteur de sous-type I du CGRP médierait les effets cardio-vasculaires du CGRP. Le développement de nouveaux outils pharmacologiques aideront à cerner l'implication du CGRP au niveau de différents lits vasculaires et ce, chez différentes espèces.

II.2 Système digestif

Le rôle physiologique du CGRP au niveau du système gastro-intestinal est très peu documenté et la majorité des études ont été effectuées chez le rat. Cependant, il est connu que le CGRP inhibe la sécrétion d'acide gastrique. La motricité gastro-intestinale est un domaine où tout est à définir quant à l'implication éventuelle du CGRP. Il est connu que le CGRP a un effet tant au niveau des muscles que des nerfs. L'action du CGRP sur la motricité digestive a été étudiée presque exclusivement chez le rat. Chez ce rongeur, l'administration centrale ou périphérique du CGRP inhibe l'activité

motrice digestive, tandis que l'administration simultanée du CGRP et d'un antagoniste de ce dernier bloque cet effet inhibiteur.

II.2a effets sur la sécrétion

L'administration de CGRP-I dans le liquide cébrospinal (ventricule cérébral latéral ou grande citerne) ou iv engendre une inhibition de la sécrétion d'acide gastrique chez le rat éveillé, avec une ligature du pylore (Lenz *et al.* et Taché *et al.*; 1984 et 1984a). L'effet inhibiteur a été confirmé chez le rat anesthésié, où l'injection périphérique de CGRP-I inhibe la sécrétion d'acide stimulée de façon exogène par la pentagastrine, l'histamine, le bethanecol ou l'activation vagale induite par le TRH (thyrotropin-releasing hormone) injectée par voie intracisternale (ic) (Taché *et al.*; 1984b). Chez le chien éveillé, l'injection intracérébroventriculaire (icv) de hCGRP diminue significativement la sécrétion d'acide gastrique stimulée par la pentagastrine (Lenz *et al.*; 1986) ou un repas (Lenz et Brown; 1987). Toujours chez le chien, l'administration iv d'h- ou de r-(rat) CGRP-I a inhibé de 60 à 75% les effets sécrétoires d'un repas, d'un repas simulé ou de la bombésine, mais la sécrétion induite par l'histamine ou le bethanecol n'a pas été modifiée, ni la sécrétion basale d'acide gastrique (Pappas *et al.*; 1986). Chez l'homme, l'injection systémique de r-CGRP a provoqué une diminution de la sécrétion d'acide stimulée sous-maximalement par la pentagastrine

(Kraenzlin *et al.*; 1985). Chez l'homme (Beglinger *et al.*; 1988) ou chez le lapin anesthésié (Bauerfeind *et al.*; 1989), la sécrétion d'acide gastrique stimulée par la pentagastrine (mais non pas la sécrétion basale) a été inhibée par le hCGRP-II (iv), tandis que le hCGRP-I (iv) n'a pas eu d'effet chez l'homme et a même augmenté la sécrétion d'acide stimulée par la pentagastrine chez le lapin anesthésié. Ces résultats suggèrent que le CGRP-II serait plus efficace que le CGRP-I à déployer une activité biologique dans différents systèmes.

Quant aux mécanismes relatifs à l'inhibition d'acide gastrique par le CGRP, il a été proposé que le CGRP induirait une relâche de somatostatine par l'estomac et, très certainement, d'autres facteurs pourraient être impliqués, comme une inhibition de la transmission cholinergique dans le système nerveux entérique (voir la revue suivante: Taché Y.; 1992).

Il est intéressant de noter que Lawson *et al.* (1994) ont démontré chez le chien que l'infusion iv de hCGRP8-37 a augmenté de 100%, comparativement au contrôle salin, la réponse acide à un repas intragastrique suggérant ainsi que le CGRP8-37 bloque l'effet inhibiteur sur la sécrétion d'acide gastrique par le CGRP endogène et que le CGRP joue un rôle clé dans le contrôle de la sécrétion acide basale chez le chien. Donc, le

CGRP8-37 semble être un antagoniste actif des récepteurs du CGRP au niveau de l'estomac canin.

Chez le chien conscient, l'administration iv de hCGRP-I ne modifie pas les sécrétions pancréatiques (bicarbonates et protéines) stimulées par un repas (Pappas *et al.*; 1986), mais il inhibe significativement ces sécrétions lorsque stimulées par la pentagastrine (Helton *et al.*; 1989). Dans cette dernière étude, les auteurs ont obtenu une augmentation de la somatostatine plasmatique en parallèle à l'effet inhibiteur du CGRP, ce qui laisse croire que la somatostatine serait un médiateur potentiel de l'effet inhibiteur du CGRP. L'étude de Reasbeck *et al.* (1988) suggère également que la somatostatine endogène serait impliquée dans l'action inhibitrice du CGRP. En effet, ils ont trouvé que l'administration iv de hCGRP-I, chez le chien conscient, diminuait l'absorption jéjunale, en parallèle à une augmentation concomitante de la libération de somatostatine.

II.2b effets sur la motricité

Le CGRP relaxe le sphincter oesophagien inférieur de façon dose-dépendante chez le chat anesthésié (Parkman *et al.*; 1989) et chez l'opossum (Rattan *et al.*; 1988). Cet effet semble dû à une action à la fois sur

le muscle lisse et sur les nerfs, puisque la relaxation a été partiellement inhibée par la tétrodotoxine (TTX) qui bloque la conduction nerveuse.

Chez le mouton éveillé, l'injection icv de CGRP avant l'ingestion d'un repas a un effet inhibiteur sur la fréquence des contractions gastriques (Bueno *et al.*; 1986). L'administration iv et ic de CGRP-I retarde la vidange gastrique d'une solution non-calorique chez le rat non-anesthésié (Raybould *et al.*; 1988). Par contre, chez le chien, le CGRP (iv) ne module pas la vidange gastrique d'une solution saline (Pappas *et al.*; 1986). Le CGRP8-37 bloque l'inhibition de la vidange gastrique induite par l'injection iv de CGRP-I chez le rat conscient (Plourde *et al.*; 1993a). Donc, le récepteur de sous-type I semble être impliqué dans l'action motrice du CGRP-I sur la vidange gastrique.

Le CGRP inhibe l'activité motrice de la vésicule biliaire. En effet, chez le cobaye anesthésié, le CGRP (iv) relaxe, de façon dose-dépendante, l'activité contractile de la vésicule biliaire stimulée par le CCK-8 (octapeptide de la cholécystokinine) (Hashimoto *et al.*; 1988). Chez le chien éveillé, Lenz *et al.* (1993) ont démontré que le r-CGRP-I (icv) inhibe la contraction de la vésicule biliaire induite par le CCK-8 ou un repas. Les études de tension *in vitro* ont montré que le CGRP inhibe la contraction de la vésicule biliaire

induite par le CCK-8, la SP, l'Ach ou le KCl (chlorure de potassium) (Hashimoto T. *et al.*; 1988) (Kline *et al.*; 1991). Cette dernière étude suggère, à la lumière des résultats obtenus avec le TTX, que le CGRP agirait directement sur le muscle lisse.

Le CGRP est en mesure de relaxer une bandelette stimulée de muscle lisse longitudinal (Barthò *et al.*; 1987) (Sun et Benishin; 1991) ou circulaire (Barthò L.; 1991) (Holzer *et al.*; 1989) d'intestin grêle de cobaye. Le groupe de Rezik *et al.* (1997) a démontré que le hCGRP8-37 renverse la relaxation dose-dépendante induite par le rCGRP-I dans le muscle lisse circulaire d'iléon de cobaye. Ce résultat laisse supposer que la relaxation implique le récepteur de sous-type I du CGRP. Quant au mécanisme expliquant comment le CGRP engendre cette relaxation, les opinions divergent. Il agirait sur les nerfs et/ou les muscles.

Le CGRP cause une relaxation d'une bandelette musculaire lisse du côlon de souris (Cadieux *et al.*; 1990), de cobaye (Maggi *et al.*; 1996) ou de lapin (Mayer *et al.*; 1990). Encore une fois, il n'y a pas consensus à savoir si l'action du CGRP est directe ou non sur le muscle, mais il semble y avoir une certaine tendance à ce que l'action soit directe.

Le CGRP exerce aussi une action inhibitrice sur la partie plus distale du système digestif. Effectivement, Chakder et Rattan (1991) ont rapporté, chez l'opossum, qu'une baisse de la tension musculaire basale du sphincter anal interne pouvait être induite par les CGRP-I et -II, et inhibée de façon dose-dépendante par le hCGRP8-37. En conséquence, ceci suggère que les hCGRP-I et -II agiraient sur le même récepteur à ce niveau.

Nous aimerions terminer en abordant deux études tout à fait intéressantes chez le rat éveillé. Nous insistons sur ces études, car elles sont, au meilleur de notre connaissance, parmi les rares exemples à établir un lien entre l'effet du CGRP et les profils de motricité (interdigestive et postprandiale) ainsi que les transits intestinaux. D'une part, Fargeas *et al.* (1985) ont approfondi les effets de l'administration icv, it (intrathécale) et iv de CGRP sur la motricité intestinale grâce à un enregistrement myoélectrique chez le rat conscient. L'injection icv de CGRP, suite à un repas, permettait de rétablir le profil de motricité interdigestive d'une manière dose-dépendante. L'injection it de CGRP induisait également un profil de motricité de jeûne, mais avec 30 min de délai comparativement à l'administration icv. Par contre, l'administration systémique du peptide à une dose pourtant efficace n'a apporté aucun changement à la motricité intestinale, suggérant ainsi que les effets observés sont médiés centralement. D'autre part, l'étude de Lenz

(1988) a montré que le r-CGRP administré icv inhibe le transit de l'intestin grêle, mais n'affecte pas le transit colique chez le rat normal et non contraint.

RÉSUMÉ

D'une part, pour le système cardio-vasculaire, le CGRP a une action tant vasculaire que cardiaque et ce, tant *in vivo* que *in vitro*. En référence aux études effectuées chez le rat, les effets hémodynamiques du CGRP semblent être médiés par le récepteur de sous-type I du CGRP. D'autre part, pour le système digestif, le CGRP a une action inhibitrice, tant sur la sécrétion que la motricité et ce, encore une fois, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Chez le rat, le récepteur de sous-type I du CGRP semble associé à l'inhibition de la sécrétion gastrique et aux effets moteurs du CGRP, mais tout reste à être défini pour d'autres espèces. Nous aimerions souligner que la majorité des études ont été effectuées *in vitro*.

CHAPITRE III: MOTRICITÉ

Le chapitre III a pour but de clarifier les profils de motricité digestive se produisant en période de jeûne (motricité interdigestive) et après l'ingestion d'un repas (motricité postprandiale). De plus, le laboratoire du Dr Poitras a une expertise reconnue internationalement dans le domaine de la motiline. Il nous apparaissait donc opportun de présenter cette hormone, qui a un rôle régulateur de la motricité et qui, par ailleurs, a fait l'objet d'un des volets de notre étude qui sera détaillée ultérieurement.

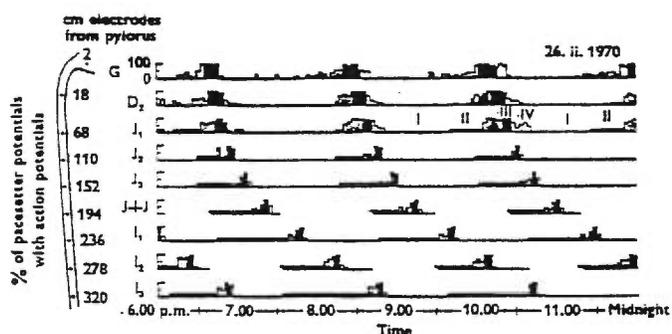
III.1 Profils de motricité digestive

III.1a motricité interdigestive

Il existe deux profils de motricité digestive. L'un d'entre eux, caractérisé par une activité motrice intermittente, mais régulière, ayant lieu pendant une période de jeûne (période interdigestive), est appelé le "complexe moteur migrant" (CMM). Le CMM est composé de trois phases principales: la phase I est caractérisée par son activité motrice quasi quiescente, la phase II se reconnaît par son profil moteur modéré et irrégulier et, finalement, la phase III est particulièrement distincte des autres, par une augmentation soudaine de contractions très puissantes, qui se terminent abruptement. Les phases I et II ont chacune une durée de 20 à 40 min et la

phase III a une période de 5 à 10 min. Par conséquent, la sommation des trois phases donne une durée totale moyenne du CMM de 90 à 120 min.

La figure 8 (p.59) résume les trois phases du CMM observées en conditions de jeûne chez un chien conscient. L'activité myoélectrique digestive est enregistrée sur une période de six heures, au moyen d'électrodes implantées de l'estomac à l'iléon. Si nous portons notre attention sur les boîtes foncées (phase III), nous constatons qu'il y a un déplacement de celles-ci horizontalement, mais aussi verticalement. En effet, l'occurrence du CMM est un phénomène répétitif et ce, à toutes les 90 à 120 min tel que mentionné précédemment, d'où l'observation d'un mouvement horizontal. Quant à la migration verticale (caudale), elle s'explique par le fait que le CMM naît dans l'estomac (et même le sphincter oesophagien inférieur) et le duodénum, migre le long du tube digestif et meurt dans l'iléon terminal (quelquefois le côlon). Lorsqu'un CMM achève sa course dans l'iléon terminal, un autre commence dans l'estomac et le duodénum. Jusqu'à ce qu'il y ait ingestion de nourriture, ces phénomènes récurrents ont lieu. Le CMM a pour rôle de "nettoyer" le tube digestif des déchets (aliments non digestibles, bactéries, enzymes, etc) qui pourraient s'accumuler et ainsi altérer la muqueuse responsable de l'absorption des aliments.



