

Université de Sherbrooke

**Effets des acides époxyeicosatriénoïques sur les muscles lisses des
voies respiratoires**

par

Catherine Benoit

Département de Physiologie et de Biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)

en Physiologie (Biophysique)



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-80562-X

Canada

Résumé

Les études de la signalisation lipidique au niveau des voies respiratoires ont démontré l'importance des prostaglandines et des leucotriènes dans des situations physiopathologiques, mais peu d'étude ont tenté de révéler l'importance des produits du CYP450 époxygénase dans les situations physiologiques normales. Les régioisomères de l'acide époxyeicosatriénoïque (EETs) sont dérivés de l'acide arachidonique par l'action du cytochrome P450 époxygénase dans les cellules épithéliales. Leurs effets bronchorelaxants s'opposeraient aux effets bronchoconstricteurs de certaines prostaglandines et des leucotriènes. Le but de cette étude est de vérifier les effets du 8,9- et du 14,15-EET sur la tension, le potentiel de membrane et les canaux K_{Ca} des muscles lisses respiratoires. Trois techniques ont été utilisées : mesures de tension mécanique dans des bains d'organes isolés, microélectrodes sur des fragments de tissus et enregistrements de canaux unitaires en bicouches lipidiques planes. Les deux EETs [10 μ M] relaxent respectivement de 42% et 80% les trachées et les bronches de cobayes précontractées à la carbamylcholine (0.2 μ M). De plus, à une concentration de 3 μ M ils induisent des hyperpolarisations du potentiel de membrane -13 et -16 mV, respectivement. De plus, ces deux isomères ont un effet activateur partiel des canaux K_{Ca} des cellules musculaires lisses de trachée de bœuf. En présence d'une faible concentration intracellulaire Ca^{2+} les EETs induisent une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux K_{Ca} d'un facteur 4, sans affecter l'amplitude des courants ni la conductance unitaire. Cette activation des canaux K_{Ca} de grande conductance contribuerait à l'hyperpolarisation des cellules et limiteraient l'entrée de Ca^{2+} en fermant les canaux Ca^{2+} sensibles au voltage ; ce faisant les EETs induiraient la relaxation des muscles lisses respiratoires. Bien qu'au niveau du tractus respiratoire, les EETs puissent agir sur d'autres canaux ou mécanismes biochimiques, leurs effets électrophysiologiques suggèrent qu'ils puissent

être considérés comme des "EpDHF" (Epithelium-Derived Hyperpolarizing Factor). En effet, les EETs provoquent une hyperpolarisation indépendante de la voie métabolique de la NO synthase ou de la cycloxygénase des MLVRs en agissant directement sur les canaux K_{Ca} . Les EETs par leurs effets hyperpolarisants, également observés en présence de L-NAME et d'indométhacine, pourraient participer au contrôle du tonus des MLVRs.

À tous ceux que j'aime...

Table des matières

Résumé.....	
Table des matières.....	VI
Liste des figures.....	VIII
Liste des symboles et abréviations.....	XI
1. Introduction.....	1
1.1. La contraction du muscle lisse des voies respiratoires.....	1
1.2. Canaux potassiques calcium dépendant.....	12
1.3. Rôle de l'épithélium dans la modulation des muscles lisses des voies respiratoires.....	22
1.4. Cascades métaboliques de l'acide arachidonique et production des acides époxyeicosatriénoïques.....	28
1.5. Contexte et objectifs spécifiques de l'étude.....	34
2. Matériel et méthodes.....	36
2.1 Technique en bain d'organes isolés.....	36
2.1.1 Sensibilisation des animaux.....	36
2.1.2 Préparation des fragments de bronches et de trachées de cobayes...	36
2.1.3 Mesures de tensions musculaires isométriques.....	37
2.1.4 Analyses statistiques.....	38
2.2 Technique de microélectrodes.....	40
2.2.1 Préparation des trachées de lapins.....	40
2.2.2 Mesure des potentiels de membrane.....	41
2.2.3 Préparation des agents pharmacologiques.....	41
2.2.4 Analyse des résultats et statistiques.....	42
2.3 Analyse par immunobuvardage "Western Blot".....	44
2.4 Reconstitution des canaux potassiques.....	45
2.4.1 Préparation des fractions microsomales de trachées de bœuf.....	45
2.4.2 Reconstitution membranaire.....	47
2.4.3 Analyse des courants potassiques.....	51
2.4.4 Pharmacologie.....	52

3. Résultats	54
3.1. Mesures de tensions isométriques.....	54
3.1.2 Comparaison des résultats obtenus sur les trachées et les bronches d'animaux sains et sensibilisés.....	57
3.1.3 Effet de l'IbTX sur la relaxation induite par les EETs sur des trachées et bronches d'animaux sains et d'animaux sensibilisés	62
3.1.4 Effet concentration-réponse du 8,9- et 14,15-EET sur la relaxation des trachées et des bronches de cobayes saines et sensibilisées.....	65
3.2 Mesures du potentiel de membrane	71
3.2.1 Effet du 8,9- et du 14,15-EET sur le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses de trachées de lapins.....	71
3.2.3 Effet de l'IbTX sur l'hyperpolarisation induite par les EETs.....	74
3.2.4 Effets d'inhibiteurs de NOS et COX sur hyperpolarisation induite par les EETs.....	77
3.3 Résultat des expériences d'immunobuvardage	80
3.4 Reconstitution des canaux dans des bicouches lipidiques planes.....	83
3.4.1 Canaux potassiques de grande conductance dépendant du calcium. 83	
3.4.2 Caractérisation des canaux K_{Ca}	84
3.4.3 Effets pharmacologiques du 8,9-EET sur les canaux K_{Ca}	92
3.4.4 Les activations induites par les EETs sont bloquées par l'IbTX.....	98
4. Discussion.....	101
4.1. Effets des EETs sur les MLVRs.....	101
4.2 Implication des canaux K_{Ca} dans les phénomènes de relaxation et d'hyperpolarisation des MLVRs induits par les 8,9- et 14,15-EETs.....	107
4.3 Effets directs des EETs sur les canaux K_{Ca}	115
4.4 Mécanismes d'action des EETs sur les MLVRs : effet EpDHF ?	116
5. Conclusions	123
Remerciements.....	125
Bibliographie.....	126

Liste des figures

Figure 1 :	Stimulation muscarinique des MLVRs par les récepteurs M2 et M3.	5
Figure 2 :	Mécanisme de production de l'inositol 1,4,5-triphosphate et du diacylglycérol à partir du phosphatidylinositol. (D'après Voet et Voet, (1990))...	8
Figure 3 :	Schéma de l'augmentation du calcium intracellulaire suite à une stimulation muscarinique. (D'après Ehlert et al., (1997)).....	9
Figure 4 :	Schéma des éléments contractiles des MLVRs impliqués dans la régulation de la contraction. (D'après Gerthoffer, (1991)).....	11
Figure 5 :	Représentation de la sous-unité α avec les boucles intra et extracellulaires selon Meera et al. (1997).....	14
Figure 6 :	Les étincelles calciques ("sparks") activent les canaux K_{Ca} de grande conductance dépendants du Ca^{2+} dans les muscles lisses vasculaires d'artères cérébrales.....	19
Figure 7 :	Composition histologique de la paroi de la trachée.....	23
Figure 8 :	Schéma des différentes voies métaboliques de l'acide arachidonique....	30
Figure 9 :	Formules moléculaires des quatre régioisomères de l'acide époxyeicosatriénoïque.....	31
Figure 10 :	Schéma du montage expérimental utilisé pour les mesures de tension isométriques.....	39
Figure 11 :	Schéma de la chambre expérimentale utilisée pour les mesures de potentiel de membrane.....	43
Figure 12 :	Schéma résumant les étapes de préparation de la fraction microsomale brute utilisée pour les expériences de reconstitutions membranaires.....	46
Figure 13 :	Formules moléculaires des têtes de phospholipides utilisés pour faire les bicouches lipidiques planes.....	48

Figure 14 : Schéma du montage expérimental utilisé pour les reconstitutions membranaires.....	50
Figure 15 : Effets des quatre EETs en fonction de leurs concentrations sur la relaxation des MLVRs de cobayes.	55
Figure 16 : Effets du 8,9- et du 14,15-EET sur des trachées et des bronches de cobayes normaux (contrôle).	58
Figure 17 : Effets du 8,9- et du 14,15-EET sur des trachées et des bronches de cobayes sensibilisés.	60
Figure 18 : Effet relaxant du 8,9- et du 14,15-EET sur des muscles lisses respiratoires précontractés de cobayes.	63
Figure 19 : Effet d'un prétraitement à l'IbTX sur la relaxation induite par les EETs sur des muscles lisses respiratoires de cobayes normaux ou sensibilisés.....	66
Figure 20 : Effets du 8,9- et du 14,15-EET en fonction de la concentration sur la relaxation des trachées et des bronches de cobayes normaux et sensibilisés.	68
Figure 21 : Courbe concentration-réponse du 8,9- et 14,15-EET sur le potentiel de membrane de cellules du MLVR en absence d'épithélium.....	72
Figure 22 : Valeurs moyennes du potentiel de membrane suite à l'application d'IbTX seule, avant et après l'application de 8,9- et de 14,15-EET.	75
Figure 23 : Hyperpolarisations produites par les EETs en présence de L-NAME et d'indométhacine.....	78
Figure 24 : Profil protéique de fractions microsomales sur un gel SDS 10% et un immunobuvardage faits avec des anticorps contre les canaux K_{Ca}	81
Figure 25 : Courbe I/V moyenne des canaux K_{Ca} reconstitués en BLP à partir de fractions microsomales.....	85
Figure 26 : Variation de l'activité des canaux K_{Ca} reconstitués en BLP en fonction du voltage.	87

Figure 27 : Représentation de la sensibilité à la $[Ca^{2+}]_{\text{cytoplasmique}}$ libre des canaux K_{Ca} de grande conductance des MLVRs de trachées de bœufs.....	90
Figure 28 : Effet concentration dépendant du 8,9-EET sur l'activité des canaux K_{Ca} , leur P_o et l'amplitude des courants.	93
Figure 29 : Effet concentration dépendant du 14,15-EET sur l'activité des canaux K_{Ca} , leur P_o et l'amplitude des courants.	96
Figure 30 : IbTX bloque les canaux K_{Ca} activés par le 8,9- et le 14,15-EET.	99
Figure 31 : Schéma récapitulatif des hypothèses de l'action des EETs sur le MLVR.	118

Liste des symboles et abréviations

AA	acide arachidonique
AC	adénylate cyclase
Ach	acétylcholine
AMP _c	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ADN _c	adénosine déoxyribonucléique complémentaire
ATP	adénosine 5'-triphosphate
BLP	Bicouches Lipidiques Planes
CaM kinase II	protéine kinase de type II, dépendante de la calmoduline
CCh	Chlorure de Carbamyl Choline
ChTX	Charybdotoxine
COX	cyclooxygénase
CYP450	Cytochrome P450
DAG	diacylglycérol
DHET	acide dihydroeicosatriénoïque
DTT	DL-Dithiotréitol
EDHF	“Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor”
EDRF	“Endothelium-Derived Relaxing Factor”
EET	acide époxyeicosatriénoïque
EGTA	ethyleneglycol-bis-(β-amino-ethyl-ether)
	N,N'-tetraacetic acid
EpDHF	“Epithelium-Derived Hyperpolarizing Factor”
EpDRF	“Epithelium-Derived relaxing Factor”
E _x	potentiel d'équilibre pour un ion <i>x</i>
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

HETE	acide hydroxyeicosatetraenoïque
IbTX	Ibériotoxine
InsP ₃	inositol 1,4,5- triphosphate
K _{Ca}	canaux K ⁺ activés par le Ca ²⁺
LT	leucotriène
MLCK	kinase des chaînes légères de la myosine
MLCP	phosphatase des chaînes légères de la myosine
MLV	muscle lisse vasculaire
MLVR	muscle lisse des voies respiratoires
NO	oxyde nitrique
NOS	oxyde nitrique synthase
PIPES	piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PG	prostaglandine
PKA	protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase dépendante du GMPc
PLC-β	phospholipase C de type β
Po	probabilité d'ouverture
PS	phosphatidylsérine
PTX	toxine de Pertussis
RE	réticulum endoplasmique
ROC	“Receptor-Operated Channel”
SDS	sodium dodecylsulfate

TEA	tetraéthylammonium
Tris	Trizma base, [tris-(hydroxymethyl)-aminomethane]
Txs	thromboxanes
VOC	“Voltage-Operated Channel”

1. Introduction

1.1. La contraction du muscle lisse des voies respiratoires

La physiologie des muscles lisses et striés est semblable puisque les muscles striés sont une forme plus évoluée de muscles lisses. Ainsi ces types de muscles possèdent des caractéristiques similaires telles que l'utilisation de l'ATP pour effectuer leur contraction. Mais les muscles lisses des voies respiratoires (MLVRs) possèdent une caractéristique différente importante : les muscles lisses des voies respiratoires atteignent la plus grande partie de leur raccourcissement isotonique dans les 3 premières secondes de la contraction du muscle qui dure 10 secondes. En fait, 75% du rétrécissement est complété 1.5 secondes après le début de la contraction, 90% est complété après 3 secondes et le rétrécissement maximal atteint une phase de plateau stable 8.5 secondes après le début de la contraction qui dure 10 secondes. Ces 3 premières secondes de la contraction sont donc très importantes dans la physiologie des MLVRs. Le tonus des MLVRs contrôle le diamètre des voies respiratoires responsable du flux d'air dans les poumons et par conséquent de la quantité d'air dans les alvéoles. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la détermination de la tonicité et par conséquent, du diamètre des voies respiratoires tels que la viscosité des sécrétions des muqueuses ainsi que le système vasculaire des voies respiratoires (Barnes et Woolcock, 1998). Le tonus des muscles lisses des voies respiratoires est contrôlé par plusieurs facteurs bronchodilatateurs et bronchoconstricteurs. En effet, ces facteurs régulant le tonus des muscles sont l'histamine, l'acétylcholine (Ach), l'oxyde nitrique (NO) et plusieurs neuropeptides tels que le VIP, le CGRP et le NPY (Barnes et Woolcock, 1998; Douglas, 1990; Leff, 1988).

Couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction des muscles lisses est contrôlé par des mécanismes pharmacomécaniques et par des facteurs électrophysiologiques (Somlyo et Somlyo, 1994). Le couplage électromécanique dans les muscles lisses s'effectue via des changements de conductance ionique de la membrane sarcolemmale et par des variations de potentiel de membrane qui y sont associées. Ces changements de potentiel ont un effet sur la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre. Le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses des voies respiratoires est environ -60 mV. Lorsqu'une stimulation induit une dépolarisation du potentiel de membrane les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, présents sur la membrane cellulaire, s'ouvrent et les ions Ca^{2+} entrent dans la cellule. La concentration cytoplasmique de Ca^{2+} augmente et il y a déclenchement d'une contraction du muscle lisse (Johannsson et Wohlfart, 1980 ; Somlyo et Himpens, 1989). En plus de l'entrée de Ca^{2+} par les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants il y a une relâche supplémentaire de calcium par le réticulum sarcoplasmique. Cette relâche de calcium par le réticulum sarcoplasmique est induite par les ions Ca^{2+} qui activent les récepteurs à la ryanodine situés sur le réticulum sarcoplasmique (Somlyo et Somlyo, 1994). La membrane plasmique des cellules des muscles lisses contient plusieurs types de canaux ioniques dont les propriétés et la distribution varient d'un tissu à l'autre contribuant à la diversité des muscles. Certains de ces canaux ioniques sont activés par le potentiel de membrane (voltage-dépendant), d'autres sont activés par l'action directe d'hormones ou de neurotransmetteurs ou ils sont activés par les seconds messagers produits suite à la liaison de différents agonistes sur leur récepteur spécifique (McDonald et al. , 1994). Ainsi le Ca^{2+} libéré par le réticulum sarcoplasmique peut activer des canaux potassique Ca^{2+} dépendant

(K_{Ca}) et des canaux chlore (Cl^-) (Amedee et al., 1990; Janssen, 1996). Étant donné que dans les muscles lisses le potentiel d'équilibre des ions K^+ est plus négatif que le potentiel de membrane et que celui des ions Cl^- est plus positif, les actions électrophysiologiques des différents agonistes vont varier selon les types de courants activés (Somlyo et Somlyo, 1994). Puisque l'activation des canaux K_{Ca} résulte en une hyperpolarisation du potentiel de membrane et l'activation des canaux Cl^- résulte en une dépolarisation du potentiel de membrane. De plus, l'activation des canaux K_{Ca} provoque une hyperpolarisation qui cause une diminution des courants calciques (I_{Ca}), notamment par la fermeture de canaux Ca^{2+} ; il en résulte donc une diminution de l'entrée d'ions Ca^{2+} dans la cellule et conséquemment la relaxation.

Modulation des canaux par des métabolites des phospholipides

Un exemple de métabolites bioactifs capables d'agir sur les canaux ioniques est l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est libéré par l'action de la phospholipase A_2 sur les phospholipides membranaires et il peut moduler les canaux K_{Ca} (Petrou et al., 1994; Shimada et Somlyo, 1992) et inhiber le courant entrant de Ca^{2+} à travers les canaux Ca^{2+} voltage-dépendant (Shimada et Somlyo, 1992).

Les canaux activés par les ligands, "ROC", sont directement régulés par les agonistes mais sont non-sélectifs, c'est-à-dire qu'en conditions physiologiques plusieurs types d'ions majoritairement les ions Na^+ peuvent les traverser. Les ions Ca^{2+} peuvent traverser ces canaux mais ce courant ionique ne semble pas contribuer

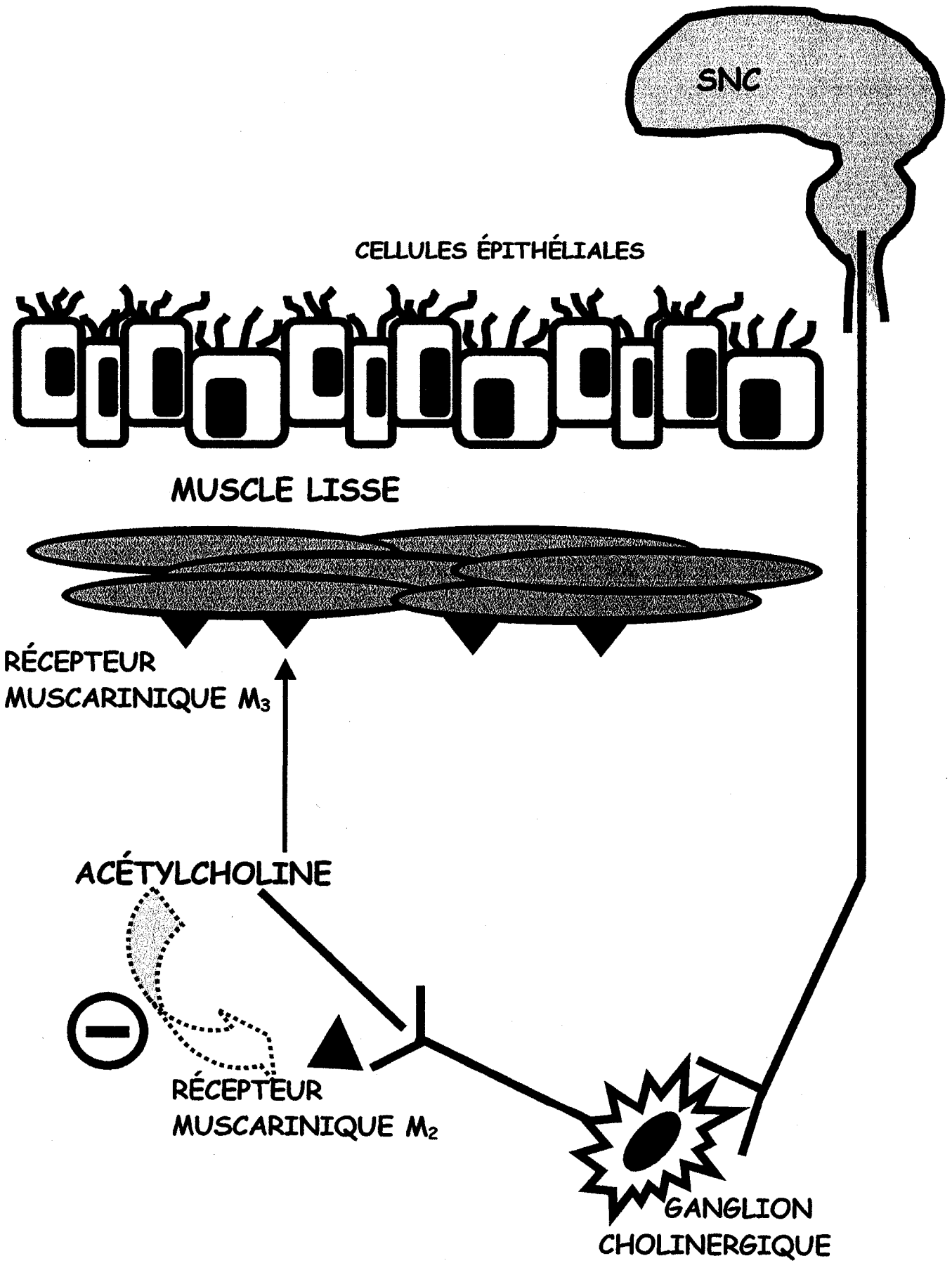
fortement au couplage excitation-contraction (Somlyo et Somlyo, 1994). Par contre, la dépolarisation induite par l'ouverture de ces canaux ligands-dépendants peut provoquer un influx significatif d'ions Ca^{2+} à travers les canaux Ca^{2+} voltage-dépendant (Somlyo et Somlyo, 1994).

Couplage pharmacomécanique

Le couplage pharmacomécanique s'effectue par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes de signalisation transmembranaires et intracellulaires qui peuvent changer la force produite dans le muscle sans affecter le potentiel de membrane des cellules musculaires. Le principal mécanisme par lequel s'effectue le couplage excitation-contraction pharmacomécanique est la relâche du calcium par inositol 1,4-5-triphosphate (InsP_3) produite par la cascade phosphatidylinositol et la modulation de la sensibilité au Ca^{2+} de la phosphorylation des chaînes légères de myosine (Somlyo et Somlyo, 1994). L'innervation dominante des voies respiratoires est médiée par les fibres parasympathiques acheminée par les nerfs vagues (Costello et al., 1998). L'activation de ces nerfs cholinergiques provoque la relâche de l'Ach qui se lie aux récepteurs muscariniques M_3 induisant une contraction du muscle lisse respiratoire (Roffel et al., 1990). Il existe aussi un autre type de récepteur muscarinique, le récepteur M_2 qui permet à l'Ach d'effectuer une boucle de rétroaction négative limitant sa relâche

Figure 1 : Stimulation muscarinique des MLVRs par les récepteurs M₂ et M₃.

L'Ach libérée par les nerfs vagues pulmonaires stimule les récepteurs M₃ des muscles lisses des voies respiratoires causant leur contraction en même temps les récepteurs M₂ situés sur les terminaisons des nerfs postganglionnaires. Cette stimulation des récepteurs M₂ tend à inhiber la relâche ultérieure d'Ach. (D'après Costello et al., (1998)).



ultérieure (Fig. 1). Le récepteur muscarinique M_2 situé sur les nerfs postganglionnaires cholinergiques, agit donc comme un autorécepteur (Costello et al., 1998; Fryer et Maclagan, 1983). La perte fonctionnelle de récepteur M_2 est observée chez certains personnes atteintes d'asthme et cette situation physiologique participerait à hyperréactivité vagale et la contraction soutenue des MLVRs (Costello et al., 1998).

L'augmentation puis la diminution de la concentration Ca^{2+} intracellulaire est le mécanisme principal qui initie la contraction puis la relaxation dans les muscles striés et lisses. Par contre, la contraction dans les muscles striés est initiée par la liaison du Ca^{2+} sur les filaments minces associés à la troponine C. Tandis que dans les muscles lisses le Ca^{2+} se lie à la calmoduline et il y a une association entre le complexe calcium-calmoduline avec la sous-unité catalytique de la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). Cette association active la protéine kinase qui phosphoryle le résidu sérine à la position 19 de la chaîne légère de myosine qui a un poids moléculaire de 20 kDa (Hartshorne et al., 1989). La phosphorylation de la Ser 19 de la chaîne légère de myosine permet l'activation de la myosine ATPase par l'actine et la contraction du muscle lisse (Hartshorne et al., 1989; Sweeney et al., 1994). Et une diminution de la concentration de Ca^{2+} inactive la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK) et il y a déphosphorylation de la chaîne légère de myosine par la phosphatase des chaînes légères de la myosine, ce qui entraîne la désactivation de la myosine ATPase et le muscle se relaxe (Driska et al., 1986; Gong et al., 1992; Okubo et al., 1993).

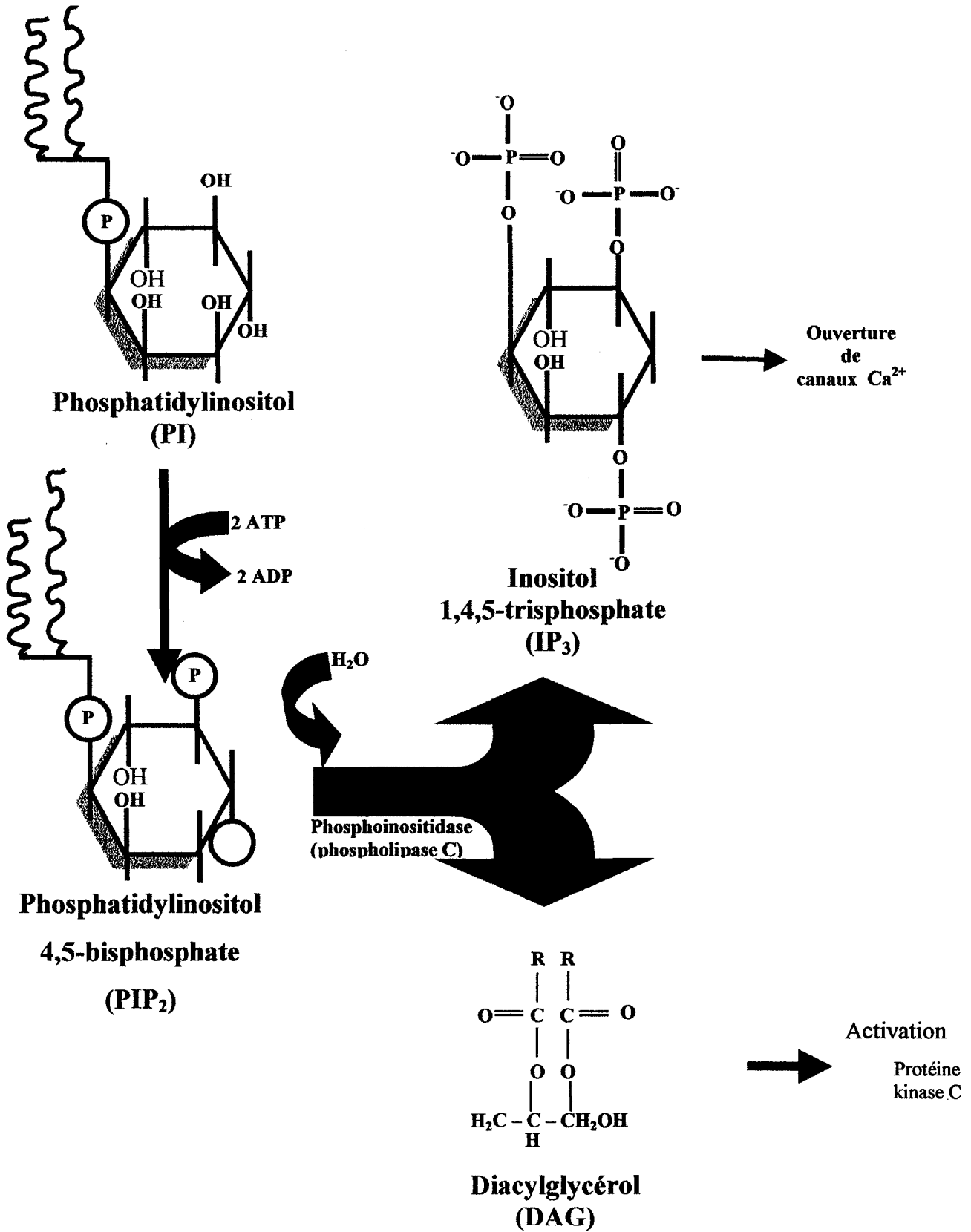


Figure 2 : Mécanisme de production de l'inositol 1,4,5-triphosphate et du diacylglycérol à partir du phosphatidylinositol. (D'après Voet et Voet, (1990))