Three interdigestive myo-electric complexes starting in stomach and duodenum and migrating to terminal ileum during a 6-hr recording session made 30-36 hr after onset of fasting in dog 3. As one complex ends in ileum, another starts in stomach and duodenum. The four phases (I to IV) of each complex were recognizable at each recording site, being delineated by the incidence of pacemaker potentials with action potentials and the intensity of the action potential activity of phase III (dark bands).

FIGURE 8: Trois CMM débutant dans l'estomac et le duodénum et migrant dans l'iléon terminal pendant un enregistrement de six heures chez un chien à jeûn. Les boîtes foncées correspondent à une phase III.

(Code et Marlett; *J. Physiol.* 246: 289-309, 1975)

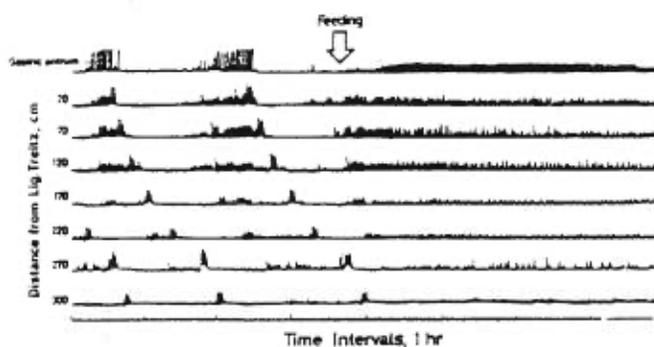
III.1b motricité digestive

Le second profil moteur digestif est observé durant la période postprandiale. Sous ces conditions, un profil moteur caractérisé par une activité motrice modérée et irrégulière est adopté. Celui-ci a une durée de deux à six hres (déterminée par la quantité et la qualité des calories ingérées, entre autres) après la prise d'un repas.

La figure 9 (p.60) illustre la différence entre les deux profils d'activité motrice observée dans le tube digestif, à savoir en période de jeûne et après un repas. On note que, pendant l'enregistrement de huit hres, un repas a été

présenté au chien, approximativement à la mi-temps, ce qui a provoqué une brusque transition, de la motricité interdigestive en motricité postprandiale. Donc, l'ingestion d'un repas détruit le profil moteur régulier et cyclique en un profil désorganisé et aléatoire. Par conséquent, ces profils sont faciles à reconnaître visuellement sur un tracé d'enregistrement myoélectrique ou manométrique.

Il est à souligner que les informations présentées dans cette section sont également valables pour l'homme.



Eight hour changes in contractile activity in the gastric antrum and the small intestine in a conscious dog. Note different contractile pattern in the gastrointestinal tract before and after feeding.

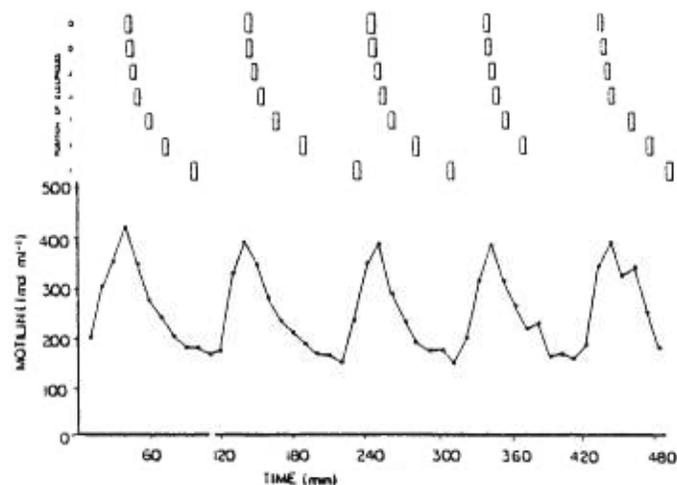
FIGURE 9: Changement sur huit heures de l'activité contractile dans l'antra gastrique et l'intestin grêle chez le chien conscient.

(Itoh Z. Hormones, peptides, opioids and prostaglandins in normal gastric contractions. Dans Gastric and Gastroduodenal Motility. Édité par Akkermans, Johnson et Read, Praeger: 41-59, 1984)

III.2 Motiline

Les contractions intestinales sont contrôlées par le système nerveux ainsi que par des hormones, dont la motiline. Les études du Dr Poitras

suggèrent fortement que la motiline puisse être responsable des mouvements intestinaux observés entre les repas (période interdigestive). En effet, en conditions de jeûne, la motiline est relâchée par les cellules endocrines M de la muqueuse duodéno-jéjunale de façon cyclique où, à l'apogée de sa libération, elle engendre la phase III du CMM. La figure 10 (p.61) évoque la corrélation existant entre une augmentation de la concentration plasmatique de motiline (mesurée par RIA) en synchronisme avec l'initiation d'une phase III du CMM dans l'estomac chez un chien à jeûn. Ce phénomène se répète à toutes les 90 à 120 min, comme pour le CMM.



Plasma motilin variations during an interdigestive period in one dog. Phase IIIs are indicated by the empty squares in the upper half of the figure from Poiras

FIGURE 10: Variations de la motiline plasmatique pendant la période interdigestive chez un chien. Les phases III sont indiquées par les carrés vides dans la moitié supérieure de la figure.

(Poiras P. Motilin. Dans Gut Peptides: Biochemistry and Physiology. Édité par Walsh J. H., Dockray G. J. New York, Raven Press: 261-304, 1994)

La motiline est un peptide de 22 AA qui est présent chez plusieurs espèces animales, dont l'homme. Cependant, la majorité des travaux de recherche sur la motiline ont été effectués chez le chien. La motiline est principalement distribuée au niveau de la muqueuse duodéno-jéjunale. Ses récepteurs sont situés au niveau des cellules musculaires (récepteurs M) ou des fibres nerveuses (récepteurs N) qui touchent les muscles. Les récepteurs M et N semblent correspondre à des sous-types distincts de récepteurs. Une des activités biologiques de la motiline est d'être un stimulus essentiel au contrôle du CMM. Dr Poitras (1988) a proposé que les variations cycliques de la motilinémie seraient régulées par une "horloge" biologique intrinsèque, dont on ignore toujours la nature.

RÉSUMÉ

Le présent chapitre a mis l'emphase sur les profils de motricité digestive observés en période de jeûne et suite à un repas. De plus, la motiline a été abordée brièvement puisque le laboratoire du Dr Poitras a démontré qu'elle était une hormone impliquée dans la régulation de la motricité interdigestive. Les concepts discutés seront utiles pour une meilleure compréhension de notre étude.

CHAPITRE IV: PROJET D'ÉTUDE

Dans le chapitre I, nous avons revu qu'il existait certains agents pharmacologiques associés à la molécule CGRP, dont le fragment C-terminal CGRP8-37. Ce dernier est un antagoniste spécifique pour le récepteur de sous-type I du CGRP, mais présentant une affinité très faible (parfois nulle) pour le récepteur de sous-type II, tel qu'indiqué dans plusieurs travaux, dont ceux du Dr St-Pierre, en association avec le Dr Quirion. Le CGRP8-37, de même que le CGRP1-37 (agoniste), peuvent être synthétisés en quantité suffisante pour en permettre l'étude pharmacologique, dans le laboratoire du Dr St-Pierre.

Au chapitre II, nous avons expliqué que le CGRP avait plusieurs effets biologiques dans les systèmes cardio-vasculaire (effets très bien documentés dans la littérature scientifique) et digestif (effets peu connus, mais il semble y avoir des indications que le CGRP y exerce un effet musculaire inhibiteur).

Au chapitre III, nous avons ouvert une parenthèse à l'effet que le laboratoire du Dr Poitras avait une expertise dans le domaine de la motiline et tout ce qui touche la motricité gastro-intestinale.

Enfin, on doit mentionner que Plourde *et al.* ont démontré, chez le rat, que le CGRP8-37 était capable de bloquer l'action du CGRP endogène. Aussi, il a prouvé que le CGRP8-37 peut renverser l'inhibition de la motricité gastrique générée par une chirurgie abdominale (Plourde *et al.*; 1993b) et qu'il peut corriger l'hypersensibilité viscérale induite par l'administration colique d'acide acétique (Plourde *et al.*; 1997). Ces observations laissent entrevoir la possibilité que le CGRP est impliqué dans des conditions pathologiques, telles la gastroparésie postopératoire et/ou des problèmes nociceptifs comme le syndrome de l'intestin irritable.

L'action du CGRP chez des mammifères autres que le rat, tels le chien ou l'homme, reste très peu caractérisée. Nous avons donc voulu clarifier, au cours de ce projet de recherche, les effets digestifs moteurs et les actions vasculaires du CGRP. Pour ce faire, nous possédions certaines connaissances des effets biologiques du CGRP, nous avons à notre disposition les outils pharmacologiques requis et nous pouvions bénéficier d'une expérience de travail concernant la motricité digestive chez le chien. Nous pouvions aussi entrevoir qu'une meilleure compréhension du CGRP pourrait avoir des applications cliniques.

IV.1 But

Notre étude a eu pour but de vérifier, chez le chien conscient:

→ les effets digestifs moteurs (motricité interdigestive et postprandiale) du CGRP et de son antagoniste, le CGRP8-37 et

→ les effets vasculaires du CGRP et de son antagoniste, le CGRP8-37.

IV.2 Modèle animal

En vu d'atteindre ces objectifs, le modèle animal que nous avons élaboré est décrit brièvement ci-dessous.

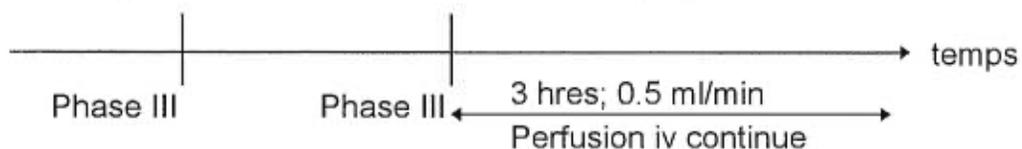
→ Nous avons utilisé des chiennes de races croisées pour l'administration iv de salin, de $\text{h}\alpha\text{CGRP1-37}$ (200pmol/kg/hre) ou de $\text{h}\alpha\text{CGRP8-37}$ (2000pmol/kg/hre), spécifique pour le récepteur de sous-type I du CGRP.

Choix des doses: Le CGRP1-37 a été administré à une dose de 200 pmol/kg/hre (ou 0.757 $\mu\text{g/kg/hre}$ ou 200 000 pM), puisqu'il a été démontré qu'une telle dose permettait d'obtenir un effet maximal sur la sécrétion d'acide gastrique chez le chien (Pappas *et al.*; 1986). Pour l'antagoniste, le CGRP8-37, une dose dix fois supérieure a été utilisée (2000 pmol/kg/hre ou 6.25 $\mu\text{g/kg/hre}$ ou 2 000 000 pM). Sachant que la concentration plasmatique humaine de CGRP est de 0.4 à 100 pM (p.27) (chez l'homme à jeûn: 6.5pM et alimenté: 7.3 pM; p.27) et que l'affinité de l'antagoniste pour le récepteur de sous-type I est très forte (inférieure à 1 nM; p.41), 2000 pmol/kg/hre

s'avère une dose efficace (pharmacologique) pour bloquer l'effet de l'agoniste endogène et administré. Nous aurions pu choisir des doses inférieures pour l'agoniste et l'antagoniste, mais l'étude de Pappas *et al.* (1986) a été notre outil de référence pour le choix de doses. Cette étude est l'une des rares de la littérature scientifique à décrire un effet biologique suite à l'injection du CGRP *in vivo* chez le chien. Nous avons opté pour un mode d'administration systémique (perfusion iv) continue, car la demi-vie du CGRP est courte (8 à 9 min; p.27). Il est à souligner que lorsque nous avons effectué des prélèvements sanguins (de 3ml), nous avons comblé cette perte avec un soluté.

→ **EFFETS DIGESTIFS MOTEURS:**

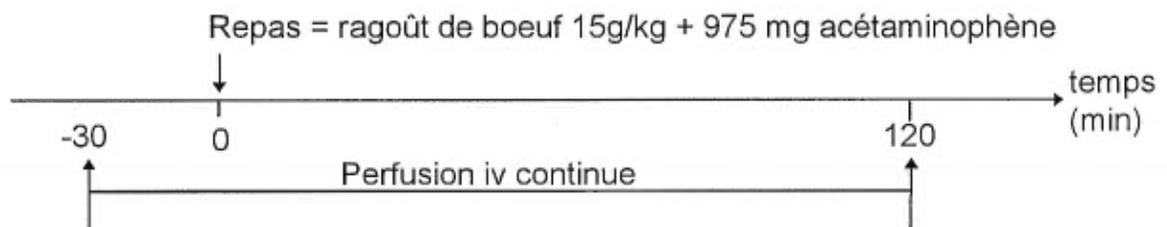
Activité motrice interdigestive: enregistrement manométrique de la motricité gastro-duodénale en permanence et prélèvements sanguins aux 10 min pour fins de quantification de la motiline plasmatique par un RIA



Activité motrice postprandiale: mesure de la vidange gastrique d'un repas solide (15g viande/kg) par la quantification de l'acétaminophène plasmatique (prélèvements sanguins aux 10 min) ingérée (975mg) avec le repas (méthode spectrophotométrique basée sur la formation d'un complexe coloré

suite à des modifications chimiques de l'acétaminophène, dont l'absorbance est traduite en unité de concentration en référence à un contrôle).

- Il est à noter que l'acétaminophène n'est pas absorbée dans l'estomac, mais l'est plutôt dans le duodénum. Par conséquent, la concentration plasmatique d'acétaminophène corrèle avec la vitesse de la vidange gastrique (Clements *et al.*; 1978).
- Nous avons vérifié notre modèle animal en perfusant de l'atropine sulfate (15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hre}$), puisqu'il est connu qu'une telle dose ralentit la vidange gastrique chez le chien (Katori *et al.*; 1996).



→ EFFETS VASCULAIRES:

Mesure des paramètres hémodynamiques (pressions artérielles et fréquence cardiaque) avec un sphygmomanomètre brachial automatique.

IV.3 Hypothèses

Nous avons émis deux hypothèses:

→ le CGRP a un effet moteur digestif tout comme vasculaire et

→ ces deux actions pourraient être médiées par des récepteurs différents.

ARTICLE

PARTICIPATION DE L'ÉTUDIANT À L'ARTICLE

J'ai participé activement à toutes les étapes du projet de recherche décrit dans l'article ci-joint. En effet, j'ai fait la revue de la littérature scientifique, conçu les protocoles expérimentaux, réalisé tous les travaux techniques, analysé les résultats obtenus et rédigé l'article soumis pour fins de publication.



Le 9 avril 1999

Madame Marie-Claude L'Heureux


Objet : Présentation d'un mémoire de maîtrise sous forme d'articles

Madame,

Suite à votre lettre du 18 mars 1999, j'ai le plaisir de vous autoriser à présenter votre mémoire de maîtrise sous forme d'articles.

Je vous invite à consulter le Guide de présentation des mémoires et des thèses (page 16 à 18) où vous trouverez toutes les précisions quant à la procédure de présentation de mémoire.

De plus, lors du dépôt de votre mémoire, vous devrez soumettre une liste dactylographiée de tous les coauteurs des articles inclus dans votre mémoire et vous devez être premier auteur pour un article.

Veuillez agréer, Madame, l'expression de mes sentiments les meilleurs.

Le vice-doyen,


Fernand A. Roberge
Secteur sciences de la santé

FAR/lstl

c.c. : M. Pierre Poitras, Directeur de recherche
Département de physiologie

P.J.

C.P. 6128, succursale Centre-ville
Montréal (Québec) H3C 3J7

Téléphone : (514) 343-5891
(514) 343-6957
(514) 343-6922

Télécopieur (FAX): (514) 343-2252

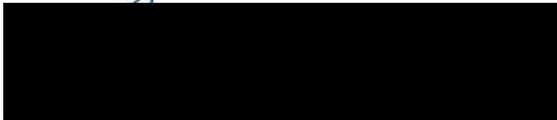
AUTORISATION DE MICROFILMER ET DE DIFFUSER LE
MÉMOIRE DE MAÎTRISE

Permission écrite des coauteurs de l'article intitulé:

**DIGESTIVE MOTOR EFFECTS AND VASCULAR ACTIONS OF CGRP ARE
EXPRESSED BY DIFFERENT RECEPTORS SUBTYPES IN DOG**

soumis à l'*American Journal of Physiology*.

Serge St-Pierre



Louise Trudel



Victor Plourde



Raymond Lepage



Pierre Poitras



The American Physiological Society

June 2, 1999

9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MARYLAND 20814-3991
 TELEPHONE 301-530-7186 FAX 301-571-1814

Dr. PIERRE POITRAS
 CENTRE DE RECHERCHE
 HECUM, SAINT-LUC
 UNIVERSITE DE MONTREAL
 3150, EAST RENE-LEVESQUE BLVD.
 MONTREAL (QUEBEC) H2X 1P1
 CANADA

Dear Dr. Poitras:

The Office of the Executive Editor acknowledges the receipt of your manuscript. The manuscript has been forwarded to the Editor/Associate Editor (see name and address below), who will assign it to referee editors. The paper will be reviewed as promptly as possible and you will be notified by the Editor/Associate Editor of the action taken.

Please address any correspondence regarding the manuscript to the Editor/Associate Editor listed below and refer to the identification number that appears above the title.

Sincerely,

Barbara B. Rauner
 Publications Manager and Executive Editor

Number: G-0205-9 (REGULAR)
 Journal: GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY

Received: 05/28/1999

Title: "DIGESTIVE MOTOR EFFECTS AND VASCULAR ACTIONS OF CGRP ARE EXPRESSED BY DIFFERENT RECEPTORS SUBTYPES IN DOG"

Editor: DR. JOHN H. WALSH
 PROFESSOR OF MEDICINE
 WEST LOS ANGELES VA MEDICAL CENTER
 11301 WILSHIRE BLVD.
 CURE BUILDING 115, ROOM 115
 LOS ANGELES, CA 90073
 310-478-3711X41841 FAX: 310-312-9279

JOURNALS

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: CELL PHYSIOLOGY * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: RENAL PHYSIOLOGY * ADVANCES IN PHYSIOLOGY EDUCATION * AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY (CONSOLIDATED) * JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY * JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY * PHYSIOLOGICAL REVIEWS * NEWS IN PHYSIOLOGICAL SCIENCES (with IUPS) * THE PHYSIOLOGIST * PHYSIOLOGICAL GENOMICS

BOOKS

HANDBOOK OF PHYSIOLOGY * SPECIAL PUBLICATIONS

DIGESTIVE MOTOR EFFECTS AND VASCULAR ACTIONS OF CGRP ARE EXPRESSED
BY DIFFERENT RECEPTORS SUBTYPES IN DOG

L'Heureux Marie-Claude¹, St-Pierre Serge², Trudel Louise¹, Plourde Victor¹, Lepage Raymond¹,
Poitras Pierre¹.

CHUM, Saint-Luc, Université de Montréal¹
and Chemistry Department, Université du Québec à Montréal²

Abbreviated title: Calcitonin Gene-Related Peptide and Gastroduodenal Motility

Address correspondence to:

Pierre Poitras, M.D.
Centre de recherche
CHUM, Saint-Luc
Université de Montréal
264, east René-Lévesque Blvd
Montréal (Québec)
H2X 1P1
Canada

Tel: (514) 281-2444 Ext. 5757

Fax: (514) 281-2492

E-mail: 

ABSTRACT

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a 37 AA peptide localized in blood vessels and nerves of the GI tract. Activation of CGRP receptors (subtypes 1 or 2) usually induces vasodilation and/or muscle relaxation, but its effects in dog and on gastroduodenal motility are still unclear. This study looked for the effect of CGRP and the antagonist CGRP8-37, specific for CGRP type 1 receptor, 1) on GI motility (interdigestive and postprandial), and 2) on hemodynamics, in conscious dogs. During the interdigestive period, the infusion of CGRP1-37 (200pmol/kg/hr) or CGRP8-37 (2000pmol/kg/hr) did not modify the duration of the MMC nor the release nor the motor action of plasma motilin. The gastric emptying of a solid meal (15g meat/kg) was reduced by the administration of CGRP1-37 (AUC: 2196±288.6 vs. 3618±288.4 with saline or T_{1/2}: 78±7.3 vs. 50±4.3 min; p<.01) and this effect was reversed by the antagonist CGRP8-37. CGRP1-37 significantly (p<.01) diminished arterial pressures (118±1.6 / 64±1.4 vs. 125±1.4 / 75±1.2 mmHg with saline) and accelerated the basal cardiac rhythm (110±1.4 vs. 83±1.6 beats/min). However, CGRP8-37 failed to block the cardiovascular effects of CGRP1-37. In dog, CGRP could influence digestive motility by slowing the gastric emptying of a meal through an action on CGRP-1 receptors. Hemodynamic effects of CGRP were not blocked by CGRP8-37 and appear therefore mediated by CGRP-2 receptor subtype.

KEYWORDS

Regulatory Peptides, Gastroduodenal motility, Gastric emptying, Motilin, Migrating Motor Complex.

INTRODUCTION

Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) is a 37 amino acids peptide expressed under two molecular forms. The α form, derived from the alternative splicing of the α -CGRP/calcitonin gene, and the β form, encoded by the β -CGRP gene, differ by 3 amino acids (position 3, 22 and 25) in human. Two CGRP receptor subtypes have now been identified, i.e. subtype 1 or 2. A specific, competitive antagonist has been designed for the CGRP-1 receptor, CGRP8-37.

CGRP is ubiquitous in the organism, and is particularly abundant in blood vessels and in nerves. The activation of CGRP receptors induces a vasodilation as well as chronotropic and inotropic effects that are well defined in the rodent (for a review see ref. 3). In the gastrointestinal tract, α -CGRP is expressed mainly in afferent neurons, while β -CGRP is predominant in the enteric nervous system (16). According to studies mostly performed in rats, CGRP seems to have an inhibitory influence on gastrointestinal functions (10). For example, it has been reported that CGRP could diminish gastric emptying *in vivo* (22) or decrease GI muscle contraction in various *in vitro* preparations. CGRP also inhibited the secretion of gastric acid (24), pancreatic enzymes (15), or duodenal bicarbonate (13). Whether these actions are of physiological relevance remains unknown, but it is likely that CGRP is involved in some pathological conditions such as postoperative gastric ileus or nociceptive problems. Plourde *et al.* indeed demonstrated that blocking the action of endogenous CGRP by the receptor antagonist CGRP8-37 reversed the inhibition in gastric motility observed after abdominal surgery (20) and corrected the visceral hypersensitivity induced by colonic administration of acetic acid in rats (19).

The action of CGRP in other mammals such as dog or man remains still poorly characterized. We therefore wanted to clarify the role of CGRP in conscious dogs by looking at the effect of CGRP and of its antagonist, CGRP8-37, 1) on the gastrointestinal motility, interdigestive as postprandial, and 2) on the vascular system.

METHODS

Experimental Protocol

This study was approved by the Animal Ethical Board of our institution.

Studies on interdigestive motility. Gastroduodenal motility was evaluated with the method previously described in our laboratory (21) but using a slight modification of the recording device in order to monitor manometric instead of myoelectrical intestinal activity. Under general anesthesia, 4 female mongrel dogs (18-28kg) were operated upon to position 4 intraluminal catheters [3 in the antrum (1.5cm apart) and 1 in the descending duodenum]. The 4 manometric catheters were exteriorized to the flank of the animal via a stainless steel cannula. During the recording period, each catheter was linked to a manometric pump (Mui Scientific, Mississauga, Ont.) perfusing pressure transducers connected to a physiograph (R611, Beckman Instruments, Fullerton, Ca).

Experiments were carried out in 4 fasting dogs quietly lying in a Pavlov sling. Basal gastroduodenal motility was recorded during the IV administration (via a front leg vein) of a control saline solution until 2 consecutive migrating motor complexes (MMC) were seen. At the end of the second period of antral phase III activity, a 3 hrs continuous IV perfusion was then

started with human α -CGRP1-37 or synthetic antagonist human α -CGRP8-37 or both peptides given concomitantly at 2 distinct perfusion sites. The occurrence of phase IIIs occurring during each tested solution was noted to calculate MMC duration and to compare it with the MMC duration seen during the control saline period.

From a catheter installed in a rear limb vein and kept open with saline, blood was drawn in chilled EDTA tubes every 10 min throughout the protocol. Plasma samples were conserved at -20°C until plasma motilin was quantified by a radioimmunoassay using the antiserum 7921 as previously described (21).

CGRP1-37 was given at a dose of 200pmol/kg/hr since this dose allowed to obtain a maximal effect on gastric acid secretion (17). For the antagonist CGRP8-37, a dose 10 times superior (2000pmol/kg/hr) was used. Both peptides (synthesized by Dr. S. St-Pierre, Université du Québec à Montréal, Canada) were diluted in a NaCl 0.9% solution containing 0,1% dog plasma.

Studies on postprandial motility. Gastric emptying was evaluated following the ingestion of a solid meal containing acetaminophen as a marker whose duodenal absorption and subsequent plasma increase will be modulated by its gastric evacuation with the meal.

The experiments were performed on 4 conscious fasted dogs (17-22kg) that received, at time 0min, a solid meal composed of canned food (15g/kg; Friskies Alpo beef stew, North York, Ont) to which were mixed 975mg of powdered acetaminophen. The following test solutions were administered IV from time -30min: 1) CGRP1-37 (200pmol/kg/hr) 2) CGRP8-37 (2000pmol/kg/hr) 3) CGRP1-37 plus CGRP8-37 (200 and 2000pmol/kg/hr, respectively given at

2 distinct perfusion sites) 4) atropine sulfate (15 μ g/kg/hr) or 5) saline 0.9% as controls. The test perfusions were continued for 120min after the meal. Throughout the protocol, at 10min intervals, venous blood was withdrawn, via a catheter positioned in a rear leg vein, in sodium heparin tubes maintained at 4°C. Plasma samples were stored at -20°C until acetaminophen assay (Diagnostic Chemicals Ltd, Charlottetown, PE) based on a spectrophotometric method (Roche Mira, Roche Diagnostic Systems, Nutley NJ).

Studies on hemodynamic effects. In parallel to the interdigestive motility studies, the hemodynamic parameters (arterial pressures and cardiac frequency) were measured with an automatic brachial sphygmomanometer positioned on a front leg artery (Critikon; Dinamap model 8300). Lectures were obtained every 15 min during basal conditions and during the tested perfusions.

Data Analysis

Interdigestive period. MMC duration was calculated by measuring the interval between 2 consecutive antral phase IIIs. Correlation between peak increases in plasma motilin and the occurrence of antral phase III was also verified by visual inspection of the records.

Postprandial period. Plasma acetaminophen concentrations were expressed as a percentage of the maximal concentration detected in each animal during the saline control period. The data were analyzed in two different ways: 1) by measuring the area under the curve (AUC) for the time analysis window from 0 to 90 min or 2) by calculating the T $\frac{1}{2}$ which represents the time (min) taken to reach 50% of the maximum acetaminophen concentration in plasma.

Vascular studies. Blood pressures (systolic and diastolic) and heart rate obtained during saline control conditions were compared to those obtained during each peptide infusion.

Data were expressed as means \pm SEM and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by comparisons with control conditions using the Dunnett test.

RESULTS

Digestive motor effects of CGRP1-37 and CGRP8-37

Interdigestive motility. Throughout the 3 hrs administration of CGRP1-37 or CGRP8-37, the mean MMC duration times were 118 ± 15.3 min (n=14) or 84 ± 6.6 min (n=17) respectively, compared to 91 ± 3.2 min (n=55) under basal saline conditions (NS) (fig.1). During the perfusion of CGRP1-37 or CGRP8-37, cyclic variations of plasma motilin were always phase locked with the antral phase IIIs, as in normal control situation (data not shown).