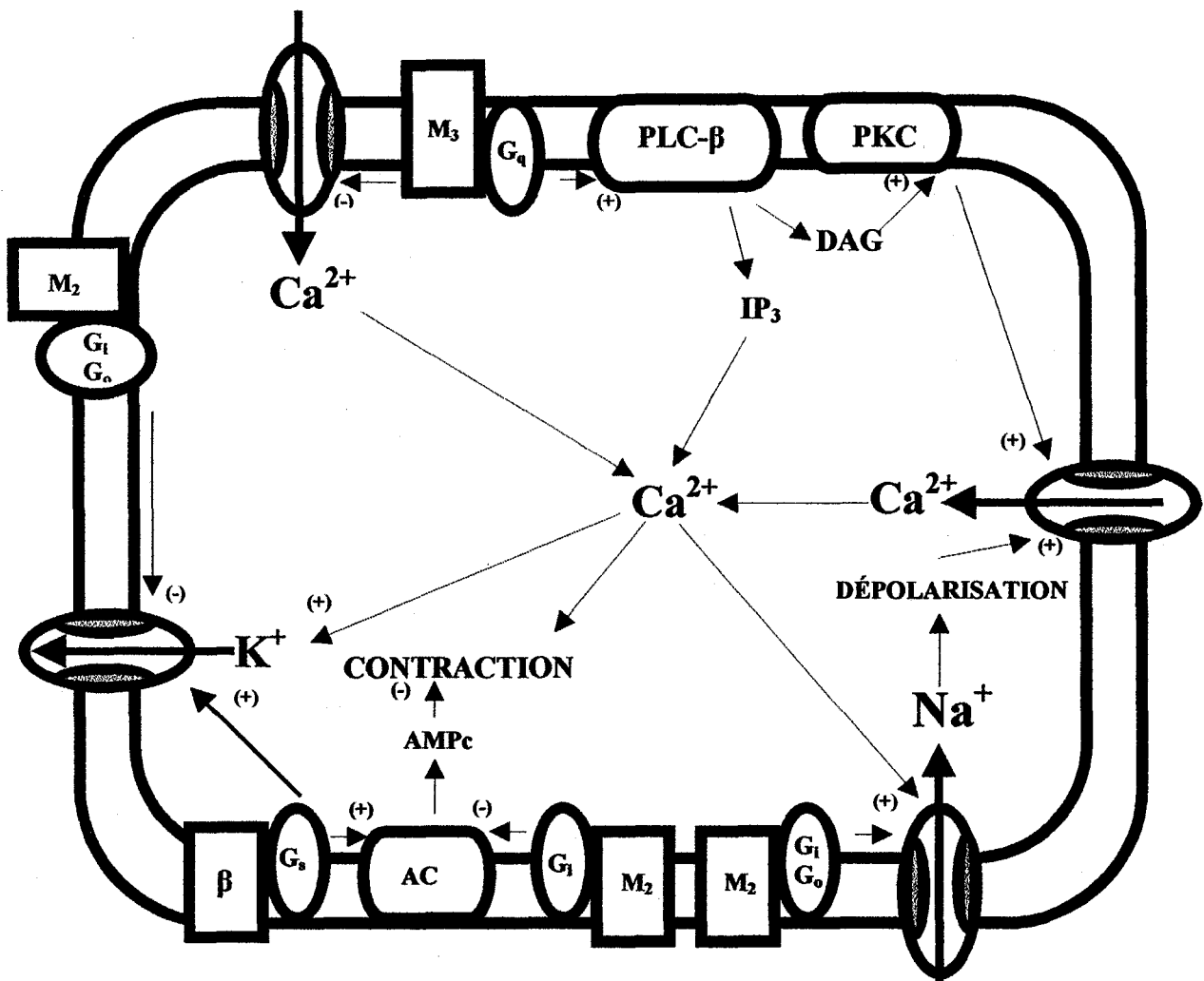


Figure 3 : Schéma de l'augmentation du calcium intracellulaire suite à une stimulation muscarinique. (D'après Ehlert et al., (1997))

Le couplage pharmacomécanique s'effectue via un mécanisme de signalisation cellulaire sans modifier initialement le potentiel de membrane des cellules (Somlyo et Somlyo, 1994). Ce mécanisme de couplage passe par la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP₃) produite par la cascade du phosphatidylinositol par une relâche du Ca²⁺ via les récepteurs à l'InsP₃ et la modulation de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine sensible au Ca²⁺. Lorsque le récepteur muscarinique est activé, il y a activation d'une protéine G de la famille G_q. Cette protéine G_q va activer la phospholipase C-β (PLC-β) qui amènera la production de l'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP₃) et du DAG à partir du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) de la membrane sarcolemmale (Fig. 2) (Grandordy et al., 1986; Meurs et al., 1989; Robertson et al., 1988). La concentration myoplasmique de Ca²⁺ sera augmentée transitoirement suite à l'activation des canaux Ca²⁺ du réticulum endoplasmique (RE) par l'InsP₃ (Fig. 3) (Hashimoto et al., 1986). Le diacylglycérol (DAG) produit par la cascade du PIP₂ activera une protéine kinase C (PKC) responsable de la phosphorylation de phosphatases responsables de la déphosphorylation des chaînes légères de myosine et conséquemment de la rétroaction négative. Par contre, la phosphorylation par la PKC inhibe les phosphatases et favorise la contraction du muscle lisse.

Le mécanisme de contraction des muscles striés utilise fondamentalement les mêmes bases ultrastructurelle et biochimique que celui des muscles lisses. La figure 4 représente schématiquement le mécanisme de contraction des muscles lisses. Le muscle lisse comme le muscle strié possède de la myosine composée de deux chaînes

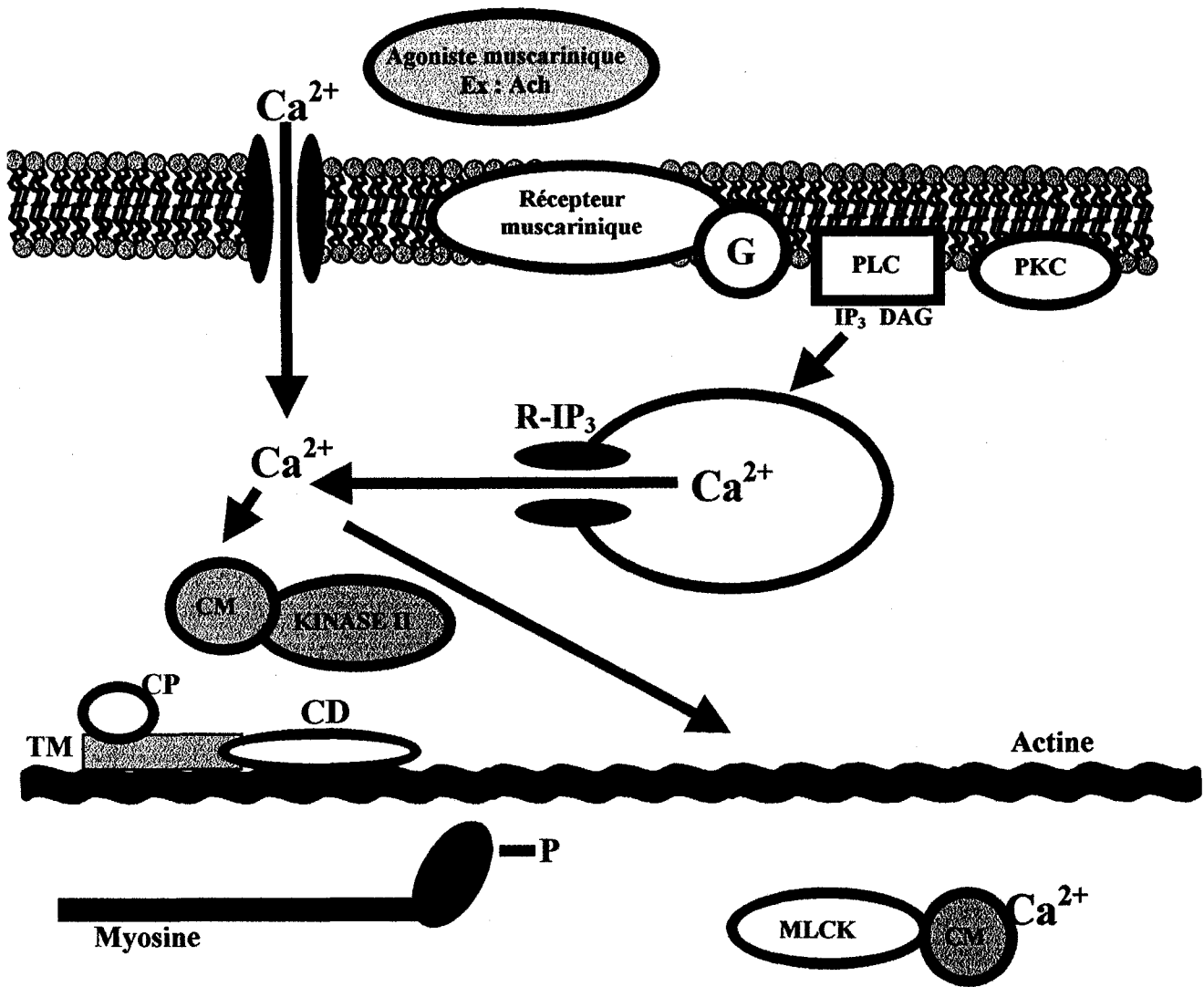


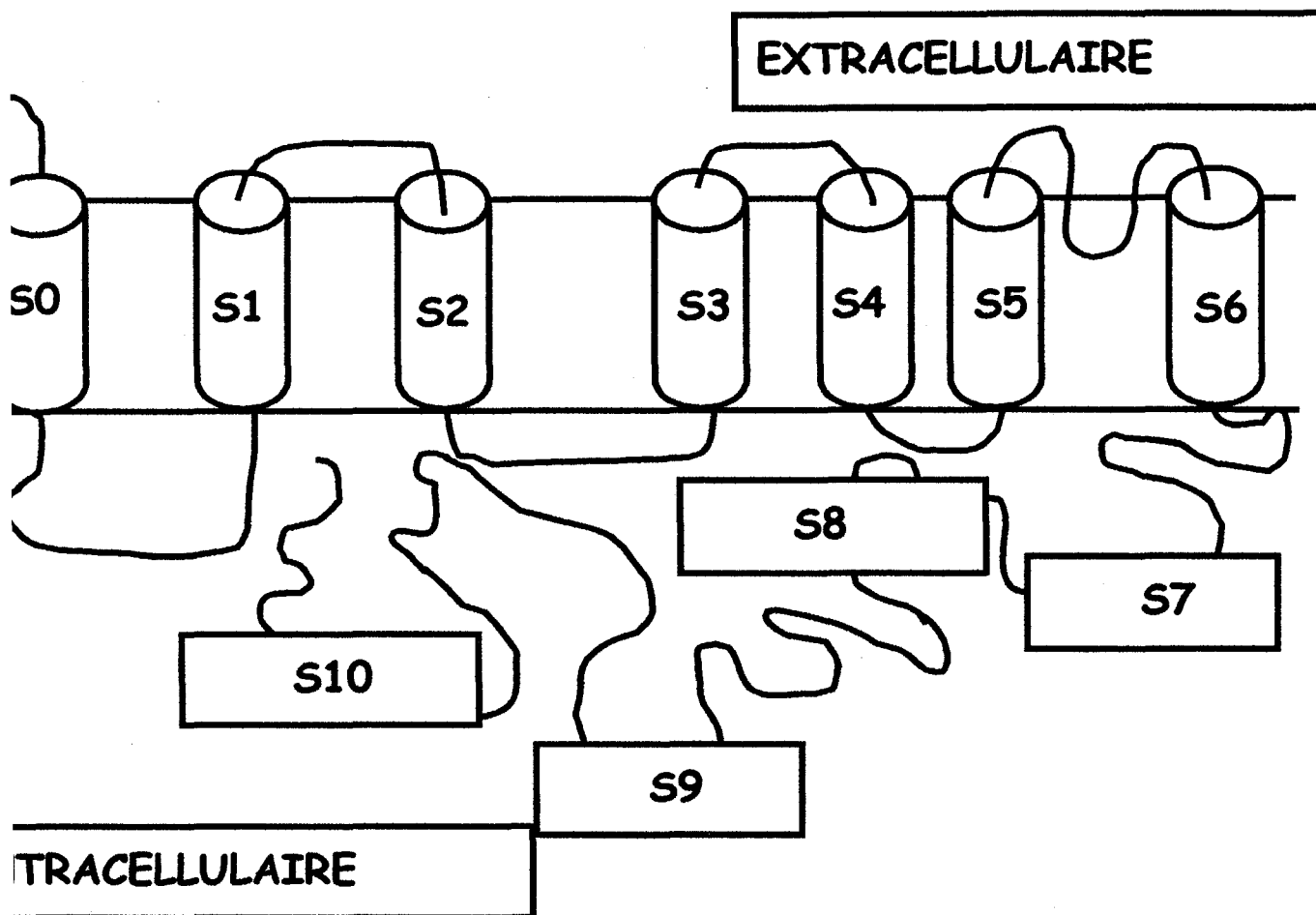
Figure 4 : Schéma des éléments contractiles des MLVRs impliqués dans la régulation de la contraction. (D'après Gerthoffer, (1991))

lourdes et quatre chaînes légères. Tout comme dans le muscle strié le glissement des myofilaments relève de l'interaction entre l'actine et la myosine (Fig. 4). De plus, dans ces deux types musculaires la contraction est provoquée par une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire. Et finalement, le glissement des filaments entre eux s'effectue grâce à l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire (Somlyo et Somlyo, 1994).