Although no statistical difference was found, CGRP1-37 seemed to have a distinct influence on 2 populations of dogs: in 2 animals, MMCs and plasma motilin cycles always occurred normally, while in the other 2, no MMC and no peak increase in plasma motilin were detected during the 3 hrs infusion of CGRP1-37. As shown on fig. 2, the results were highly reproducible in each animal, and we found no reason to explain the 2 populations responses that seemed in complete opposition, i.e. no influence at all vs. total abolition of plasma motilin peaks and of antral phase IIIs by CGRP1-37.

Postprandial motility. As shown on fig.3, plasma acetaminophen reached a maximum concentration after ≈ 90 min during basal conditions, and, as expected, its plasma increase was profoundly delayed during the administration of atropine. According to the AUC analysis (fig.4), when compared to saline (3618 ± 288.4), atropine (982 ± 240.4) and CGRP1-37 (2196 ± 288.6) both delayed ($p < 0.01$) the gastric emptying that was unaffected ($p > 0.05$) by CGRP8-37 (2890 ± 256.6). During the infusion of CGRP1-37 plus CGRP8-37, the AUC (2791 ± 251.4) was not different from saline, suggesting that CGRP8-37 was able to reverse the inhibitory effect of CGRP1-37 on postprandial motility.

The results were similar when evaluated with the $T_{1/2}$ data (fig.5). Compared to basal conditions (50 ± 4.3 min), atropine considerably retarded the time to empty 50% of the solid meal (we arbitrarily gave a value of 300min since almost infinite values were to be extrapolated from the data curves). When CGRP1-37 was infused, the half-emptying time was significantly ($p < 0.01$) increased to 78 ± 7.3 min, while CGRP8-37 given alone (59 ± 3.8 min) or in combination with CGRP1-37 (67 ± 5.7 min) failed to modify the $T_{1/2}$ obtained in control situation. This confirmed that CGRP1-37 could delay the emptying of a meal, an effect that was reversed by the addition of the CGRP receptor antagonist CGRP8-37.

Vascular effects of CGRP1-37 and CGRP8-37

Arterial pressure. As shown on fig. 6, during the 3 hrs perfusion of CGRP1-37 the systolic (118 ± 1.6 mmHg) and diastolic (64 ± 1.4 mmHg) arterial pressures ($n=127$) were significantly lower ($p < 0.01$) than those measured under basal conditions (125 ± 1.4 / 75 ± 1.2 ; $n=196$). CGRP8-37 had no influence on the vascular parameters (127 ± 2.0 / 76 ± 1.7 mmHg; $n=117$). During the simultaneous perfusion of CGRP1-37 and CGRP8-37 (given at distinct

perfusion sites), the arterial pressures (n=36) were still decreased (116 ± 3.6 , $p<0.05$ and 58 ± 3.1 mmHg, $p<0.01$, for systolic and diastolic pressures, respectively) suggesting that CGRP8-37 was not able to block the vasodilatation induced by CGRP1-37.

Cardiac rhythm. In comparison to basal conditions (83 ± 1.6 beats/min; n=195), the heart rate was accelerated ($p<0.01$) during the perfusion of CGRP1-37 (110 ± 1.4 ; n=127) and it remained stable with CGRP8-37 (82 ± 2.4 beats/min; n=117). CGRP8-37 failed to block the tachycardia induced by CGRP1-37. This was true whether CGRP1-37 was injected against a background administration of CGRP8-37 or when CGRP8-37 was perfused on a background of CGRP1-37 (data not shown).

DISCUSSION

Our study has shown that in dog 1) CGRP1-37 did not have a significant influence on the interdigestive motility, but 2) that it inhibited the gastric emptying of a solid meal, 3) a digestive effect that was blocked by the CGRP type I receptor antagonist, CGRP8-37. 4) CGRP1-37 also influenced hemodynamic parameters, decreasing the arterial blood pressure and increasing the cardiac rhythm, but 5) these vascular effects were not antagonized by CGRP8-37.

Experiments performed in dogs had shown that CGRP had secretory effects on the digestive system, inhibiting gastric acid secretion (17, 9) or pancreatic exocrine functions (9) as well as stimulating secretion of water and electrolytes from the jejunum (23). CGRP could possibly exercise a physiological influence on GI secretion since Lawson *et al.* (11) have demonstrated that the inhibition of endogenous CGRP by receptor antagonist CGRP8-37 could increase the basal gastric acid secretion. CGRP could also have motor effects. In dogs, it

inhibited the postprandial gallbladder motility (14), but it failed to modify the gastric emptying of a saline solution (17). The digestive action of CGRP was also tested in other species. It lowered the pressure of the lower esophageal sphincter in cats (18), inhibited gastric emptying (22) or small intestinal transit in rats (12), decreased gastric and gallbladder contractility in sheeps or guinea pigs (5, 8) and reversed the postprandial motility to an interdigestive profile in rats (6). Therefore, in agreement with prior works supporting an inhibitory motor effect of CGRP, we have shown here that CGRP failed to have a significant effect on interdigestive motor activity, but it decreased the gastric emptying of a solid meal. The absence of effect of CGRP8-37 on the gastric emptying rate suggests that CGRP does not regulate meal emptying in normal physiological conditions. However, CGRP could be involved in pathological conditions as suggested by Plourde *et al.* (20) who showed that blocking CGRP effect by the receptor antagonist CGRP8-37 or by CGRP monoclonal antibody reversed the surgery-induced gastroparesis in rats.

CGRP receptors were identified in muscles as on nerves (10) and both receptors could account for the inhibitory effect of the peptide. However, our experimental *in vivo* protocol was not designed to determine if CGRP had an effect on smooth muscle cells and/or on nerves of the gastrointestinal tract. Previous studies suggested that CGRP inhibition is, at least in part, mediated by somatostatin. It has been indeed documented that CGRP decreased pancreatic and gastric secretions or jejunal absorption in parallel to a concomitant rise in somatostatin release in conscious dogs (9, 23). Furthermore, *in vitro* studies (4) suggested that α -CGRP may exert its inhibitory secretory effect by a direct action on D cells. The motor action of CGRP we observed in our dogs is similar to the effect achievable with somatostatin. Somatostatin is known indeed to slow down gastric emptying and could therefore account for the postprandial effect of CGRP noted here. During the interdigestive period, somatostatin is known to suppress the cyclic release in plasma motilin and the associated gastric phase IIIs (21), as we observed

here in 50% of our animals when infused with CGRP [while the other two animals seem unaffected by the peptide, but we found no explanation for this phenomenon although it is known that somatostatin can have hardly predictable effects in animals, as in man, including the stimulation of MMCs (21)]. Future studies with somatostatin antisera or antagonists could help clarify somatostatin implication in CGRP inhibitory effect on GI motility.

It is well recognized that CGRP is a potent vasodilator and has inotropic as well as chronotropic effects. However, most studies have been performed in rats and little was known about its vascular effects in dogs. In conscious rats, the administration of human α -CGRP caused tachycardia with a fall in mean arterial blood pressure, and the infusion of human α -CGRP8-37 succeeded in blocking these vascular effects of CGRP (7), suggesting that CGRP receptor subtype I is present in the rat vascular system. In man, Beglinger *et al.* (2) have found that α -CGRP was more potent than β -CGRP to increase blood flow in skin or carotid arteries and to accelerate heart rate while only human β -CGRP was capable to inhibit pentagastrin-stimulated gastric acid output. Based on the potency of CGRP α vs. β to exhibit a biological action on the different systems, the association of CGRP receptor subtype I for the cardiovascular system and subtype II for the gastric system was then postulated, but, to our knowledge, CGRP8-37 has never been injected in man to verify this hypothesis. In dog, human α -CGRP induced hypotension and tachycardia (23). CGRP also increased vertebral blood flow, and the blockade by CGRP8-37 supported the presence of CGRP receptor subtype I in this vascular system (1). To the best of our knowledge, CGRP8-37 effects on arterial tension and heart rate in dog were unknown. According to our canine study, since CGRP antagonist CGRP8-37 did not block the CGRP induced fall in arterial tension and rise in cardiac rhythm, but blocked the decrease in gastric emptying induced by CGRP we extrapolated the presence of CGRP receptor subtype II in the cardiovascular system and of subtype I in the gastrointestinal

tract. The development of pharmacological tools specific for each putative receptor subtype would help in the future for a better understanding of CGRP receptors heterogeneity through various physiological systems and species, as well as in clinical application where focused biological activity is requested.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Ms. M. Joyal for secretarial assistance, Mr. R. Boileau for statistical help and Mr. R. Mongeau for animal cares. This work was partly supported by the Canadian Federation of University Women awarded to M.-C. L'Heureux and by the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

- 1- BASKAYA, M. K., Y. SUZUKI, M. ANZAI, Y. SEKI, K. SAITO, M. TAKAYASU, M. SHIBUYA, AND K. SUGITA. Effects of adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin on cerebral circulation in dogs. *J. Cerebr. Blood F. Met.* 15 : 827-834, 1995.
- 2- BEGLINGER, C., W. BORN, R. MÜNCH, A. KURTZ, J.-P. GUTZWILLER, K. JÄGER, AND J. A. FISCHER. Distinct hemodynamic and gastric effects of human CGRP I and II in man. *Peptides* 12(6) : 1347-1351, 1991.
- 3- BELL, D., AND B. J. MCDERMOTT. Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacol. Rev.* 48(2) : 253-288, 1996.
- 4- BRUBAKER, P. L., and G. R. GREENBERG. Calcitonin gene-related peptide-I preferentially stimulates secretion of somatostatin from intestinal cultures. *Endocrinology* 133 : 2833-2837, 1993.
- 5- BUENO, L., M. J. FARGEAS, AND P. JULIE. Effects of calcitonin and CGRP alone or in combination on food intake and forestomach (reticulum) motility in sheep. *Physiol. Behav.* 36 : 907-911, 1986.
- 6- FARGEAS, M. J., J. FIORAMONTI, AND L. BUENO. Calcitonin gene-related peptide : brain and spinal action on intestinal motility. *Peptides* 6(6): 1167-1171, 1985.

- 7- GARDINER, S. M., A. M. COMPTON, P. A. KEMP, T. BENNETT, C. BOSE, R. FOULKES, AND B. HUGHES. Antagonistic effect of human α -CGRP [8-37] on the in vivo regional haemodynamic actions of human α -CGRP. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 171(3) : 938-943, 1990.
- 8- HASHIMOTO, T., G. J. POSTON, G. H. GREELEY, AND J. C. THOMPSON. Calcitonin gene-related peptide inhibits gallbladder contractility. *Surgery* 104 : 419-423, 1988.
- 9- HELTON, W. S., M. M. MULHOLLAND, N. W. BUNNETT, AND H. T. DEBAS. Inhibition of gastric and pancreatic secretion in dogs by CGRP : role of somatostatin. *Am. J. Physiol.* 256 (Gastrointest. Liver Physiol. 19): G715-G720, 1989.
- 10- HOLZER, P. Calcitonin gene-related peptide. In *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*, edited by J. H. Walsh and G. J. Dockray. New York : Raven Press, 1994, p.493-523.
- 11- LAWSON, D. C., C. R. MANTYH, AND T. N. PAPPAS. Effect of CGRP antagonist, alpha-CGRP8-37, on acid secretion in the dog. *Digest. Dis. Sci.* 39(7) : 1405-1408, 1994.
- 12- LENZ, H. J. Calcitonin and CGRP inhibit gastrointestinal transit via distinct neuronal pathways. *Am. J. Physiol.* 254 (Gastrointest. Liver Physiol. 17) : G920-G924, 1988.
- 13- LENZ, H. J., AND M. R. BROWN. Cerebroventricular calcitonin gene-related peptide inhibits rat duodenal bicarbonate secretion by release of norepinephrine and vasopressin. *J. Clin. Invest.* 85 : 25-32, 1990.

- 14- LENZ, H. J., F. G. ZIMMERMAN, AND B. MESSMER. Regulation of canine gallbladder motility by brain peptides. *Gastroenterology* 104 : 1678-1685, 1993.
- 15- LI, Y., Y. C. JIANG, and C. OWYANG. Central CGRP inhibits pancreatic enzyme secretion by modulation of vagal parasympathetic outflow. *Am. J. Physiol.* 275 (Gastrointest. Liver Physiol. 38) : G957-G963, 1998.
- 16- MULDERY, P. K., M. A. GHATEI, R. A. SPOKES, P. M. JONES, A. M. PIERSON, Q. A. HAMID, S. KANSE, S. G. AMARA, J. M. BURRIN, S. LEGON, J. M. POLAK, AND S. R. BLOOM. Differential expression of α -CGRP and β -CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience* 25(1) : 195-205, 1988.
- 17- PAPPAS, T., H. T. DEBAS, J. H. WALSH, J. RIVIER, AND T. TACHÉ. Calcitonin gene-related peptide-induced selective inhibition of gastric acid secretion in dogs. *Am. J. Physiol.* 250 (Gastrointest. Liver Physiol. 13) : G127-G133, 1986.
- 18- PARKMAN, H. P., J. C. REYNOLDS, K. S. ELFMAN, AND C. P. OGOREK. Calcitonin gene-related peptide : a sensory and motor neurotransmitter in the feline lower esophageal sphincter. *Regul. Peptides* 25 : 131-146, 1989.
- 19- PLOURDE, V., S. ST-PIERRE, AND R. QUIRION. Calcitonin gene-related peptide in viscerosensitive response to colorectal distension in rats. *Am. J. Physiol.* 273 (Gastrointest. Liver Physiol. 36): G191-G196, 1997.

- 20- PLOURDE, V., H. C. WONG, J. H. WALSH, H. E. RAYBOULD, AND Y. TACHÉ. CGRP antagonists and capsaicin on celiac ganglia partly prevent postoperative gastric ileus. *Peptides* 14(6): 1225-1229, 1993.
- 21- POITRAS, P., J. H. STEINBACH, G. VANDEVENTER, C. F. CODE, AND J. H. WALSH. Motilin-independent ectopic fronts of the interdigestive myoelectric complex in dogs. *Am. J. Physiol.* 239 (Gastrointest. Liver Physiol. 2) : G215-G220, 1980.
- 22- RAYBOULD, H. E., E. KOLVES, AND Y. TACHÉ. Central nervous system action of calcitonin gene-related peptide to inhibit gastric emptying in the conscious rat. *Peptides* 9 (4): 735-737, 1988.
- 23- REASBECK, P. G., S. M. BURNS, AND A. SHULKES. Calcitonin gene-related peptide : enteric and cardiovascular effects in the dog. *Gastroenterology* 95 : 966-971, 1988.
- 24- TACHÉ, Y., T. PAPPAS, M. LAUFFENBURGER, Y. GOTO, J. H. WALSH, AND H. DEBAS. Calcitonin gene-related peptide : potent peripheral inhibitor of gastric acid secretion in rats and dogs. *Gastroenterology* 87 : 344-349, 1984.

FIGURE LEGENDS**FIGURE 1**

Effect of CGRP1-37 (200pmol/kg/hr) and CGRP8-37 (2000pmol/kg/hr) throughout a 3 hrs perfusion on the mean MMC duration in 4 dogs.

FIGURE 2

Effect of CGRP1-37 (200pmol/kg/hr) and CGRP8-37 (2000pmol/kg/hr) throughout a 3 hrs perfusion on individual MMCs suggesting 2 distinct populations of dogs under CGRP1-37 conditions.

FIGURE 3

Increase in plasma acetaminophen with emptying of a solid meal (15g meat/kg; given at time 0), under perfusion of saline, CGRP1-37 (200pmol/kg/hr) or atropine (15µg/kg/hr).

FIGURE 4

Gastric emptying rate estimated by the area under the curve (AUC) of plasma increase in acetaminophen ingested with a solid meal (15g meat/kg) for the time analysis window from 0 to 90 min. * = $p < 0.01$ compared to control saline.

FIGURE 5

Gastric emptying rate estimated by T50% of plasma acetaminophen which represents the time taken to reach 50% of the maximum acetaminophen concentration obtained after a solid meal (15g meat/kg). * = $p < 0.01$ compared to control saline.

FIGURE 6

Mean arterial pressures (systolic and diastolic) during perfusion of saline, CGRP1-37 (200pmol/kg/hr), CGRP8-37 (2000pmol/kg/hr) or a simultaneous perfusion of CGRP1-37 and CGRP8-37. *=p<0.01; #= p<0.05 compared to control saline.

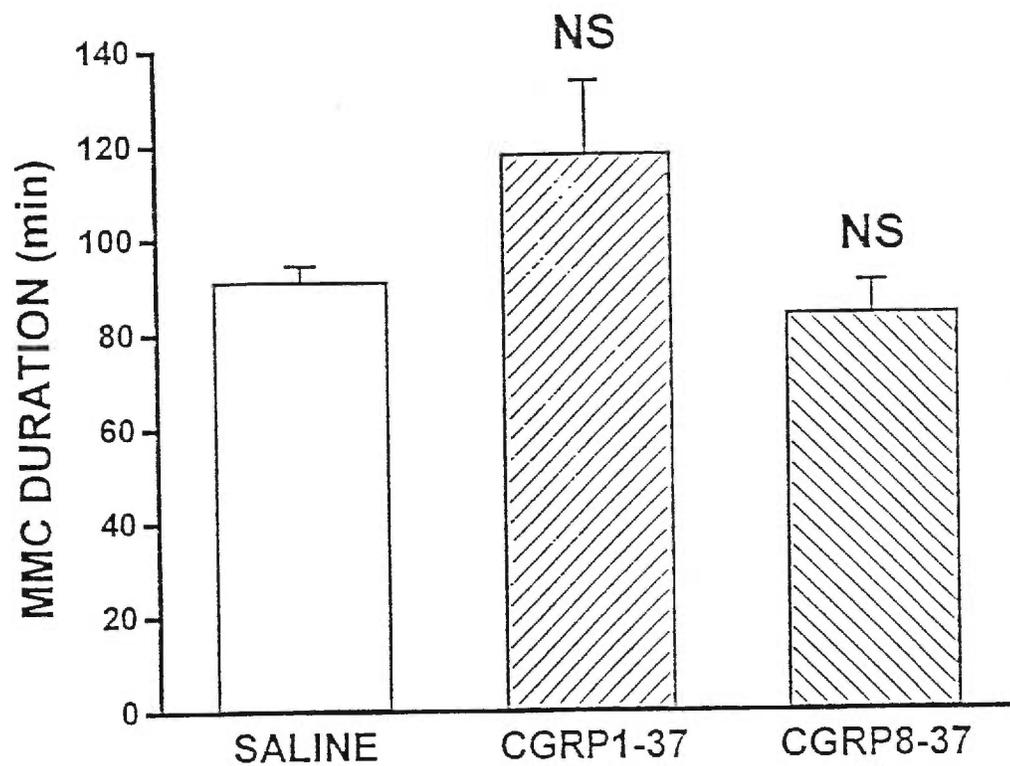


FIGURE 1

Effect of CGRP1-37 (200pmol/kg/hr) and CGRP8-37 (2000pmol/kg/hr) throughout a 3 hrs perfusion on the mean MMC duration in 4 dogs.

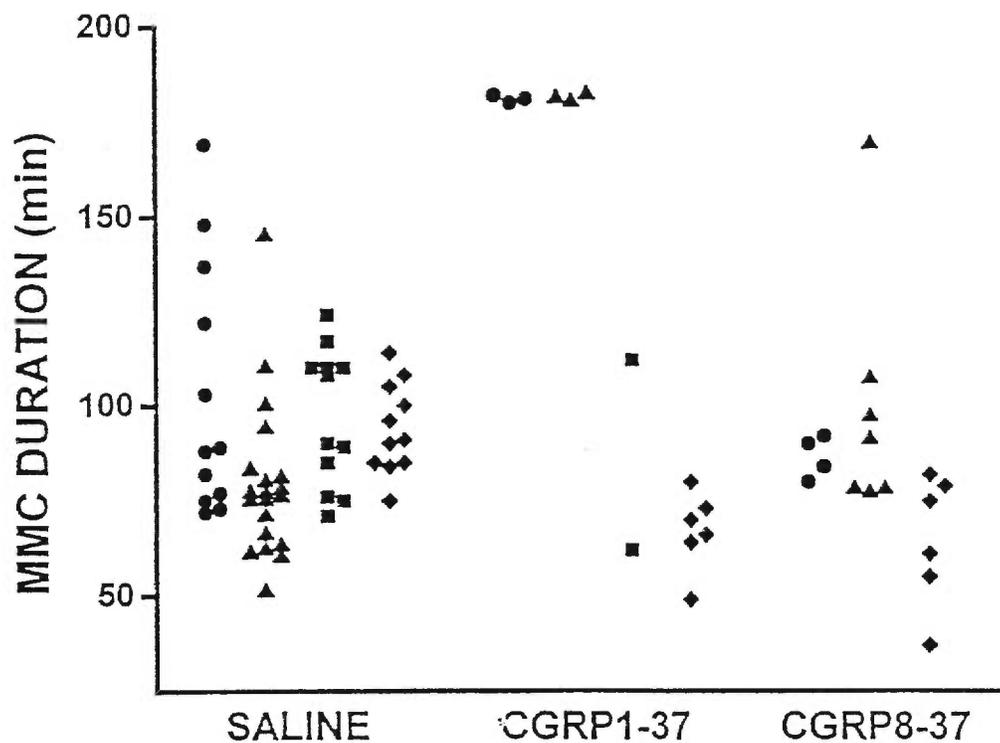


FIGURE 2

Effect of CGRP1-37 (200pmol/kg/hr) and CGRP8-37 (2000pmol/kg/hr) throughout a 3 hrs perfusion on individual MMCs suggesting 2 distinct populations of dogs under CGRP1-37 conditions.

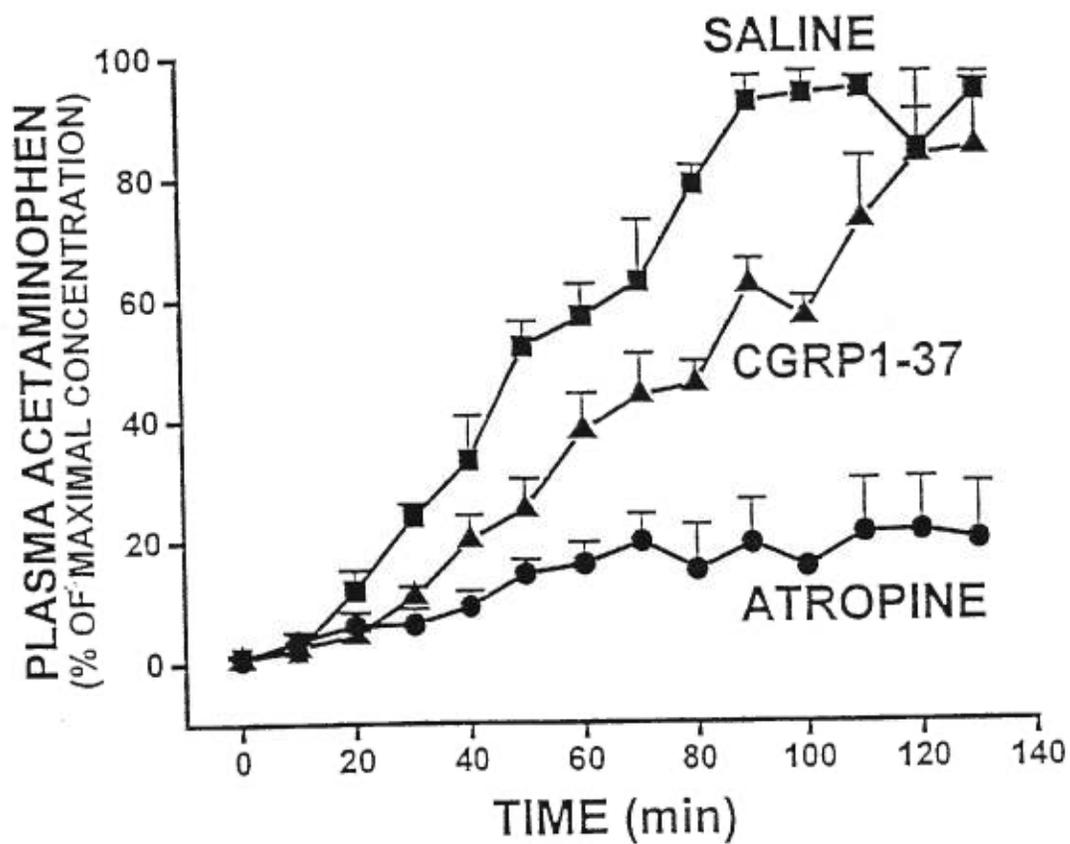


FIGURE 3

Increase in plasma acetaminophen with emptying of a solid meal (15g meat/kg; given at time 0), under perfusion of saline, CGRP1-37 (200pmol/kg/hr) or atropine (15 μ g/kg/hr).

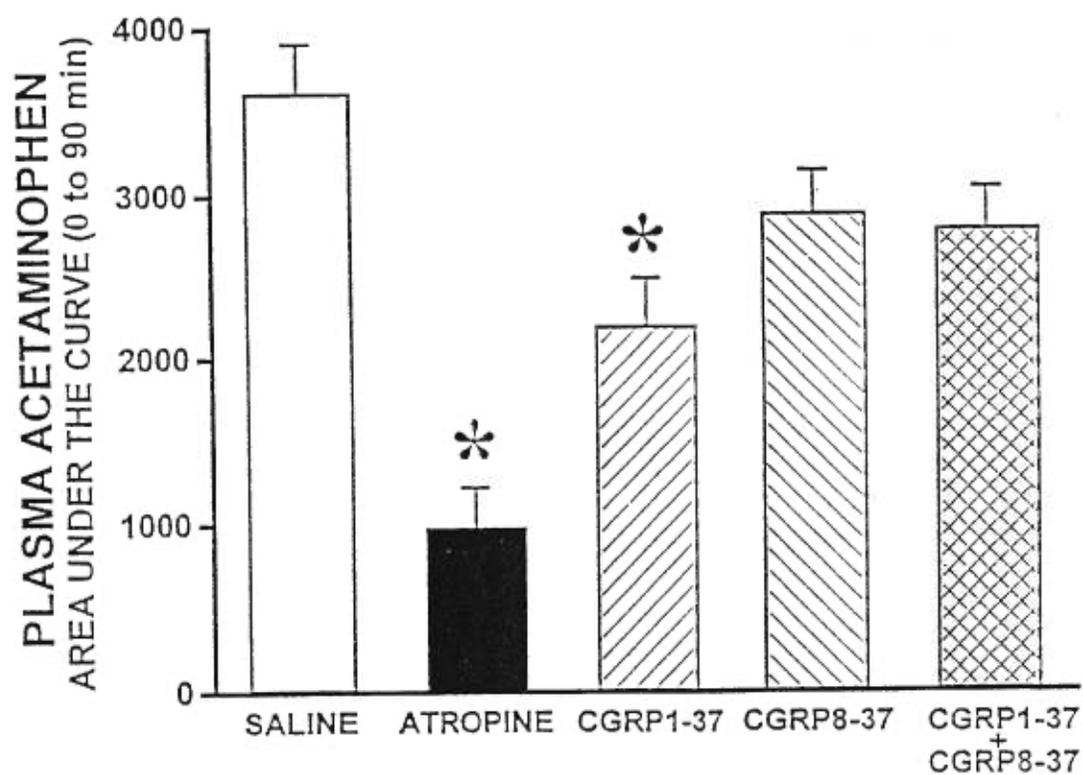


FIGURE 4

Gastric emptying rate estimated by the area under the curve (AUC) of plasma increase in acetaminophen ingested with a solid meal (15g meat/kg) for the time analysis window from 0 to 90 min. * = $p < 0.01$ compared to control saline.