1.2. Canaux potassiques calcium dépendant

Les canaux potassiques sont importants dans la modulation et le recouvrement du potentiel de membrane des cellules des muscles lisses respiratoires après la dépolarisation. De plus, la densité des canaux potassiques est très élevée dans les muscles lisses et conséquemment l'ouverture des canaux potassiques augmente la conductance membranaire des ions K^+ , ce qui tend à rapprocher le potentiel de membrane du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ (-85 mV) et donc, favorise la bronchodilatation. Au niveau des MLVRs les canaux potassiques les plus importants en densité ont les canaux potassiques calcium dépendant de grande conductance BK_{Ca} (Barnes, 1998; McCann et Welsh, 1986). En plus, de leur rôle dans les muscles lisses (Nelson et Quayle, 1995), les canaux potassiques BK_{Ca} possèdent plusieurs rôles dans la physiologie tels que dans la sécrétion cellulaire (Lingle et al., 1996) et dans l'excitabilité des neurones (Robitaille et al., 1993)). Les canaux K_{Ca} sont des canaux sensibles à la concentration de calcium intracellulaire et au voltage. Ce type de canal possède aussi une grande conductance soit 150 – 350 pS en conditions symétrique 150 mM KCl (Moss et Moczydlowski, 1996).

Les canaux K_{Ca} sont des hétéromultimères. En effet, un canal est composé de quatre sous-unités α et de quatre sous-unités β (Kaczorowski et al., 1996). Grâce à des études d'immunoprécipitation, Knauss et al. (1994) ont démontré que les sous-unités α et β se complexaient à l'aide de nombreux liens non-covalents. Le canal potassique K_{Ca} a été tout d'abord purifié et cloné (dSlo) chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Adelman et al., 1992; Atkinson et al., 1991) puis chez diverses espèces mammifères dont les humains (Butler et al., 1993; Dworetzky et al., 1994; Garcia-Calvo et al., 1994; McCobb et al., 1995; Pallanck et Ganetzky, 1994; Tseng-Crank et al., 1994; Wallner et al., 1995). La sous-unité α est une protéine codée par le gène Slo (Atkinson et al., 1991; Butler et al., 1993; Tseng-Crank et al., 1994). Cette protéine comprends selon les auteurs 6 ou 7 segments transmembranaires (S1 - S6 ou S0 - S6). Les différents segments de la sous-unité α possèdent différents rôles dans la structure et la régulation du canal. La partie située entre les segments S0 et S1 serait intracellulaire. La région entre le segment S1 et S2 serait extracellulaire. Le segment transmembranaire S4 serait très important pour le fonctionnement du canal puisque ce segment possède des charges positives qui lui conféreraient son rôle de senseur de voltage (Meera et al., 1994; Wallner et al., 1995). Des mutations dans les charges positives de cette région entraînent un changement dans la capacité à percevoir les changements de voltage (Diaz et al., 1998; Meera et al., 1994). Certains auteurs stipulent que le segment transmembranaire S3 posséderait aussi des charges lui permettant d'être un senseur de voltage. Les segments transmembranaires S5, S6 et la boucle qui les réunit forment le pore canal (Meera et al., 1994). La partie C-terminale de la protéine comprend quatre régions transmembranaires plus ou moins hydrophobes (S7, S8, S9 S10). Ces segments représentent les deux tiers de la séquence primaire



<i>TISSUS</i>	<i>Sous-unité α (x 4)</i>	<i>Sous-unité β</i>
Muscles lisses	α	β_1
Muscles squelettiques	α	—
Cerveau	α	β_4
Tissus fœtaux	α	β_1
		β_2

* *McManus, D.O., Toro, L.*

Figure 5 : Représentation de la sous-unité α avec les boucles intra et extracellulaires selon Meera et al. (1997), B : distribution tissulaire des sous-unités α et β du canal K_{Ca} des mammifères.

(Dworetzky et al., 1994; Garcia-Calvo et al., 1994). Lorsque la sous-unité α , seule, du canal K_{Ca} est exprimée dans des oocytes de *Xenopus* il y a la formation d'un canal. Le dernier tiers de la protéine comprend les régions hydrophobes S9 et S10. Cette partie est la plus conservée à travers les espèces animales. Il y aurait une série de charges négatives juste avant le segment S10 qui serait responsable de la sensibilité au Ca^{2+} (Meera et al., 1994; Wei et al., 1994). Ce site de liaison au Ca^{2+} situé entre les segments S9 et S10 forme le "calcium bowl" situé dans la partie C-terminale de la sous-unité α . Les segments S9 et S10 de la sous-unité α sont cytoplasmiques. Cette représentation des segments correspond à la figure 5 représentant la topologie du canal K_{Ca} telle que proposée par Meera *et al.* (1997). De plus, la séquence des acides aminés posséderait des sites de reconnaissance pour la phosphorylation à la PKA et plusieurs sites de phosphorylation par la PKC (Kaczorowski et al., 1996; Moss et Moczydlowski, 1996).

La présence de la sous-unité β contribue aux propriétés pharmacologiques du canal (McManus et al., 1995). En effet, les canaux K_{Ca} de grande conductance peuvent être formés par 2 sous-unités α seules ou par des sous-unités α et β ensembles possédant certaines propriétés des canaux K_{Ca} (Butler et al., 1993; Dworetzky et al., 1994; Wallner et al., 1995). Cependant, c'est seulement lorsque les deux sous-unités sont exprimées que le canal possède les propriétés biophysiques standard du canal (McManus et al., 1995). De plus les canaux sont plus sensibles au voltage et au Ca^{2+} lorsque les deux sous-unités sont produites que lorsque seulement la sous-unité α est exprimée. La sous-unité β participe donc à l'augmentation de la sensibilité du canal au voltage et à la $[Ca^{2+}]_{intracellulaire}$ libre ainsi qu'à la liaison de divers agents

pharmacologiques comme la ChTX et l'IbTX (Fanger et al., 1999; Wallner et al., 1995). La sous-unité β pourrait augmenter la sensibilité au Ca^{2+} en provoquant des changements dans la cinétique du canal comme produire des transformations allostériques de la protéine canal de manière à exposer des sites additionnels de liaison au Ca^{2+} . La sous-unité β est une glycoprotéine de 31 kDa qui possède deux segments transmembranaires, une boucle extracellulaire et deux petits domaines cytoplasmiques aux extrémités C- et N-terminales. Il y a deux sites de glycosylation sur le domaine extracellulaire et quatre résidus lysine potentiellement des sites de liaison à des agents pharmacologiques (Kaczorowski et al., 1996). Il y a aussi présence de site consensus de phosphorylation par la PKA sur la partie N-terminale cytoplasmique probablement impliquée dans la régulation des canaux K_{Ca} . Les segments transmembranaires de la sous-unité β s'associent de façon non-covalente aux sous-unités α dans une stoechiométrie de 1 : 1 (Knaus et al., 1994). La sous-unité β est située à proximité du pore formé par la sous-unité α . Ainsi les deux sous-unités, α et β , contribuent aux propriétés fonctionnelles du canal K_{Ca} et sont nécessaire pour observer le comportement caractéristique des canaux K_{Ca} dans les muscles lisses (Kaczorowski et al., 1996). Nimigean et Magleby, (1999) ont démontré qu'en présence de la sous-unité β la quantité d'événements ouverts du canal K_{Ca} augmente durant la période d'activité intense, cette augmentation était reflétée par une augmentation du nombre d'ouvertures des canaux et la durée moyenne des temps d'ouverture. Une des possibilités proposées par les auteurs pour ce mécanisme est un effet allostérique spécifique de la sous-unité β sur la sous-unité α qui faciliterait certains changements de conformation et en inhiberait d'autres.

Régulation des canaux K_{Ca}

Les canaux potassiques sont régulés par plusieurs mécanismes physiologiques : les changements de voltage aux bornes de la membrane, la concentration sous-membranaire de Ca^{2+} libre, mais aussi par la phosphorylation du canal (Brayden et Nelson, 1992; Peng et al., 1999; Robertson et al., 1993). La phosphorylation du canal cause son activation et se ferait par l'action d'une protéine kinase dépendante du GMPc (PKG). Cette phosphorylation pourrait se faire de deux manières soit par la phosphorylation directe du canal soit par l'activation indirecte d'une phosphatase dépendante de la PKG (Alioua et al., 1995). Le canal K_{Ca} peut aussi être activé par phosphorylation via une PKA (Kume et al., 1989). Inversement, l'activité du canal K_{Ca} est inhibée par une déphosphorylation médiée par une protéine G_i sensible à la toxine de Pertussis (PTX). Cette protéine G_i serait activée par la stimulation muscarinique (Kume et Kotlikoff, 1991). L'inhibition des canaux via la protéine G_i serait impliquée lors de la contraction tonique des muscles lisses (Kotlikoff et al., 1992).

Ainsi par l'intermédiaire de ses mécanismes de régulation, les canaux K_{Ca} jouent un rôle important dans la régulation du potentiel de membrane. De cette façon, la probabilité d'ouverture des canaux K_{Ca} est faible au potentiel de repos des cellules musculaires lisses (environ -60 mV) mais elle tend à s'élever lorsque la membrane à se dépolarise (Brayden et Nelson, 1992; Peng et al., 1996; Robertson et al., 1993). Au niveau des muscles lisses, les canaux K_{Ca} agiraient donc comme une boucle de rétroaction négative sur le potentiel de membrane en augmentant la conductance potassique (K^+) et conséquemment, au contrôle de la relaxation des MLVRs, puisque

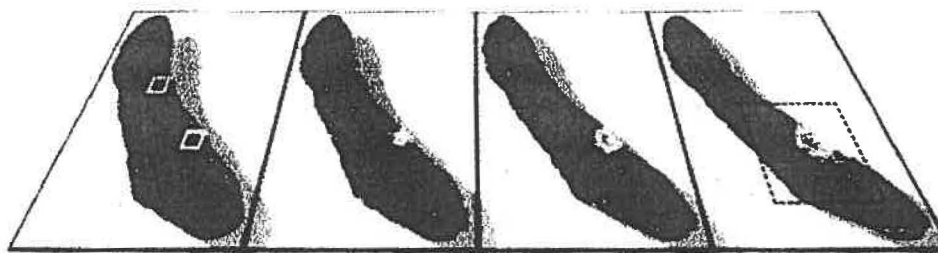
cette augmentation de conductance potassique provoquerait l'inactivation des canaux Ca^{2+} de la membrane de surface et la cellule.

Les MLVRs ont un rôle important dans le contrôle du calibre des voies respiratoires qui détermine la distribution de la ventilation des alvéoles. Lorsque ces muscles lisses sont contractés, il y a une augmentation de la résistance des voies respiratoires rendant difficile la respiration (diminution de la compliance pulmonaire) et diminuant le flux d'oxygène aux alvéoles. En favorisant l'hyperpolarisation et la relaxation des MLVRs, les canaux K_{Ca} jouent un rôle très important dans la microphysiologie respiratoire. Certaines études pharmacologiques ont tenté d'utiliser des ouvreurs de canaux K_{Ca} comme bronchodilateurs pour des fins thérapeutiques (Black et Barnes, 1990). Inversement, le bloqueur tétraéthylammonium (TEA) est un bronchoconstricteur très efficace des bronches humaines (Barnes, 1998). Les canaux K_{Ca} sont présents en grande quantité dans les MLVRs suggérant un rôle prédominant au niveau de ces tissus. Ces canaux peuvent s'ouvrir suite à une augmentation de l'AMPc, ou par un couplage direct avec une protéine G_s suite à l'activation des récepteurs β_2 (Kume et al., 1994). Ainsi les agonistes des récepteurs β_2 peuvent induire une bronchodilatation par un effet direct des canaux K_{Ca} aussi bien que par l'augmentation de l'AMPc. De plus, des expériences *in vitro* faites chez l'animal et chez l'humain montre que l'IbTX et la ChTX, deux bloqueurs spécifiques des canaux K_{Ca} , ont un effet inhibiteur sur la bronchodilatation induite par les β_2 -agonistes (Jones et al., 1994; Miura et al., 1992; Savaria et al., 1992).

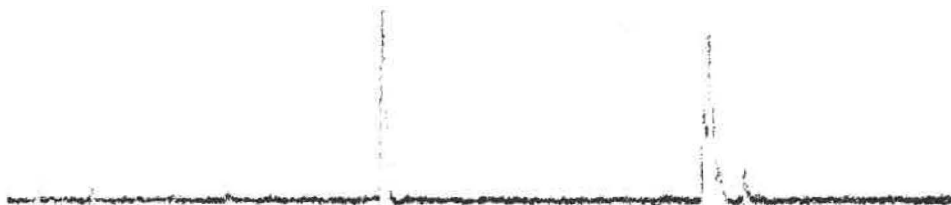
Figure 6 : Les étincelles calciques (“sparks”) activent les canaux K_{Ca} de grande conductance dépendants du Ca^{2+} dans les muscles lisses vasculaires d'artères cérébrales.

A : séquence originale (de gauche à droite) d'images prise en microscopie confocale de 2 dimensions obtenues toutes les 8.33 ms d'une cellule de muscle lisse d'artère cérébrale remplie de fluo 3 sensible au Ca^{2+} . Deux sites d'étincelles calciques ont été identifiés tels qu'indiqués par les boîtes verte et rouge (2.2 x 2.2 mm). Une étincelle calcique commence à la deuxième image dans la boîte rouge. B : courants K_{Ca} simultanés à une étincelle calcique à -40 mV, démontrant l'association temporelle. Les courants transmembranaires (trace bleue) sont indiqués au-dessus de la fluorescence moyenne (F/F_0) des boîtes rouge et verte indiquées en A. C : images de la région d'intérêt de l'image du haut (boîte pointillée) illustrant le déroulement temporel de l'augmentation, de la durée et de l'étendue de l'étincelle calcique. Tirée de Jaggar et al., (2000).