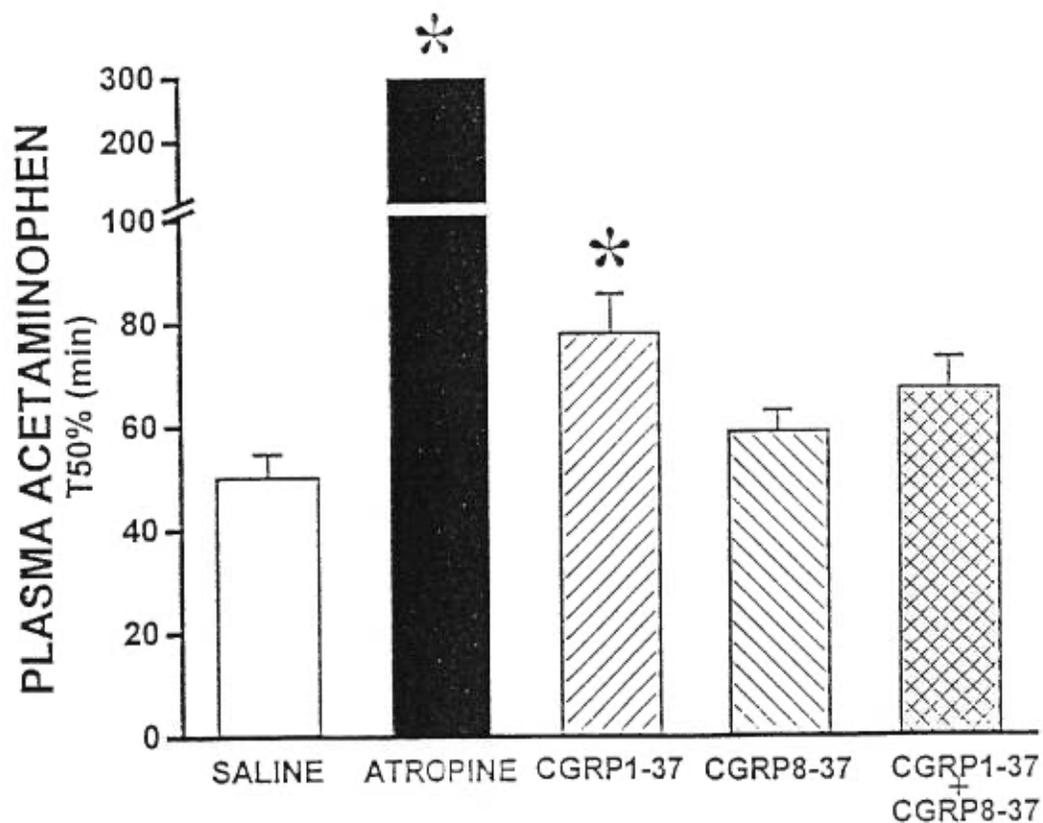


FIGURE 5

Gastric emptying rate estimated by T50% of plasma acetaminophen which represents the time taken to reach 50% of the maximum acetaminophen concentration obtained after a solid meal (15g meat/kg). * = $p < 0.01$ compared to control saline.

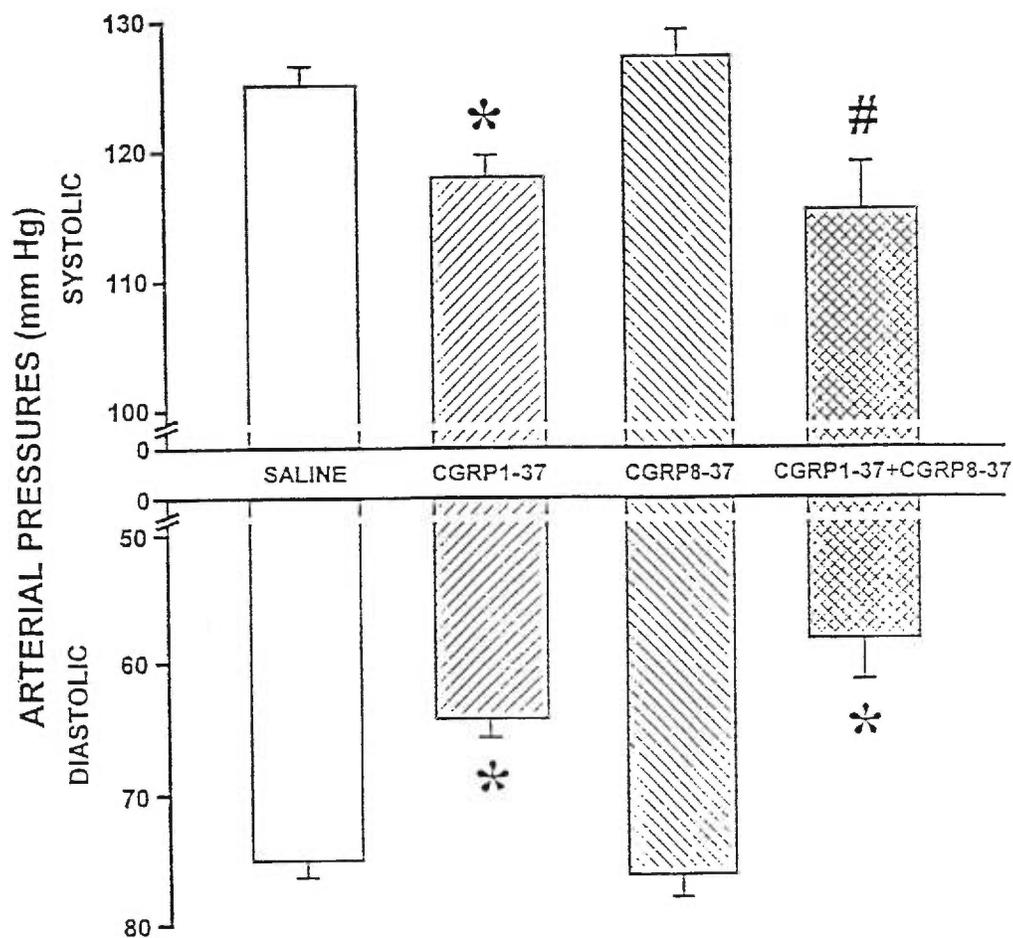


FIGURE 6

Mean arterial pressures (systolic and diastolic) during perfusion of saline, CGRP1-37 (200pmol/kg/hr), CGRP8-37 (2000pmol/kg/hr) or a simultaneous perfusion of CGRP1-37 and CGRP8-37. *= $p < 0.01$; #= $p < 0.05$ compared to control saline.

DISCUSSION

D'une part, notre étude a démontré chez le chien 1) que le CGRP1-37 ou le CGRP8-37 n'ont pas modifié le CMM, ni la libération et ni l'action motrice de la motiline plasmatique, 2) que le CGRP1-37 a inhibé la vidange gastrique et 3) cet effet moteur a été bloqué par l'antagoniste du CGRP, le CGRP8-37. En ce qui concerne les effets vasculaires du CGRP, celui-ci a 4) diminué les pressions artérielles et augmenté la fréquence cardiaque, mais 5) ces effets n'ont pas été bloqués par l'antagoniste, le CGRP8-37. Sachant que ce dernier est spécifique pour le récepteur de sous-type I, à la lumière des résultats obtenus, nous en déduisons donc que nous avons agi sur les récepteurs de sous-type I et II pour les systèmes digestif et cardio-vasculaire, respectivement. On se rappelle que chez le rat, les effets vasculaires, l'inhibition de la sécrétion gastrique et de la motricité semblent médiés par le récepteur de sous-type I du CGRP (chapitre II). Il existe une grande variabilité entre les espèces quant au sous-type de récepteur du CGRP impliqué pour un effet biologique spécifique. Peu d'études ont été effectuées chez le chien, particulièrement *in vivo*. Bien que nos résultats s'accordent en partie sur les observations faites chez le rat, il est normal d'observer des résultats différents pour une autre espèce.

Tel que mentionné précédemment au chapitre II, des expériences effectuées chez le chien avaient démontré que le CGRP était responsable

d'effets sécrétoires sur le système digestif comme l'inhibition de la sécrétion d'acide gastrique ou des fonctions pancréatiques exocrines. Le CGRP exerce fort probablement une influence physiologique sur la sécrétion d'acide gastrique en référence à l'étude de Lawson *et al.* (1994) sur laquelle nous avons mis l'emphase (chapitre II; p.51). On se rappelle que leurs travaux avaient montré que le CGRP8-37 inhibait les effets biologiques du CGRP endogène, ayant ainsi engendré une augmentation de la réponse acide. Le CGRP a également des effets moteurs. À la lumière de ce qui a été discuté au chapitre II, ces effets semblent inhibiteurs. Cependant, particulièrement pour le chien, très peu d'études ont été effectuées. Nous démontrons ici que le CGRP n'a pas d'effet significatif sur l'activité motrice interdigestive, mais qu'il peut diminuer la vidange gastrique normale d'un repas solide. L'absence d'effet du CGRP8-37 sur la vidange gastrique suggère que le récepteur de sous-type I du CGRP n'a pas un rôle physiologique dans la régulation de la vidange d'un repas, mais il ne faudrait pas omettre que le récepteur de sous-type II pourrait initier une réponse physiologique. Par contre, nous ne pouvons guère exclure la possibilité que le CGRP soit impliqué en conditions pathologiques. D'ailleurs, au chapitre IV, nous avons mentionné une des études du Dr Plourde (Plourde *et al.*; 1993b) où le CGRP8-37 était capable de renverser une gastroparésie induite par une chirurgie. Donc, le CGRP a

probablement une implication dans la motricité postprandiale en conditions pathologiques.

Se rapportant à ce qui a été mentionné au chapitre II, le CGRP exercerait son effet inhibiteur musculaire sur les nerfs et/ou sur les muscles. Certes, notre protocole expérimental *in vivo* n'a pas été conçu pour élucider la question. Il serait intéressant d'injecter, par exemple, du TTX dans une branche de l'artère mésentérique et de considérer comment la motricité gastro-intestinale du segment ainsi irrigué en est affectée.

Des études précédentes ont suggéré que l'inhibition du CGRP était, au moins en partie, médiée par la somatostatine. Par exemple, chez le chien conscient, le CGRP diminue les sécrétions gastrique et pancréatique exocrine et ce, en parallèle à une augmentation concomitante de la relâche de somatostatine (Helton *et al.*; 1989). Dans une étude *ex vivo* (antre gastrique de rat) par Manela *et al.* (1995), les auteurs ont trouvé que le CGRP8-37 est capable de bloquer la libération de somatostatine stimulée par une augmentation de l'acidité luminale, suggérant ainsi la participation du récepteur de sous-type I du CGRP. L'action motrice du CGRP que nous avons observée dans notre étude semble aussi médiée par le récepteur de sous-type I. Puisqu'il est connu que la somatostatine ralentit la vidange

gastrique, il est possible que l'effet moteur postprandial que nous avons observé implique la somatostatine. L'administration d'un anticorps de la somatostatine serait une façon d'élucider l'implication de cette hormone en ce qui concerne l'effet inhibiteur sur la motricité gastro-intestinale du CGRP. Durant la période interdigestive, lors de la perfusion du CGRP, nous n'avons pu conclure à aucun effet biologique précis, mais il semblait exister deux populations d'animaux. L'une où le CGRP éliminait les phases III tout comme les augmentations de la motilinémie. Par exemple, pour une des chiennes, lors d'un protocole expérimental, durant l'initiation d'une phase III du CMM, celle-ci a eu un taux de motiline plasmatique de 351.6 fmol/ml (femtomole par millilitre) en conditions basales, mais durant la perfusion de CGRP1-37, la motilinémie a atteint une valeur de 278.6 fmol/ml qui n'a guère été suffisante pour engendrer une phase III du CMM. Chez l'autre population, les CMM et les cycles de motiline plasmatique avaient lieu normalement. À titre d'exemple, une des chiennes a eu une motilinémie de 142.9 fmol/ml en conditions basales lors du début d'une phase III du CMM et de 138.6 fmol/ml pendant la perfusion de CGRP1-37, ce qui a engendré une phase III du CMM. Nous n'avons trouvé aucune explication rationnelle pour ce phénomène. Poitras *et al.* (1980) avaient démontré chez le chien que la somatostatine supprime la libération cyclique de la motiline plasmatique (et la phase III leur étant associée) ainsi que l'effet biologique de la motiline. Ces

effets inhibiteurs de la somatostatine ont été obtenus à des doses variables (de 0.625 à 5.0 μ g/kg/hre). On sait aussi que la réponse à la somatostatine pourra être variable selon la dose, les petites doses pouvant même stimuler l'apparition des phases III (Soudah *et al.*; 1991). En clinique, les patients traités avec de la somatostatine peuvent présenter des désordres moteurs intestinaux très variables. Cette variabilité dans la réponse à la somatostatine pourrait possiblement expliquer notre observation en période interdigestive, où une inhibition semblait variable et présente que chez 50% des animaux. D'ailleurs, il aurait été intéressant de doser la somatostatine sur les échantillons sanguins prélevés, compte tenu que l'action de cette hormone pourrait confirmer cette hypothèse. N'ayant pas évalué la somatostatine plasmatique, nous assumons que l'administration d'une dose plus grande de CGRP1-37 aurait permis d'observer une inhibition de la motricité interdigestive chez tous les chiens.