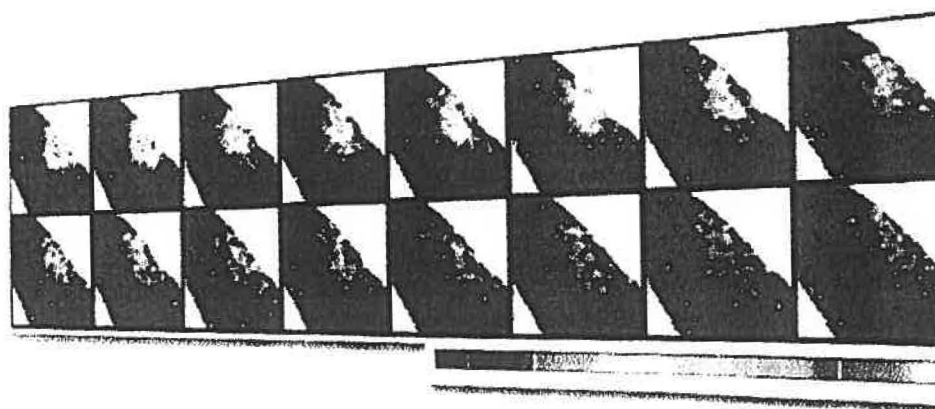
A



B



C



Lors d'une contraction des MLVRs causée par une stimulation muscarinique il y a une dépolarisation du potentiel de membrane de l'ordre de 15 à 20 mV et une augmentation transitoire de la concentration cytoplasmique de calcium libre sous la membrane de surface, la concentration de calcium atteint alors près de 1 μM (Kotlikoff et al., 1992). Cette augmentation sous-membranaire de Ca^{2+} est le résultat de plusieurs petites augmentations calciques localisées et transitoires. Ces petites augmentations de Ca^{2+} se nomment étincelles calciques et elles sont induites par la libération de Ca^{2+} suite à l'activation des récepteurs à l' IP_3 , sur le réticulum sarcoplasmique (Jaggar et al., 2000). L'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} provoque l'activation de canaux K_{Ca} et conséquemment la repolarisation des cellules. Cette diminution de potentiel de membrane entraîne une diminution de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} causée par l'inhibition des canaux VOC et conséquemment une relaxation musculaire.

Au niveau vasculaire, Nelson *et al.* (1995) ont proposé que ces étincelles calciques activent un certain nombre de canaux K_{Ca} situé à proximité de l'étincelle et ainsi provoquerait un courant K_{Ca} macroscopique. De plus, des mesures microspectrofluorométriques et électrophysiologiques effectuées simultanément appuieraient cette proposition (Mironneau et al., 1996; Perez et al., 1999; ZhuGe et al., 1998). La figure 6 tirée de Jaggar et al. (2000) montre l'activation des courants K_{Ca} par des étincelles calciques dans les cellules musculaires lisses des artères cérébrales. Ces expériences montrent que l'étincelle calcique augmente la probabilité d'ouverture des canaux K_{Ca} d'un facteur 10^6 et qu'une inhibition de l'étincelle calcique et des canaux K_{Ca} induit une dépolarisation des artères cérébrales provoquant une

augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} et une vasoconstriction. Les canaux K_{Ca} seraient régulés par les étincelles calciques. Bien qu'il ait été identifié au niveau des MLVs ce phénomène pourrait être présent au niveau des MLVRs.

1.3. Rôle de l'épithélium dans la modulation des muscles lisses des voies respiratoires

L'épithélium est essentiel dans la physiologie des MLVRs. L'épithélium respiratoire est cylindrique, pseudostratifié et cilié. L'épithélium de la muqueuse repose sur une membrane basale et une sous-muqueuse, une couche de tissu conjonctif contenant les glandes séromuqueuses qui contribuent à la production de mucus. L'épithélium est composé de trois types principaux de cellules : les cellules ciliées, les cellules sécrétrices et les cellules basales. Ensemble ces cellules forment une couche ciliée pseudostratifiée (Velden et Versnel, 1998).

Les cellules ciliées dérivent des cellules basales ou sécrétrices et ont pour principale fonction d'enlever les particules de matière entrant dans les voies respiratoires en propulsant le mucus chargé de poussière en direction du pharynx. Les cellules sécrétrices représentent 15 à 25% de l'épithélium et elles existent sous différentes formes. Les cellules à mucus sont les principales productrices de mucus respiratoire (Velden et Versnel, 1998). Les cellules Clara produisent en outre le surfactant qui contribue à l'efficacité des échanges gazeux. Ces cellules contiennent aussi des cytochromes P450 (CYP450), dont un certain enzyme du métabolisme de l'acide arachidonique (voir section 1.4) (Devereux et al., 1981). Les isoformes de

Figure 7 : Composition histologique de la paroi de la trachée.

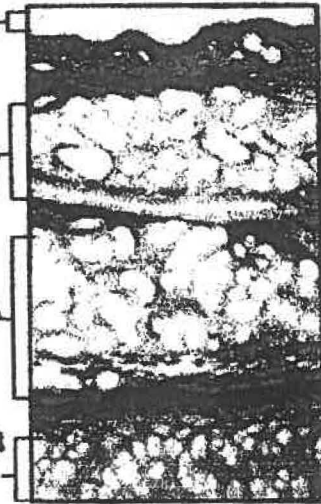
A) Photomicrographie d'une partie de la paroi de la trachée en coupe transversale (x 50). B) Photomicrographie d'une coupe transversale de l'épithélium cylindrique pseudostratifié cilié tapissant la trachée (x 430). (Tirée de Marieb É.N., 1993)

A)

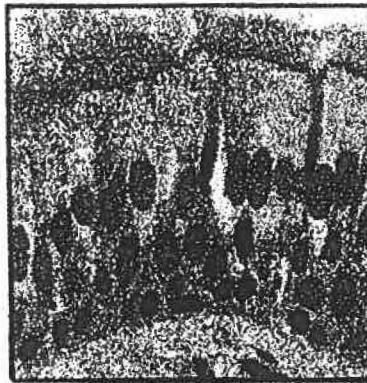
Épithélium cylindrique
pseudostratifié cilié

Glandes séromuqueuses
dans la sous-muqueuse

Cartilage hyalin de la
tunique moyenne

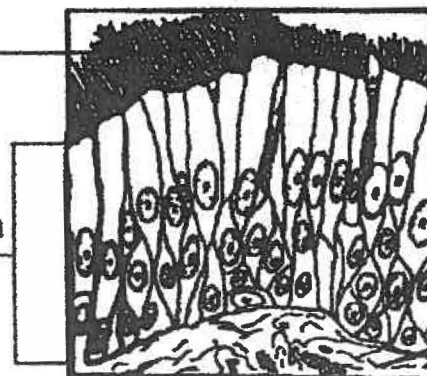


B)



Cils

Couche
d'épithélium
pseudo-
stratifié



Membrane
basale

Tissu
conjonctif

CYP450 responsables de la production d'EETs sont : CYP1A1, CYP4B1, CYP2B4 (Zeldin et al., 1996). Les cellules à mucus sont prédominantes dans les voies aériennes supérieures et les cellules de Clara sont prédominantes dans les bronchioles (Velden et Versnel, 1998). Les cellules basales sont de forme pyramidale avec un faible ratio cytoplasme/noyau et sont les cellules de base de l'épithélium (Velden et Versnel, 1998). La figure 5A représente une photomicrographie d'une partie de la paroi de la trachée en coupe transversale (x 50) et la figure 5B représente une coupe transversale de l'épithélium cylindrique pseudostratifié cilié tapissant la trachée (x 430) (Tirée de Marieb É.N., 1993).

L'épithélium respiratoire possède plusieurs rôles importants dans la physiologie respiratoire et lorsqu'il y a perte de l'une de ces fonctions, l'homéostasie respiratoire est dérégulée. Il y a donc apparition de pathologies respiratoires comme la fibrose kystique et l'asthme (Velden et Versnel, 1998). En effet, un de ces rôles est l'effet de barrière protectrice de l'épithélium respiratoire. L'épithélium fait parti du système immunitaire non-spécifique et protège les voies respiratoires contre l'entrée de substances nocives. Cette défense des voies respiratoires par l'épithélium est faite par l'intermédiaire du nettoyage des voies respiratoires par les cils des muqueuses et la sécrétion de médiateurs protecteurs (Velden et Versnel, 1998). Des biopsies des voies respiratoires effectuées chez des asthmatiques ont démontré que cette fonction de barrière est perdue parce que l'épithélium a perdu son intégrité (Laitinen et al., 1985). Cette perte d'épithélium fonctionnel serait causée par la libération de protéines toxiques (Major Basic Proteins, MBPs) par les eosinophiles activés (Agosti et al., 1987). Plusieurs liens ont été faits entre la perte d'épithélium fonctionnel et

l'hyperréactivité des voies respiratoires. Tout d'abord, des dommages à l'épithélium causent la perte de l'effet de barrière : les allergènes et les agents nocifs peuvent pénétrer les voies respiratoires et atteindre plus facilement la sous-muqueuse où ils peuvent induire des réactions inflammatoires sévères. Ensuite, il peut y avoir exposition des terminaisons nerveuses afférentes non-myélinisées résultant en une diminution de leur seuil d'activation et donc en une facilitation de leur stimulation par les agents inflammatoires. Puis, il peut y avoir une augmentation de l'hyperréactivité respiratoire car l'épithélium sécrète des substances qui diminuent la contraction du MLVR dont les prostaglandines E₂, les prostacyclines, l'oxyde nitrique (NO) et les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'épithélium (EpDHF); lorsqu'il y a perte de l'épithélium, il y a perte de cette production. Ensuite, la bronchoconstriction peut être augmentée parce que les cellules de l'épithélium contiennent des endopeptidases (NEP) qui sont impliquées dans le métabolisme de plusieurs substances possédant des effets contractiles. Finalement, l'hyperréactivité bronchique peut aussi être stimulée par la production et la relâche, par l'épithélium endommagé, de médiateurs comme les endothélines et les PGF_{2α} (Bertrand et Tschirhart, 1993; Velden et Versnel, 1998). De plus, il y aurait production de facteurs antimicrobiens par l'épithélium respiratoire ainsi lors d'une diminution de la densité de l'épithélium cette production antimicrobienne diminuerait ce qui entraînerait une hyperréactivité des tissus musculaires (McCray, Jr. et Bentley, 1997).

Modèle d'inflammation pulmonaire animal

Les modèles animaux sont très utiles en recherche puisqu'ils permettent d'établir certains parallèles entre la manifestation d'une maladie chez les humains et

chez les animaux. Chez le cobaye (modèle animal choisi) il est possible de reproduire des symptômes associés à l'asthme allergique qui sont observés dans la pathologie humaine. L'asthme allergique se manifeste lors d'une inhalation d'un allergène qui cause une bronchoconstriction immédiate causée en grande partie par le relâche de médiateurs spasmogènes des mastocytes bronchiques (Corrigan et Kay, 1991). Cette réaction immédiate nommée phase précoce de la réponse asthmatique apparaît environ une minute après l'exposition à l'allergène (Takeda et al., 1997) et est suivie par la manifestation de la phase retardée de la réponse asthmatique. De plus, l'asthme est souvent associé avec une hyperréactivité bronchique, C'est-à-dire que le tissu bronchique répond exagérément à l'exposition de substances exogènes (Velden et Versnel, 1998). De plus, la manifestation de l'asthme est associée avec une infiltration des éosinophiles et des cellules mononuclées dans les voies respiratoires (Corrigan et Kay, 1991).

L'utilisation d'un protocole de sensibilisation à l'ovalbumine pour provoquer l'asthme allergique chez les animaux permet la manifestation de ces symptômes reliés à cette pathologie respiratoire (Lawrence et al., 1998). Ce protocole de sensibilisation aigüe se déroule sur 21 jours est composé de plusieurs expositions à l'allergène (administrations i.p. d'ovalbumine) et se termine par l'exposition au même allergène (ovalbumine en aérosol). La particularité de ce protocole est la combinaison de l'allergène avec un adjuvant (hydroxyde d'aluminium) qui augmente le caractère antigénique de l'allergène. Les résultats obtenus avec ce protocole de sensibilisation sont hautement reproductibles (Lawrence et al., 1998).

De plus, la manifestation de cette pathologie respiratoire est souvent associée avec une diminution de l'intégrité de l'épithélium ce qui diminue l'effet protecteur de l'épithélium (Velden et Versnel, 1998) ainsi que la production des EpDHF, facteurs qui semblent être en partie responsables du maintien du tonus des MLVRs en les hyperpolarisants (Bertrand et Tschirhart, 1993). Liaw et al. (1999) ont démontré que la sensibilisation à l'ovalbumine des cobayes permet d'augmenter la perméabilité de l'épithélium et la réactivité du MLVR. Cette diminution de densité de l'épithélium respiratoire entraîne aussi une modification la production de tous les métabolites de l'acide arachidonique issus de l'épithélium, ce qui provoquer une hyperréactivité du tissu bronchique en diminuant la présence de facteurs hyperpolarisants.

1.4. Cascades métaboliques de l'acide arachidonique et production des acides époxyeicosatriénoïques

L'acide arachidonique est un constituant structurel important des membranes et un précurseur de plusieurs molécules bioactives les eicosanoïdes. L'AA est une molécule d'acide gras polyinsaturé en C20, à 4 avec doubles liaisons : 5, 8, 11, 14. L'AA est produit à partir des phospholipides membranaires suite à l'activation d'un récepteur et à l'activation d'une phospholipase A₂ (PLA₂). L'AA peut être libéré par les phospholipides membranaires sous l'action de la PLA₂-Ca²⁺ dépendante. La figure 8 montre la façon dont l'AA peut être produit à partir des phospholipides membranaires. Une fois libéré l'acide arachidonique pourra être métabolisé selon trois voies métaboliques principales: (i) la voie métabolique de la cyclooxygénase qui produit les prostaglandines, les tromboxanes et les prostacyclines, (ii) la voie métabolique de la lipoxygénase qui produit les leucotriènes, les acides

hydroxyeicosatetraenoïques (HETEs) et les acides hydroperoxyeicosatetraenoïques (HpETEs) et (iii) la voie métabolique du cytochrome P450 (CYP450) époxygénase et hydroxylase qui produisent respectivement les acides epoxyeicosatrienoïques (EETs) et les acides hydroxyeicosatetraenoïques (HETEs). La cascade de l'acide arachidonique est présentée à la figure 8. Les produits des voies métaboliques de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase ont été identifiés comme des intervenants majeurs dans les réactions inflammatoires des MLVRs.

La voie métabolique du CYP450 a commencé à être étudié dans les années 1960. En effet, DiAugustine et Fouts (1969) ont montré l'interaction de l'AA avec le CYP450 au niveau du cytoplasme des microsomes de foie. Ensuite, la présence du CYP450 a été identifiée dans plusieurs tissus par exemple les plaquettes humaines (Cinti et Feinstein, 1976). En 1981, Capdevilla et al. ont mis en évidence le fait que le CYP450 avait une action catalytique sur l'AA. Plusieurs études ont été faites par la suite à fin de définir l'action du CYP450 sur l'AA et conséquemment la production des EETs et des HETEs.

Les acides epoxyeicosatrienoïques (EETs) sont produits par l'action NADPH-dépendante du CYP450 époxygénase sur l'AA. La réaction d'époxydation d'une molécule nécessite le clivage d'une molécule oxygène, du NADPH, donc la formation d'eau et d'un atome d'oxygène réactif. La production d'EETs par l'action du CYP450 époxygénase sur l'AA a été démontrée dans plusieurs préparations microsomales ou dans des cellules isolées tels que le foie, les reins, le cerveau, l'hypophyse et l'endothélium (Fitzpatrick et Murphy, 1989; McGiff, 1981). Le CYP450 époxygénase

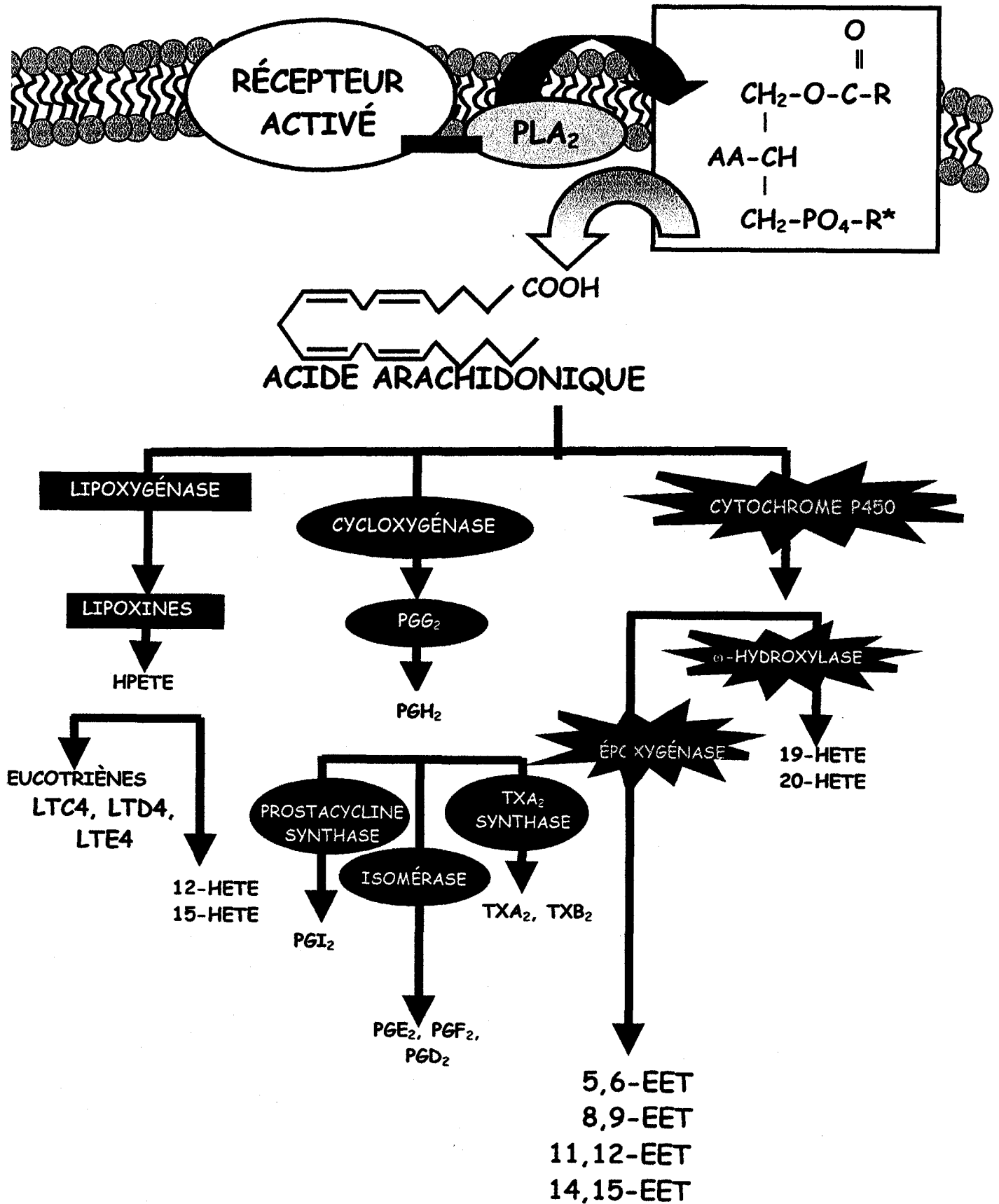


Figure 8 : Schéma des différentes voies métaboliques de l'acide arachidonique.

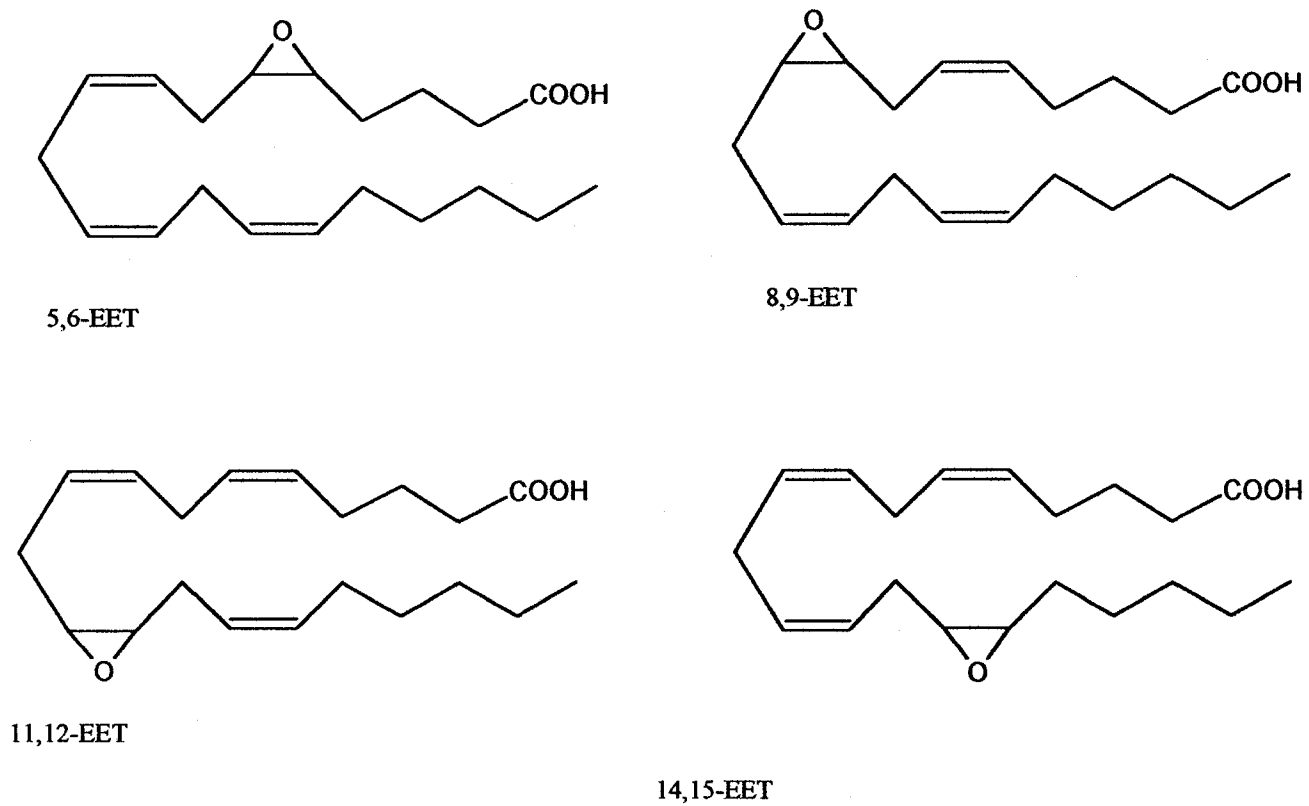


Figure 9: Formules moléculaires des quatre régioisomères de l'acide époxyeicosatriénoïque.

aurait la capacité d'effectuer des époxydations régio- et stéréosélectives (Capdevila et al., 1990; Capdevila et al., 1992a; Capdevila et al., 1992b). L'action du CYP450 époxygénase sur l'AA produit quatre régioisomères d'EET le 5,6-, le 8,9, le 11,12- et le 14,15-EET (Capdevila et al., 1992a). La figure 9 montre les formules moléculaires des quatre régioisomères d'EET.

Certains régioisomères d'EETs semblent être produits de façon préférentielle dans certains tissus. Suite à leur formation les EETs sont transformés en une forme inactive par l'enzyme époxide hydroxylase qui provoque leur hydroxylation, les EETs sont transformés en acides dihydroxyeicosatrienoïques (DHETs) (Zeldin et al., 1995).

Au niveau vasculaire, les EETs sont synthétisés par les cellules endothéliales (Rosolowsky et Campbell, 1996) et ils sont éventuellement incorporés dans les phospholipides membranaires des cellules endothéliales tels que la phosphatidylcholine (PC), phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidyléthanolamine (PE) et ils sont impliqués dans les voies de transduction de signaux cellulaires (Fang et al., 1997). Capdevilla et al. (1992) ont proposé que l'incorporation des EETs aux phospholipides membranaires est essentielle aux activités biologiques des EETs dans les cellules. Au niveau hépatique, 92% des EETs endogènes sont estérifiés à des phospholipides, les EETs sont préférentiellement associés à la PC avec 55% ; 32% et 12% des EETs sont respectivement associés à la PE et à la PI. Les EETs peuvent agir dans certains tissus pour changer la perméabilité de la membrane aux hormones peptidiques (Fitzpatrick et Murphy, 1989; Mcgiff, 1981). Certains de ces effets des EETs requiert leur estérification (Bernstrom et al., 1992).

Plusieurs autres rôles des EETs ont été identifiés. Au niveau cérébral, le 5,6-EET induit la relâche de somatostatine de l'hypothalamus (Capdevila et al., 1983). Cependant, une des caractéristiques majeures des EETs est leur capacité à provoquer une relaxation et une hyperpolarisation des MLVs. En effet, les EETs ont été identifiés comme des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) et des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) dans les MLVs notamment au niveau cérébral et rénal (Gebremedhin et al., 1998; Roman et Alonso-Galicia, 1999). De plus, les effets sur le potentiel de membrane sont médiés par une action des EETs sur les canaux K_{Ca} (Miura et Gutterman, 1998). Il a été aussi démontré que deux EETs, utilisés de façon exogène, activeraient directement des canaux K_{Ca} (Dumoulin et al., 1998) et inhiber des canaux sélectifs aux ions Cl^- (Salvail et al., 1998).

Au niveau des cellules des voies respiratoires la présence du CYP450 époxygénase et la production d'EETs a été démontrée (Devereux et al., 1981). Les EETs sont produits par l'épithélium respiratoire et par les tissus pulmonaires et ils agissent sur les MLVRs de la trachée et des bronches. Ils peuvent donc être considérés comme des facteurs paracrin ou autocrin puisqu'ils possèdent une demi-vie courte en solution aqueuse et qu'ils doivent agir à courtes distances. Il a été démontré que les EETs pouvaient induire *in vitro* une relaxation des muscles lisses bronchiques contractés avec de l'histamine (Zeldin et al., 1995). Alors que Dumoulin et al. (1998) ont démontré leur effet relaxant sur des trachées et des bronches précontractées à la carbamylcholine et à l'histamine.

1.5. Contexte et objectifs spécifiques de l'étude

Les régioisomères de l'acide époxyeicosatriénoïque, 5,6-, 8,9-, 11,12- et 14,15-EET, ont des effets sur les MLVs où ils sont considérés par de nombreux auteurs comme des molécules candidates pour le titre de facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (Campbell et al., 1996; Campbell et Harder, 1999; Gebremedhin et al., 1998; Komori et Vanhoutte, 1990). Cette hyperpolarisation serait médiée par l'activation de canaux potassiques calcium dépendant de grande conductance (K_{Ca}). Au niveau du MLVR les effets des EETs ont été peu étudiés. Popp et al. (1996) ont démontré une hyperpolarisation du MLV en présence d'inhibiteurs de NOS et COX et en présence de β -naphthoflavone qui induit une augmentation l'activité du CYP450. De plus, la proportion de canaux K_{Ca} est très importante dans les muscles lisses du tractus respiratoire (McCann et Welsh, 1986). Des expériences ont démontré la capacité des EETs à activer directement les canaux K_{Ca} soit par une interaction directe avec le canal, soit avec les phospholipides ou encore par une interaction des molécules d'EETs avec les protéines voisines du canal (Dumoulin et al., 1998). Cependant, ces expériences réalisées dans notre laboratoire avait seulement révélé l'effet deux de régioisomères soit les 5,6- et 11,12-EETs. De plus, les mécanismes par lesquels l'effet relaxant des EETs s'effectue au niveau du MLVR n'est pas bien connu et leur effet hyperpolarisant avait été postulé, mais n'avait pas été quantifié.

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient donc :

⇒ Vérifier si les deux autres régioisomères d'EET soit le 8,9- et le 14,15-EET induisaient la relaxation des MLVRs de la trachée et des bronches précontractés à l'aide d'un agoniste muscarinique. De façon à identifier les régioisomères possédant le meilleur pouvoir relaxant. Ces expériences ont été effectuées en absence d'épithélium de manière en réduire la production endogène EETs par l'épithélium respiratoire. Une étude comparative des effets relaxants des 8,9- et 14,15-EETs sur des tissus de cobayes sains et sensibilisés à l'ovalbumine a aussi été effectuée de façon à comparer et à vérifier les effets des EETs dans une situation se rapprochant d'une pathologie respiratoire comme l'asthme. Les mesures de relaxations ont été effectuées grâce à la technique des bains d'organes isolés.