Tel que décrit au chapitre II, il est bien reconnu que le CGRP est un puissant vasodilatateur et qu'il a des effets inotropes et chronotropes positifs chez le rat. Par contre, chez le chien, les effets cardio-vasculaires du CGRP étaient moins bien connus. Dans le chapitre II, nous avons effleuré les sous-types de récepteurs impliqués dans le système cardio-vasculaire. Gardiner *et al.* (1990) avaient démontré chez le rat que l'infusion de hCGRP-I causait

une hypotension ainsi qu'une tachycardie et que l'administration de hCGRP8-37 bloquait les effets vasculaires du CGRP suggérant ainsi la présence d'un récepteur de sous-type I chez ce rongeur. Chez l'homme, Beglinger *et al.* (1991) ont montré que, comparativement au CGRP-II, le CGRP-I était plus efficace pour augmenter le flux sanguin dans la peau et les artères carotidiennes, tandis que seul le hCGRP-II était capable d'inhiber la sécrétion d'acide gastrique induite par la pentagastrine. Donc, en se basant sur l'efficacité préférentielle du CGRP I ou II à déployer un effet, les effets cardio-vasculaires et digestifs seraient médiés, respectivement, par les récepteurs de sous-type I et II chez l'homme. Enfin, Baskaya *et al.* (1995) ont observé, chez le chien, que le CGRP8-37 bloquait l'augmentation du flux sanguin vertébral causé par le CGRP1-37, suggérant la présence d'un récepteur de sous-type I du CGRP dans le système cardio-vasculaire canin. Au meilleur de nos connaissances, les effets vasculaires du CGRP8-37 chez le chien n'ont jamais été caractérisés plus à fond. Selon notre étude, compte tenu que le CGRP8-37 n'a pas bloqué la diminution des pressions artérielles moyennes ni l'augmentation de la fréquence cardiaque induites par le CGRP, mais qu'il a bloqué le retard de la vidange gastrique causé par son agoniste, on en déduit que nous avons agi sur le récepteur de sous-type II pour le système cardio-vasculaire et sur le sous-type I pour le système digestif. Il aurait été intéressant de perfuser le [Cys(ACM^{2,7})]hCGRP, un agoniste

linéaire spécifique pour le récepteur de sous-type II, afin de justifier davantage nos conclusions concernant l'hétérogénéité des récepteurs du CGRP.

Pour notre étude, nous avons opté pour le chien, choisi des conditions *in vivo* et perfusé du CGRP humain. Toutes ces précautions sont prises, bien sûr dans le but de se rapprocher le plus possible de la physiologie humaine, pour éventuellement découvrir des applications cliniques au CGRP. Certes, il faut interpréter les résultats avec un oeil critique, car des différences d'espèces existent et il ne faut pas omettre que nous travaillons avec des doses pharmacologiques, où les effets obtenus sont peut-être démesurés par rapport aux effets réels du CGRP endogène. Suite à notre étude, nous ne pouvons que postuler l'existence de rôles physiologiques associés au CGRP, mais pour confirmer ces rôles, il aurait fallu injecter des doses physiologiques pour ainsi observer des réponses physiologiques. Tout modèle animal a des limites incontournables, mais nous croyons que, somme toute, le CGRP8-37 peut représenter une avenue intéressante quant au soulagement de la gastroparésie et des problèmes d'hyperalgésie viscérale en référence aux travaux du Dr Plourde. En ce sens, puisque notre étude a démontré que le CGRP8-37 est en mesure de diminuer l'inhibition de la vidange gastrique causée par le CGRP, on pourrait supposer que le

CGRP8-37 serait capable de renverser une gastroparésie postopératoire et ainsi contribuer à un retour précoce aux habitudes alimentaires d'un patient.

Reste à voir ce que nous réserve la recherche dans ce domaine...

BIBLIOGRAPHIE

Aiyar N., Rand K., Elshourbagy N. A., Zeng Z., Adamou J. E., Bergsma D. J., Li Y. A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type I receptor. *J. Biol. Chem.* 271(19): 11325-11329, 1996.

Amara S. G., Jonas V., Rosenfeld M. G., Ong E. S., Evans R. M. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298: 240-244, 1982.

Barthò L., Lembeck F., Holzer P. Calcitonin gene-related peptide is a potent relaxant of intestinal muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 135: 449-451, 1987.

Barthò L. Calcitonin gene-related peptide and capsaicin inhibit the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Regul. peptides* 35: 43-48, 1991.

Baskaya M. K., Suzuki Y., Anzai M., Seki Y., Saito K., Takayasu M., Shibuya M., Sugita K. Effects of adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin on cerebral circulation in dogs. *J. Cerebr. Blood F. Met.* 15: 827-834, 1995.

Bauerfeind P., Hof R., Hof A., Cucala M., Siegrist S., Von Ritter C., Fischer J. A., Blum A. L. Effects of hCGRP I and II on gastric blood flow and acid secretion in anesthetized rabbits. *Am. J. Physiol.* 256 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 19): G145-G149, 1989.

Beglinger C., Born W., Hildebrand P., Ensinnck J. W., Burkhardt F., Fischer J. A., Gyr K. Calcitonin gene-related peptide I and II and calcitonin: distinct

effects on gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology* 95: 958-965, 1988.

Beglinger C., Born W., Münch R., Kurtz A., Gutzwiller J.-P., Jäger K., Fischer J. A. Distinct hemodynamic and gastric effects of human CGRP I and II in man. *Peptides* 12(6): 1347-1351, 1991.

Bell D., Mcdermott B. J. Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacol. Rev.* 48(2):253-288, 1996.

Boulanger Y., Khiat A., Chen Y., Sénécal L., Tu Y., St-Pierre S., Fournier A. Structure of human calcitonin gene-related peptide (hCGRP) and of its antagonist hCGRP8-37 as determined by NMR and molecular modeling. *Peptide Res.* 8(4): 206-213, 1995.

Boulanger Y., Khiat A., Larocque A., Fournier A., St-Pierre S. Structural comparison of alanine-substituted analogues of the calcitonin gene-related peptide 8-37; Importance of the C-terminal segment for antagonistic activity. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 47: 477-483, 1996.

Brain S. D., Tippins J. R., Morris H. R., MacIntyre I., Williams T. J. Potent vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 87: 533-536, 1986.

Bueno L., Fargeas M. J., Julie P. Effects of calcitonin and CGRP alone or in combination on food intake and forestomach (reticulum) motility in sheep. *Physiol. Behav.* 36(5): 907-911, 1986.

Cadieux A., Pomerleau F., St-Pierre S., Fournier A. Inhibitory action of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the mouse colon. *J. Pharm. Pharmacol.* 42: 520-521, 1990.

Chakder S., Rattan S. Antagonism of calcitonin gene-related peptide (CGRP) by human CGRP-(8-37): role of CGRP in internal anal sphincter relaxation. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 256(3): 1019-1024, 1991.

Chatterjee T. K., Moy J. A., Fisher R. A. Characterization and regulation of high affinity calcitonin gene-related peptide receptors in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Endocrinology* 128(6): 2731-2738, 1991.

Chiba T., Park J., Yamada T. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) stimulates somatostatin secretion from isolated gastric D-cells via cyclic AMP dependent mechanisms. *Gastroenterology* 96: A86, 1989.

Clements J. A., Heading R. C., Nimmo W. S., Prescott L. F. Kinetics of acetaminophen absorption and gastric emptying in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 24(4): 420-431, 1978.

Code C. F., Marlett J. A. The interdigestive myo-electric complex of the stomach and small bowel of dogs. *J. Physiol.* 246: 289-309, 1975.

Cohen R., Bensimon C., Raynaud A., Modigliani É. La peptide alternatif du gène de la calcitonine (CGRP); Actions et régulation. *Ann. Med. Interne* 143(7); 455-462, 1992.

Coleman T. P., Roesser J. R. RNA secondary structure: an important *cis*-element in rat calcitonin/CGRP pre-messenger RNA splicing. *Biochemistry* 37: 15941-15950, 1998.

Dennis T., Fournier A., St-Pierre S., Quirion R. Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251(2): 718-725, 1989.

Dennis T., Fournier A., Cadieux A., Pomerleau F., Jolicoeur F. B., St-Pierre S., Quirion R. hCGRP₈₋₃₇, a calcitonin gene-related peptide antagonist revealing calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain and periphery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254(1): 123-128, 1990.

Dennis T., Fournier A., Guard S., St-Pierre S., Quirion R. Calcitonin gene-related peptide (hCGRP α) binding sites in the nucleus accumbens. Atypical structural requirements and marked phylogenetic differences. *Brain Res.* 539: 59-66, 1991.

Fargeas M. J., Fioramonti J., Bueno L. Calcitonin gene-related peptide: brain and spinal action on intestinal motility. *Peptides* 6(6): 1167-1171, 1985.

Foord S. M., Craig R. K. Isolation and characterization of a human calcitonin gene-related peptide receptor. *Eur. J. Biochem.* 170: 373-379, 1987.

Foulkes R., Shaw N., Bose C., Hughes B. Differential vasodilator profile of calcitonin gene-related peptide in porcine large and small diameter coronary artery rings. *Eur. J. Pharmacol.* 201:143-149, 1991.

Franco-Cereceda A., Gennari C., Nami R., Agnusdei D., Pernow J., Lundberg J. M., Fischer J. A. Cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptides I and II in man. *Circ. Res.* 60: 393-397, 1987.

Gardiner S. M., Compton A. M., Bennett T. Regional haemodynamic effects of human α - and β -calcitonin gene-related peptide in conscious Wistar rats. *Brit. J. Pharmacol.* 98: 1225-1232, 1989.

Gardiner S. M., Compton A. M., Kemp P. A., Bennett T., Bose C., Foulkes R., Hughes B. Antagonistic effect of human α -CGRP [8-37] on the in vivo regional haemodynamic actions of human α -CGRP. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 171(3): 938-943, 1990.

Gardiner S. M., Compton A. M., Kemp P. A., Bennett T., Bose C., Foulkes R., Hughes B. Human α -calcitonin gene-related peptide (CGRP)-(8-37), but not -(28-37), inhibits carotid vasodilator effects of human α -CGRP in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 375-378, 1991.

Gates T. S., Zimmerman R. P., Mantyh C. R., Vigna S. R., Mantyh P. W. Calcitonin gene-related peptide- α receptor binding sites in the gastrointestinal tract. *Neuroscience* 31(3): 757-770, 1989.

Gennari C., Fischer J. A. Cardiovascular action of calcitonin gene-related peptide in humans. *Calcified Tissue Int.* 37: 581-584, 1985.

Gibbins I. L., Furness J. B., Costa M., MacIntyre I., Hillyard C. J., Girgis S. Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with

substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci. Lett.* 57: 125-130, 1985.

Grider J. R. CGRP as a transmitter in the sensory pathway mediating peristaltic reflex. *Am. J. Physiol.* 266 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 29): G1139-G1145, 1994.

Hall J. M., Smith D. M. Calcitonin gene-related peptide - a new concept in receptor-ligand specificity? *Trends Pharmacol. Sci.* 19: 303-305, 1998.

Han S.-P., Naes L., Westfall T. C. Inhibition of periarterial nerve stimulation-induced vasodilation of the mesenteric arterial bed by CGRP (8-37) and CGRP receptor desensitization. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 168(2): 786-791, 1990.

Hashimoto T., Poston G. J., Greeley G. H., Thompson J. C. Calcitonin gene-related peptide inhibits gallbladder contractility. *Surgery* 104: 419-423, 1988.

Helton W. S., Mulholland M. M., Bunnett N. W., Debas H. T. Inhibition of gastric and pancreatic secretion in dogs by CGRP: role of somatostatin. *Am J. Physiol.* 256 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 19): G715-G720, 1989.

Henke H., Sigrist S., Lang W., Schneider J., Fischer J. A. Comparison of binding sites for the calcitonin gene-related peptides I and II in man. *Brain Res.* 410: 404-408, 1987.

Hirata Y., Takagi Y., Takata S., Fukuda Y., Yoshimi H., Fujita T. Calcitonin gene-related peptide receptor in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151 (3): 113-1121, 1988.

Holzer P., Barthò L., Matusäk O., Bauer V. Calcitonin gene-related peptide action on intestinal circular muscle. *Am. J. Physiol.* 256 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 19): G546-G552, 1989.

Holzer P. Calcitonin gene-related peptide. Dans *Gut peptides: Biochemistry and physiology*. Édité par Walsh J. H. et Dockray G. J. New York, Raven Press: 493-523, 1994.

Holzer P., Wachter Ch., Heinemann A., Jovic M., Lippe I. Th., Herbert M. K. Diverse interactions of calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the gastric and cutaneous microcirculation. *Can. J. Physiol. Pharm.* 73(7): 991-994, 1995.

Ishida-Yamamoto A., Tohyama M. Calcitonin gene-related peptide in the nervous tissue. *Prog. Neurobiol.* 33: 335-386, 1989.

Ito H., Bell D., Tamamori M., Nozato T., Shimojo T., Adachi S., Abe S., Marumo F., Hiroe M. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and hypertrophy of cardiomyocytes. *Heart Vessels Suppl.* 12: 15-17, 1997.

Itoh Z. Hormones, peptides, opioids and protaglandins in normal gastric contractions. Dans *Gastric and Gastroduodenal Motility*. Édité par Akkermans, Johnson et Read, Praeger: 41-59, 1984.

Ittner J., Dambacher M. A., Born W., Ketelslegers J. M., Buyschaert M., Albert P. M., Lambert A. E., Fischer J. A. Diagnostic evaluation of measurements of carboxyl-terminal flanking peptide (PDN-21) of the human calcitonin gene in human serum. *J. Clin. Endocr. Metab.* 61: 1133-1137, 1985.

Jäger K., Muench R., Seifert H., Beglinger C., Bollinger A., Fischer J. A. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) causes redistribution of blood flow in humans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39: 491-494, 1990.

Jansen I., Mortensen A., Edvinsson L. Characterization of Calcitonin gene-related peptide receptors in human cerebral vessels. Vasomotor responses and cAMP accumulation. *Ann. NY Acad. Sci.* 657: 435-440, 1992.

Kapas S., Clark A. J. L. Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 217(3): 832-838, 1995.