⇒ Quantifier les effets des EETs sur le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses de lapins à l'aide de la technique de microélectrodes classiques. Et ainsi de postuler sur le caractère E_pDHF des EETs.

⇒ Démontrer l'effet direct d'activation des 8,9 et 14,15-EETs sur des canaux K_{Ca} reconstitués en bicouche lipidique plane à partir de préparations microsomales de trachées de bœuf.

Les techniques expérimentales ont nécessité l'utilisation de trois modèles animales. Ainsi, les différences de sensibilité des phénomènes électrophysiologiques pourraient être reliées à l'utilisation de trois espèces de mammifères mais il semble qu'il n'y ait aucune différence connue dans le contrôle électrophysiologique de la relaxation et de l'hyperpolarisation chez ces mammifères.

2. Matériel et méthodes

2.1 Technique en bain d'organes isolés

2.1.1 Sensibilisation des animaux

Des cobayes Hartley albinos mâles (200-300 g) ont été sensibilisés selon un protocole de 21 jours décrit par Lawrence et al., (1998). Ce protocole consistait en l'injection de d'ovalbumine combinée à de l'hydroxyde d'aluminium (alum). L'hydroxyde d'aluminium d'adjuvant et permet une hypersensibilisation à l'allergène avec des symptômes forts. Ce protocole se déroule sur 21 jours, la première semaine, soit au jour 1, les cobayes recevaient une injection d'une solution comprenant 10 µg d'ovalbumine et 1 mg d'hydroxyde d'aluminium (Al(OH)₃) dans une solution saline standard (0.9 %). Au jour 14, les cobayes recevaient une autre injection de la solution expliquée précédemment selon les mêmes concentrations. Au jour 21, les cobayes étaient provoqués par nébulisation. Cette nébulisation consistait à placer l'animal dans un tube fermé avec une nébulisation d'une solution de 1.5 % d'ovalbumine pour une période de 10 minutes et avec un débit de 7 l/min 24 heures après cette provocation par nébulisation, les animaux présentaient le maximum de symptômes allergiques et ils étaient sacrifiés et il y avait ensuite un prélèvement rapide des tissus qui étaient préparés comme décrit ci-dessous.

2.1.2 Préparation des fragments de bronches et de trachées de cobayes

Les cobayes Hartley albinos, mâle ou femelle, (200-300 g) sont anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (50 mg/kg) injecté intrapéritonéalement. Le système cœur poumons est prélevé rapidement et placé dans une solution Krebs barbotée (5%

O₂ et 95% CO₂) et à température pièce (environ 20°C). La composition de la solution Krebs est la suivante (en mM) : 118.1 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 2.5 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂ et 11.1 glucose, le pH est à 7,4 après le barbotage au carbogène. Les deux bronches externes et la trachée sont prélevés et coupées en spirales (Cadieux et al., 1990). Par la suite, les cellules épithéliales sont enlevées mécaniquement à l'aide d'un coton tige que l'on glisse délicatement sur le tissu. Une fois, les tissus coupés en spirale et libérés de leur épithélium, ils sont placés dans les bains à organe isolé dans une solution Krebs barbotée et à 37°C. Les tissus sont soumis à une tension initiale de base de 1 gramme visualisée à l'aide d'un transducteur de force (Grass, modèle FT 03C). Avant l'expérimentation, les tissus sont stabilisés dans les bains pendant 60 minutes avec un lavage aux 15 minutes (Savaria et al., 1992).

2.1.3 Mesures de tensions musculaires isométriques

Un transducteur de force (Grass, modèle FT 03C) permet de mesurer la tension initiale ainsi que les changements de tension des muscles lisses qui surviennent lors de l'application des divers agents pharmacologiques. Ce transducteur de force est relié à l'une des extrémités des tissus (bronches ou trachées). Les variations de tension sont transformées en variations de voltage par le transducteur et ensuite ces signaux sont amplifiés et enregistrés sur papier par un polygraphe de type Grass (modèle 7D) (Cadieux et al., 1990). Deux catégories d'expérimentations ont été faites sur les trachées et les bronches sans épithélium de cobayes sains et de cobayes sensibilisés à l'ovalbumine. Dans les deux cas, les agents pharmacologiques (EETs et/ou autres) ont été appliqués après l'atteinte du plateau de la contraction causée par l'application de carbamylcholine chloride (CCh 0.2 µM). Suite à l'observation de l'effet de l'agent

a été remplacée trois fois (lavage) puis trois fois après une période de 15 minutes de manière à éliminer complètement le CCh et les agents pharmacologiques des tissus et des bains. Après la stabilisation du tonus de base des tissus, après le dernier lavage, une autre contraction au CCh est effectuée (0.2 μ M). Les relaxations ou contractions des tissus induites par l'application des agents pharmacologiques sont calculées en pourcentage (%) de relaxation par rapport à l'amplitude de la contraction causée par le CCh à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Éq.1} \quad \% \text{ relaxation} = \frac{\text{tension en présence de } 0.2 \mu\text{M CCh} + \text{l'agent pharmacologique}}{\text{tension en présence de } 0.2 \mu\text{M CCh seul}} \times 100$$

2.1.4 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en terme de valeurs moyennes \pm la SEM. La variance statistique est évaluée à l'aide du test t de Student pairé ou non-pairé, selon le cas, en utilisant le logiciel Sigma-Plot (SPSS Inc., Chicago, IL). La valeur de $P < 0.05$ est considérée comme significative.

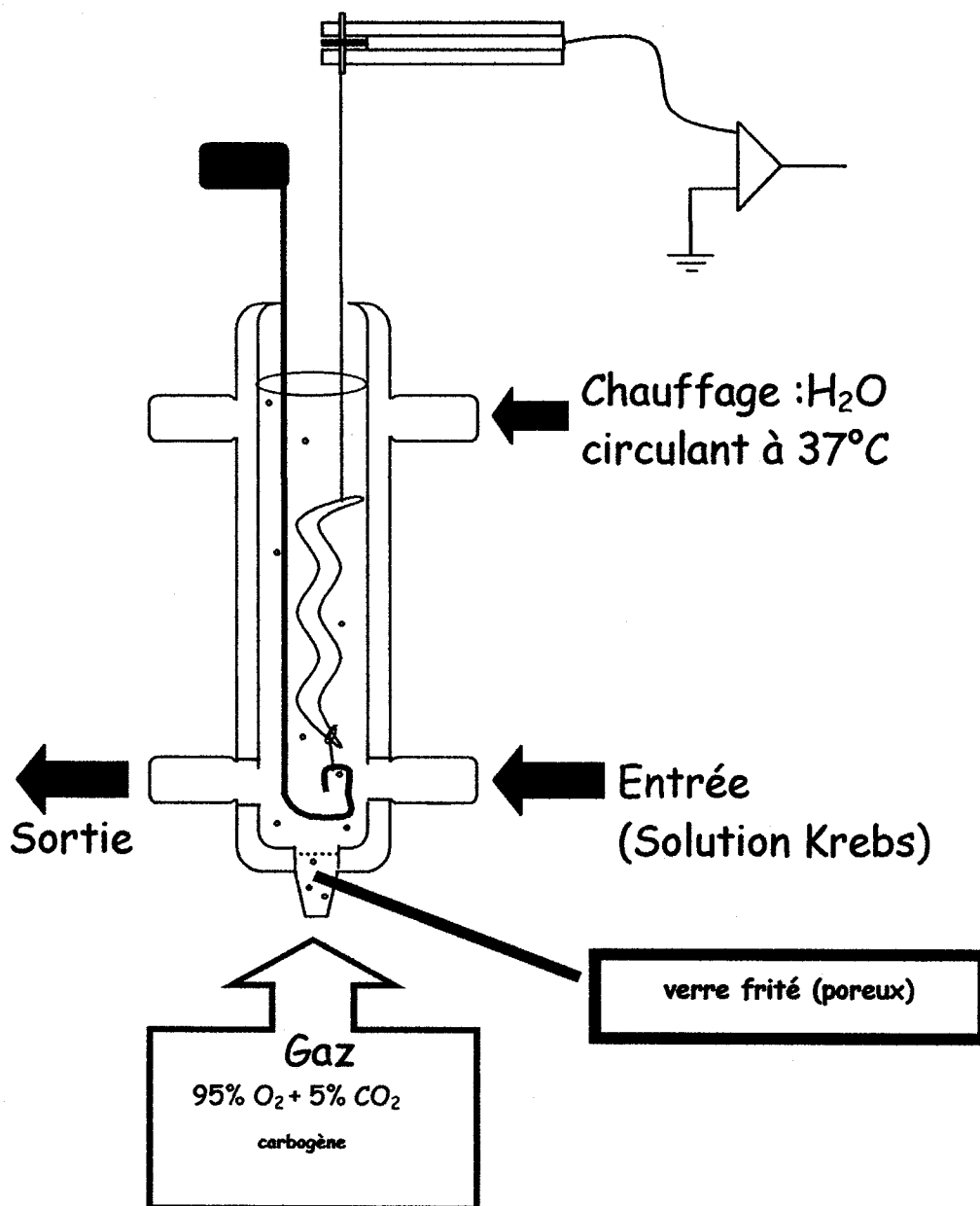


Figure 10: Schéma du montage expérimental utilisé pour les mesures de tension isométriques.

2.2 Technique de microélectrodes

2.2.1 Préparation des trachées de lapins

Les lapins albinos mâle ou femelle pesant entre 1.5 et 2.5 kg ont été anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (35 mg/kg). La trachée est rapidement prélevée et placée dans une solution de Tyrode barbotée avec un mélange de gaz 95% O₂ et 5% CO₂ à température de la pièce (environ 20°C). La solution de Tyrode contient en mM : 136 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 0.35 NaHPO₄, 12.5 NaHCO₃ et 11 glucose à un pH de 7.4 ± 0.05 selon le barbotage de la solution. La trachée a été coupée longitudinalement et du côté opposé au muscle lisse respiratoire de façon à exposer la face luminale de la trachée. Les cellules épithéliales ont été enlevées à l'aide d'un applicateur de coton qui est légèrement roulé sur le muscle lisse. La trachée a été coupée en section de 10 à 15 mm de longueur et d'environ 5 mm de large. Le morceau de trachée a été ensuite placé dans la chambre de perfusion d'une capacité de 3 ml d'un système de trois compartiments dont la température (thermostatée à 37°C) et le niveau de solution sont très rigoureusement contrôlés tel que décrit par Savail et al. (1998). Le montage de microélectrodes a été dessiné et élaboré par l'équipe du bilarium. Ce montage possède un système de perfusion à 6 robinets permettant la perfusion simultanée de plusieurs agents pharmacologiques, perfusion dont le débit est contrôlé. Le muscle lisse respiratoire est placé vers le haut permettant ainsi son accès pour les manipulations subséquentes. Les chambres sont perfusées à un flux constant de 2 ml/min avec une solution de Tyrode standard. La trachée ainsi disposée dans la chambre perfusée par le Tyrode thermostaté subit une période de stabilisation de 20 minutes et une autre de la même durée en présence de 5 µM de wortmannin de façon à prévenir les contractions du muscle lisse lors des empacements avec les

tissus utilisés dans la journée sont conservés pour plusieurs heures à température de la pièce dans une solution de Tyrode barbotée.

2.2.2 Mesure des potentiels de membrane

Les potentiels de membranes ont été mesurés en pénétrant le muscle lisse respiratoire à partir de la face luminale à l'aide d'une microélectrode intracellulaire conventionnelle de borosilicate (Kwick-Fil-M1B1JUF-3, Word Precision Instruments, USA), remplie de 3 M KCl. La résistance électrique de ces microélectrodes se situait entre 20 et 50 M Ω . La microélectrode était reliée via une pastille d'Ag/AgCl₂ à un amplificateur qui était monté sur un micromanipulateur Narishigue. Une autre pastille d'Ag/AgCl₂ était placée dans le troisième compartiment de la chambre expérimentale et servait d'électrode de référence connectée à la terre (voir figure 11). Les mesures étaient faites à l'aide d'un amplificateur de type KS-700 (Word Precision Instruments, USA). Les signaux électriques étaient constamment surveillés à l'aide d'un oscilloscope (Tektroniks, TDS 130, USA). Les potentiels de membrane étaient enregistrés à l'aide d'une interface digidata 1200B et du programme Axoscope 7.0 (Axon Instruments, USA). Les données étaient enregistrées sur le disque dur de l'ordinateur pour des analyses subséquentes.

2.2.3 Préparation des agents pharmacologiques

Le carbamylcholine chloride, la wortmannin et l'IbTX ont été acheté chez Sigma (St-Louis, MO). Les EETs dans 100% d'ACN ou 100% d'éthanol proviennent de chez Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) et sont conservés à -20°C. La

concentration de la solution mère des EETs est de 342 μM , la dilution d'un volume précalibrés de cette solution dans la solution de Krebs ou de Tyrode standard a permis d'obtenir les concentrations désirées pour les manipulations en bains d'organes isolés ou de microélectrodes. Le système de perfusion du montage de microélectrodes a été légèrement adapté pour protéger les EETs qui sont très sensibles à l'oxygène et à la lumière. Les EETs sont des molécules instables qui doivent être conservé dans l'ACN et l'EtOH de façon à conserver leurs propriétés physiologiques, ce qui a empêcher leur reconstitution dans une solution physiologique. La wortmannin a été diluée et entreposée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'IbTX a été diluée dans la solution de Krebs ou de Tyrode juste avant son utilisation. L'effet de chaque véhicule sur le potentiel de membrane a été vérifié séparément sur les MLVRs de manière concentration-dépendante et selon la concentration maximale utilisée en présence du composé actif.