Katayama M., Nadel J. A., Bunnett N. W., Di Maria G. U., Haxhiu M., Borson D. B. Catabolism of calcitonin gene-related peptide and substance P by neutral endopeptidase. *Peptides* 12: 563-567, 1991.

Katori N., Aoyagi N., Kojima S. Effects of atropine and loperamide on the agitating force and GI transit time in dogs in drug absorption studies. *Biol. Pharm. Bull.* 19(10): 1338-1340, 1996.

Kline L. W., Kaneko T., Benishin C. G., Pang P. K. T. Calcitonin gene-related peptide: an inhibitor of guinea pig gallbladder contraction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69(8): 1149-1154, 1991.

Kraenzlin M. E., Ch'ng J. L. C., Mulderry P. K., Ghatei M. A., Bloom S. R. Infusion of a novel peptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) in man. Pharmacokinetics and effects on gastric acid secretion and on gastrointestinal hormones. *Regul. Peptides* 10: 189-197, 1985.

Lappe R. W., Slivjak M. J., Todt J. A., Wendt R. L. Hemodynamic effects of calcitonin gene-related peptide in conscious rats. *Regul. Peptides* 19: 307-312, 1987.

Laufer R., Changeux J.-P. Calcitonin gene-related peptide and cyclic AMP stimulate phosphoinositide turnover in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 264(5): 2683-2689, 1989.

Lawson D. C., Mantyh C. R., Pappas T. N. Effect of CGRP antagonist, alpha-CGRP8-37, on acid secretion in the dog. *Digest. Dis. Sci.* 39(7): 1405-1408, 1994.

Le Grèves P., Nyberg F., Hökfelt T., Terenius L. Calcitonin gene-related peptide is metabolized by an endopeptidase hydrolyzing substance P. *Regul. Peptides* 25: 277-286, 1989.

Lenz H. J., Mortrud M. T., Vale W. W., Rivier J. E., Brown M. R. Calcitonin gene-related peptide acts within the central nervous system to inhibit gastric acid secretion. *Regul. Peptides* 9(4): 271-277, 1984.

Lenz H. J., Klapdor R., Hester S. E., Webb V. J., Galyean R. F., Rivier J. E., Brown M. R. Inhibition of gastric acid secretion by brain peptides in the dog. Role of the autonomic nervous system and gastrin. *Gastroenterology* 91: 905-912, 1986.

Lenz H. J., Brown M. R. Intracerebroventricular administration of human calcitonin and human calcitonin gene-related peptide inhibits meal-stimulated gastric acid secretion in the dog. *Digest. Dis. Sci.* 32(4):409-416, 1987.

Lenz H. J. Calcitonin and CGRP inhibit gastrointestinal transit via distinct neuronal pathways. *Am J. Physiol.* 254 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 17): G920-G924, 1988.

Lenz H. J., Zimmerman F. G., Messmer B. Regulation of canine gallbladder motility by brain peptides. *Gastroenterology* 104: 1678-1685, 1993.

Maggi C. A., Giuliani S., Zagorodnyuk V. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the circular muscle of guinea-pig colon: role as inhibitory transmitter and mechanisms of relaxation. *Regul. Peptides* 61: 27-36, 1996.

Manela F. D., Ren J., Gao J., McGuigan J. E., Harty R. F. Calcitonin gene-related peptide modulates acid-mediated regulation of somatostatin and gastrin release from rat antrum. *Gastroenterology* 109(3): 701-706, 1995.

Marshall I., Al-Kazwini S. J., Roberts P. M., Shepperson N. B., Adams M., Craig R. K. Cardiovascular effects of human and rat CGRP compared in the rat and other species. *Eur. J. Pharmacol.* 123: 207-216, 1986.

Mayer E. A., Koelbel C. B. M., Snape Jr. W. J., Eysselein V., Ennes H., Kodner A. Substance P and CGRP mediate motor response of rabbit colon to capsaicin. *Am. J. Physiol.* 259 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 22): G889-G897, 1990.

McLatchie L. M., Fraser N. J., Main M. J., Wise A., Brown J., Thompson N., Solari R., Lee M. G., Foord S. M. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-339, 1998.

Mimeault M., Fournier A., Dumont Y., St-Pierre S., Quirion R. Comparative affinities and antagonistic potencies of various human calcitonin gene-related peptide fragments on calcitonin gene-related peptide receptors in brain and periphery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258(2): 1084-1090, 1991.

Mimeault M., Quirion R., Dumont Y., St-Pierre S., Fournier A. Structure-activity study of hCGRP₈₋₃₇, a calcitonin gene-related peptide receptor antagonist. *J. Med. Chem.* 35: 2163-2168, 1992.

Mimeault M., St-Pierre S., Fournier A. Conformational characterization by circular-dichroism spectroscopy of various fragments and analogs of calcitonin gene-related peptide. *Eur. J. Biochem.* 213: 927-934, 1993.

Miyauchi T., Tomobe Y., Ishikawa T., Goto K., Sugishita Y. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces more potent vasorelaxation in the resistance portion than in the conduit portion of mesenteric arteries in humans. *Peptides* 17(5): 877-879, 1996.

Morris H. R., Panico M., Etienne T., Tippins J., Girgis S. I., MacIntyre I. Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. *Nature* 308: 746-748, 1984.

Mulderry P. K., Ghatei M. A., Spokes R. A., Jones P. M., Pierson A. M., Hamid Q. A., Kanse S., Amara S. G., Burrin J. M., Legon S., Polak J. M., Bloom S. R. Differential expression of α -CGRP and β -CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience* 25(1): 195-205, 1988.

Nakamura T., Naruse S., Ozaki T., Kumada K. Calcitonin gene-related peptide is a potent intestinal, but not gastric, vasodilator in conscious dogs. *Regul. Peptides* 65: 211-217, 1996.

Pappas T., Debas H. T., Walsh J. H., Rivier J., Taché Y. Calcitonin gene-related peptide-induced selective inhibition of gastric acid secretion in dogs. *Am. J. Physiol.* 250 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 13): G127-G133, 1986.

Parkman H. P., Reynolds J. C., Elfman K. S., Ogorek C. P. Calcitonin gene-related peptide: a sensory and motor neurotransmitter in the feline lower esophageal sphincter. *Regul. Peptides* 25: 131-146, 1989.

Plourde V., St-Pierre S., Fournier A., Taché Y. CGRP8-37 blocks the inhibition of gastric emptying induced by intravenous injection of α -CGRP in rats. *Life Sci.* 52(10): 857-862, 1993a.

Plourde V., Wong H. C., Walsh J. H., Raybould H. E., Taché Y. CGRP antagonists and capsaicin on celiac ganglia partly prevent postoperative gastric ileus. *Peptides* 14(6): 1225-1229, 1993b.

Plourde V., St-Pierre S., Quirion R. Calcitonin gene-related peptide in viscerosensitive response to colorectal distension in rats. *Am. J. Physiol.* 273 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 36): G191-G196, 1997.

Poitras P., Steinbach J. H., VanDeventer G., Code C. F., Walsh J. H. Motilin-independent ectopic fronts of the interdigestive myoelectric complex in dogs. *Am. J. Physiol.* 239 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 2): G215-G220, 1980.

Poitras P. La motiline, une hormone intestinale active en période de jeûne. *médecine/sciences* 5(4): 298-303, 1988.

Poitras P. Motilin. Dans *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*. Édité par Walsh J. H. et Dockray G. J. New York, Raven Press: 261-304, 1994.

Quayle J. M., Bonev A. D., Brayden J. E., Nelson M. T. Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. *J. Physiol.* 475(1): 9-13, 1994.

Quirion R., Van Rossum D., Dumont Y., St-Pierre S., Fournier A. Characterization of CGRP₁ and CGRP₂ receptor subtypes. *Ann. NY Acad. Sci.* 657: 88-105, 1992.

Rattan S., Gonnella P., Goyal R. K. Inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide and calcitonin on opossum esophageal smooth muscle. *Gastroenterology* 94: 284-293, 1988.

Raybould H. E., Kolve E., Taché Y. Central nervous system action of calcitonin gene-related peptide to inhibit gastric emptying in the conscious rat. *Peptides* 9(4): 735-737, 1988.

Reasbeck P. G., Burns S. M., Shulkes A. Calcitonin gene-related peptide: enteric and cardiovascular effects in the dog. *Gastroenterology* 95: 966-971, 1988.

Rekik M., Delvaux M., Frexinos J., Bueno L. The calcitonin gene-related peptide activates both cAMP and NO pathways to induce relaxation of circular smooth muscle cells of guinea-pig ileum. *Peptides* 18 (10): 1517-1522, 1997.

Rist B., Entzeroth M., Beck-Sickinger A. G. From micromolar to nanomolar affinity: a systematic approach to identify the binding site of CGRP at the human calcitonin gene-related peptide 1 receptor. *J. Med. Chem.* 41(1): 117-123, 1998.

Roesser J. R., Liittschwager K., Leff S. E. Regulation of tissue-specific splicing of the calcitonin/calcitonin gene-related peptide gene by RNA-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 268 (11): 8366-8375, 1993.

Rosenfeld M. G., Amara S. G., Roos B. A., Ong E. S., Evans R. M. Altered expression of the calcitonin gene associated with RNA polymorphism. *Nature* 290: 63-65, 1981.

Rosenfeld M. G., Lin C. R., Amara S. G., Stolarsky L., Roos B. A., Ong E. S., Evans R. M. Calcitonin mRNA polymorphism: peptide switching associated with alternative RNA splicing events. *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.* 79: 1717-1721, 1982.

Rosenfeld M. G., Mermod J-J., Amara S. G., Swanson L. W., Sawchenko P. E., Rivier J., Vale W. W., Evans R. M. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304: 129-135, 1983.

Saha S., Waugh D. J. J., Zhao P., Abel P. W., Smith D. D. Role of conformational constraints of position 7 of the disulphide bridge of h- α -CGRP derivatives in their agonist versus antagonist properties. *J. Pept. Res.* 52:112-120, 1998.

Soudah H. C., Hasler W. L., Owyang C. Effect of octreotide on intestinal motility and bacterial overgrowth in scleroderma. *New Engl. J. Med.* 325 (21): 1461-1467, 1991.

Sternini C. Tachykinin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities and mRNAs in the mammalian enteric nervous system and sensory ganglia. Dans *Sensory Nerves and Neuropeptides in Gastroenterology*. Édité par M. Costa *et al.* Plenum Press, New York: 39-51, 1991.

Sternini C. Enteric and visceral afferent CGRP neurons; Targets of innervation and differential expression patterns. *Ann. NY Acad. Sci.* 657: 170-186, 1992a.

Sternini C., De Giorgio R., Furness J. B. Calcitonin gene-related peptide neurons innervating the canine digestive system. *Regul. Peptides* 42(1-2): 15-26, 1992b.

Sun Y.-D., Benishin C. G. Effects of calcitonin gene-related peptide on longitudinal muscle and myenteric plexus of guinea pig ileum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259(3): 947-952, 1991.

Taché Y., Gunion M., Lauffenberger M., Goto Y. Inhibition of gastric acid secretion by intracerebral injection of calcitonin gene-related peptide in rats. *Life Sci.* 35: 871-878, 1984a.

Taché Y., Pappas T. Lauffenberger M., Goto Y. Walsh J. H., Debas H. Calcitonin gene-related peptide: potent peripheral inhibitor of gastric acid secretion in rats and dogs. *Gastroenterology* 87: 344-349, 1984b.

Taché Y. Inhibition of gastric acid secretion and ulcers by calcitonin gene-related peptide. *Ann. NY Acad. Sci.* 657: 240-247, 1992.

Timmermans J.-P., Scheuermann D. W., Barbiers M., Adriaensen D., Stach W., Van Hee R., De Groot-Lasseel M. H. A. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the human small intestine. *Acta Anat.* 143: 48-53, 1992.

Trasforini G., Margutti A., Portaluppi F., Menegatti M., Ambrosio M. R., Bagni B., Pansini R., Uberti E. C. D. Circadian profile of plasma calcitonin gene-related peptide in healthy man. *J. Clin. Endocr. Metab.* 73(5): 945-951, 1991.

Van Rossum D. V., Ménard D. P., Fournier A., St-Pierre S., Quirion R. Binding profile of a selective calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonist ligand, [¹²⁵I-Tyr]hCGRP₈₋₃₇, in rat brain and peripheral tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269(2): 846-853, 1994.

Van Rossum D., Hanisch U.-K., Quirion R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci. Biobehav. R.* 21(5): 649-678, 1997.

Wang B. C., Bie P., Leadley Jr. R. J., Goetz K. L. Cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 257 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 26): R726-R731, 1989.

Wimalawansa S. J., Morris H. R., MacIntyre I. Both α - and β -calcitonin gene-related peptides are present in plasma, cerebrospinal fluid and spinal cord in man. *J. Mol. Endocrinol.* 3: 247-252, 1989.

Wimalawansa S. J. Circadian variation of plasma calcitonin gene-related peptide in man. *J. Neuroendocrinol.* 3(3): 319-322, 1991.

Wimalawansa S. J., El-Kholy A. A. Comparative study of distribution and biochemical characterization of brain calcitonin gene-related peptide receptors in five different species. *Neuroscience* 54(2): 513-519, 1993a.

Wimalawansa S. J., Gunasekera R. D., Zhang F. Isolation, purification, and characterization of calcitonin gene-related peptide receptor. *Peptides* 14: 691-699, 1993b.

Wimalawansa S. J. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit. Rev. Neurobiol.* 11(2&3): 167-239, 1997.

Zaidi M., Bevis P. J. R., Girgis S. I., Lynch C., Stevenson J. C., MacIntyre I. Circulating CGRP comes from the perivascular nerves. *Eur. J. Pharmacol.* 117: 283-284, 1985.

Zaidi M., Moonga B. S., Bevis P. J. R., Bascal Z. A., Breimer L. H. The calcitonin gene peptides: biology and clinical relevance. *Crit. Rev. Cl. Lab. Sci.* 28(2): 109-174, 1990.