2.2.4 Analyse des résultats et statistiques

Les courbes concentration-réponse ont été faite à l'aide de l'équation de Hill :

$$y = Mp_{ref} + ((MP * xnH / EC_{50} * xnH))$$

où EC_{50} est la concentration qui produit la moitié de l'hyperpolarisation maximale, MP est la variation du potentiel de membrane, Mp_{ref} est le potentiel de membrane de référence pour un composé spécifique et nH est le coefficient de Hill.

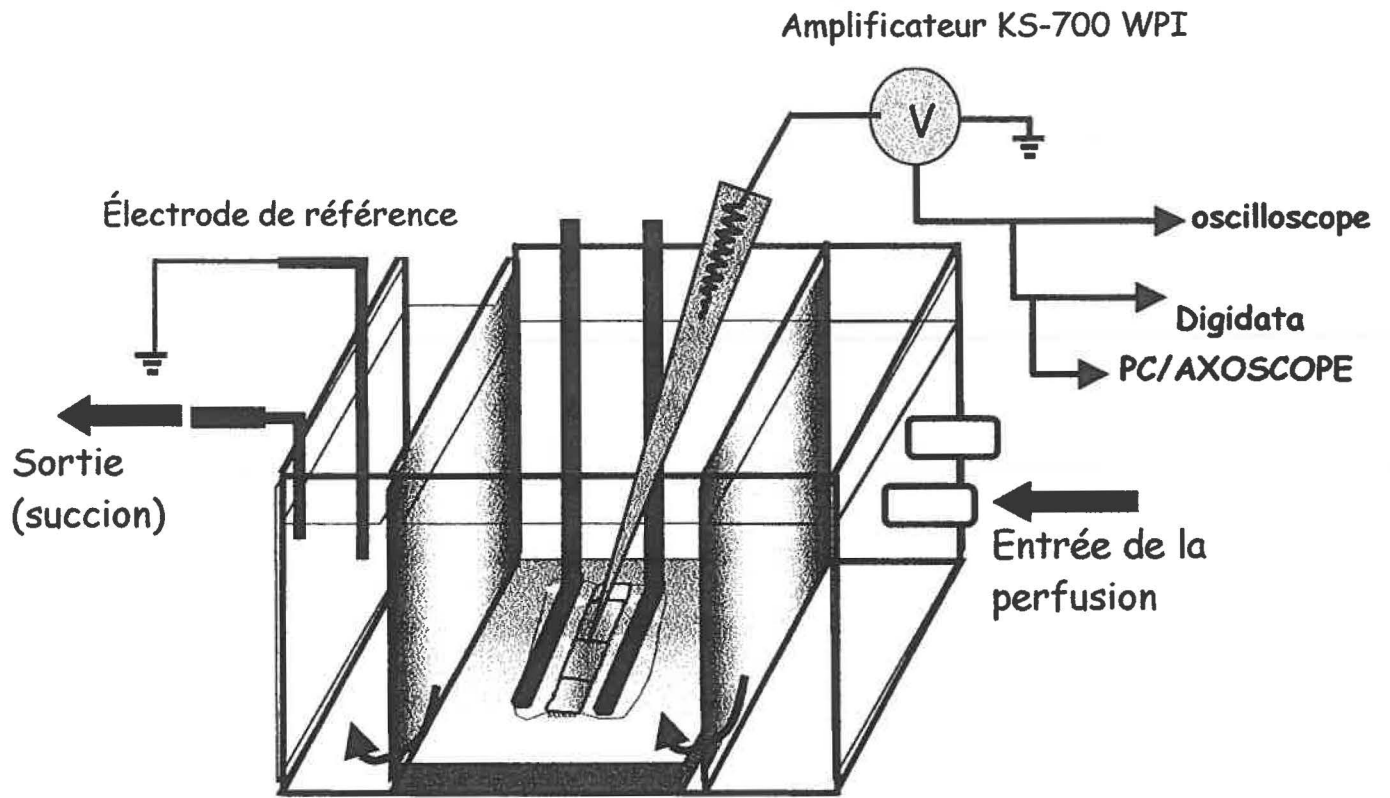


Figure 11 : Schéma de la chambre expérimentale utilisée pour les mesures de potentiel de membrane.

Les résultats ont été exprimés \pm SEM. Pour l'analyse statistique le test t de Student a été utilisé de façon pairé ou non-pairé selon les conditions expérimentales. Les valeurs avec $P < 0.05$ ont été considérées comme significatives. N est le nombre d'emplacements et N est le nombre de tissus utilisés sur des lapins différents. Les histogrammes et les courbes ont été faits à l'aide du programme Sigma plot 4.0 (SPSS-Science, Chicago, USA).

2.3 Analyse par immunobuvardage "Western Blot"

Un gel de Polyacrilamide à 10% + 1% SDS dans un tampon Tris-Glycine a été utilisé pour déterminer et comparer le profil protéique des fractions microsomales de trachées de bœuf. Les échantillons (40 μ g/puits) ont migré à 200 V sur le gel monté dans un mini-protean III (Bio-Rad). Un des gels a été coloré au Bleu de Coomassie, l'autre a servi à une expérience d'immunobuvardage. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose à 70 V pendant 1 heure 30 minutes. Cette membrane a été lavée avec une solution tampon Tris + 0.1% TWEEN 20 (TBS-T). La solution TBS-T contenait en mM : 20 Tris, 137 NaCl, pH 7.6. Afin de bloquer les sites de liaison non spécifique pour les anticorps, la membrane a été placée dans une solution TBS-T + 5% de lait écrémé pour une période de 15 heures. Après cette période, la membrane a été lavée avec la solution TBS-TWEEN. Elle a été ensuite placée dans la solution TBS-T contenant le premier anticorps anti-BK_{Ca} (solution finale : 1.5 μ g/ml) (Alomone Labs, Jerusalem, Israël) durant 2 heures à température de la pièce (21°C). Après quelques lavages dans la solution TBS-T, elle a été incubée 1 heure avec le deuxième anticorps (protéine A couplée à la peroxydase) (Amersham). Ensuite, la membrane a été relavée avec la solution TBS-TWEEN. Finalement, la membrane a été révélée avec la trousse "Enhanced Chemiluminescence" (ECL) et les

négatifs ont été effectués en incubant préalablement l'anti-BK_{Ca} (mSlo sous-unité α) avec un antigène pour l'anti-BK_{Ca} (3-5 μ g/puits vendu par Alomone Labs, Jerusalem, Israël).

2.4 Reconstitution des canaux potassiques

2.4.1 Préparation des fractions microsomales de trachées de bœuf

Les trachées de bœufs proviennent d'un abattoir local (Montpak, St-Germain-de-Graham, Qc), fraîchement prélevées elles ont été rapidement transportées dans une solution froide de McEven contenant (en mM) : 130 NaCl, 5.4 KCl, 2.2 CaCl₂, 1 MgCl₂ et 10 HEPES, pH 7.4 (avec NaOH). Ensuite, les trachées sont disséquées à une température de 4°C de manière à réduire le métabolisme cellulaire et plus particulièrement la protéolyse (Kwan et al., 1983). Les trachées sont fixées sur une planche de dissection et le tissu épithélial est enlevé (Savaria et al., 1992) de façon à exposer le feuillet musculaire lisse. Toutes ces manipulations sont exécutées en prenant grand soin de conserver le tissu humidifié avec la solution physiologique de McEven. Le feuillet est ensuite disséqué du cartilage et coupé en morceaux qui sont ensuite mis dans une solution d'homogénéisation composée de (en mM) : 300 sucrose, 20 K-PIPES, 4 K-EGTA, 2 DTT à un pH de 7.0 (KOH). Un cocktail d'inhibiteurs de protéases est ajouté à la solution d'homogénéisation : 50 μ M Pefabloc [4-(2-

Préparation de la fraction microsomale brute des muscles lisses de trachées bovines

Trachées bovines



Muscle lisse



Homogénat de muscle lisse respiratoire



Surnageant



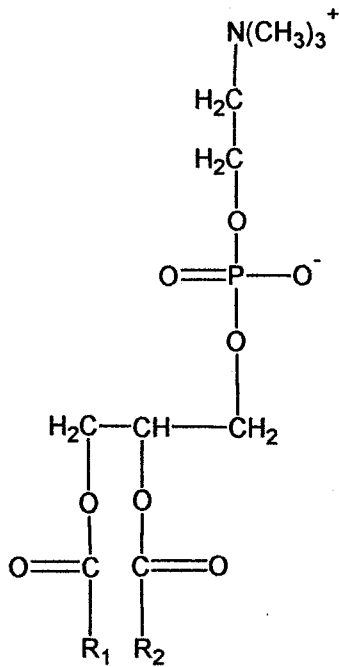
Culot = Fraction microsomale brute

Figure 12 : Schéma résumant les étapes de préparation de la fraction microsomale brute utilisée pour les expériences de reconstitutions membranaires.

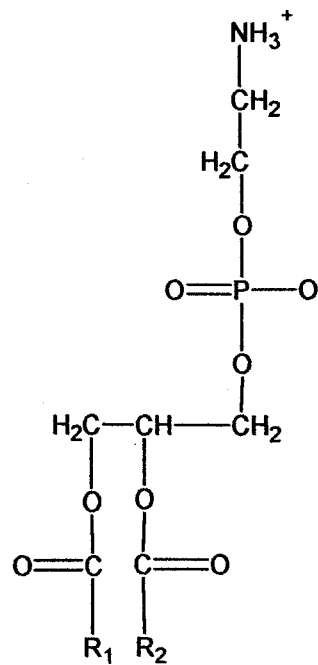
Aminoethyl) benzene sulfonyl fluoride], 1.0 μ M Pepstatine, 1.0 μ M Leupeptine, 0.24 TUI/100 ml Aprotinine. Les morceaux de trachées sont homogénéisés à l'aide d'un polytron (T25, Ultra-Turrax) dans un premier temps pour deux périodes de 30 secondes à 8 000 rpm et ensuite pour deux périodes de 30 secondes à 13 500 rpm. Entre chaque période d'homogénéisation le polytron est nettoyé avec la solution d'homogénéisation de façon à minimiser la perte de matériel biologique en dégageant le tissu conjonctif des lames du polytron et ainsi préserver le bon fonctionnement de l'appareil. Par la suite, l'homogénat est centrifugé à 6 500 g à 4°C pendant 20 minutes dans un rotor type 35, Beckman. Le surnageant est recueilli et filtré sur deux couches de la gaze biomédicale et ensuite, centrifugé à 70 000g à 4°C pendant 1 heure (rotor Ti-42.1, Beckman). Le culot obtenu suite à cette opération est resuspendu dans une solution de cryopréservation contenant (en mM) : 300 sucrose, 5 K-PIPES, pH à 7.0 (KOH). La figure 12 résume les différentes étapes de la préparation des fractions microsomales brutes. La fraction microsomale brute est ensuite aliquotée dans des microtubes de type Eppendorf (100 μ l). Les tubes sont rapidement congelés dans de l'azote liquide et ils sont entreposés à -80°C. La concentration protéique de la fraction microsomale brute est mesurée à l'aide de la méthode Folin-Ciocalteu (Lowry et al., 1951).

2.4.2 Reconstitution membranaire

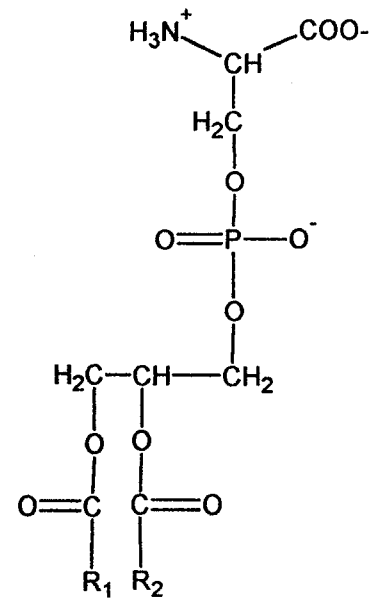
Cette technique consiste à reconstituer des canaux ioniques à partir de microvésicules dans des bicouches lipidiques planes (Miller et Racker, 1976). Le montage est composé de deux chambres expérimentales nommées *cis* et *trans*, ces deux chambres correspondent respectivement au côté extracellulaire et au côté



Phosphatidylcholine



Phosphatidyléthanolamine



Phosphatidylsérine

Figure 13 : Formules moléculaires des têtes de phospholipides utilisés pour faire les bicouches lipidiques planes.

intracellulaire du canal K_{Ca} . L'injection des microvésicules s'effectue dans la chambre *cis* soit la chambre extracellulaire. Les deux chambres sont séparées par un septum perforé d'un orifice d'un diamètre variant entre 250 et 330 μm . Pour former les bicouches lipidiques planes un mélange lipidique: phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylcholine (PC) dans un rapport de 3 : 2 : 1, dilué dans le chloroforme est utilisé. La figure 13 montre les formules moléculaires des phospholipides utilisés pour faire les BLPs. Ce mélange de lipides dans le chloroforme sert à prétraiter l'orifice entre les deux chambres expérimentales. Un mélange identique est utilisé pour peindre les membranes artificielles par contre, le chloroforme est évaporé à l'aide de l'argon et il est remplacé par 50 μl de décane.

Les deux chambres expérimentales *cis* et *trans* contiennent la solution suivante (en mM) : 50 KCl, 20 K-HEPES, 0.01 Ca^{2+} libre (109 μM CaCl_2 + 100 μM K-EGTA) à un pH de 7.4 à température ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). La membrane est peinte dans l'orifice prétraité avec le mélange de lipides dans le décane à l'aide d'une tige de téflon. Les BLPs utilisées ont une capacité comprise entre 250 et 400 pF. Une fois dans la chambre *trans*, l'électrode est reliée à une terre virtuelle tandis que dans la chambre *cis*, l'électrode est reliée à un préamplificateur de type DAGAN (modèle 8 900, Dagan Corp. , Minneapolis, MN, USA). La figure 14 décrit le montage expérimental avec les deux chambres et les divers composants. Les signaux produits lors de la fusion des microvésicules sont visualisés sur un oscilloscope ainsi que sur un ordinateur muni du logiciel Axotape (Axon Instrument Inc., Foster City, USA). Les signaux électriques sont enregistrés sur bande magnétique à l'aide d'un magnétoscope (DAS/VCR 900 Toshiba, Unitrade), cet enregistrement permettra une analyse ultérieure des signaux

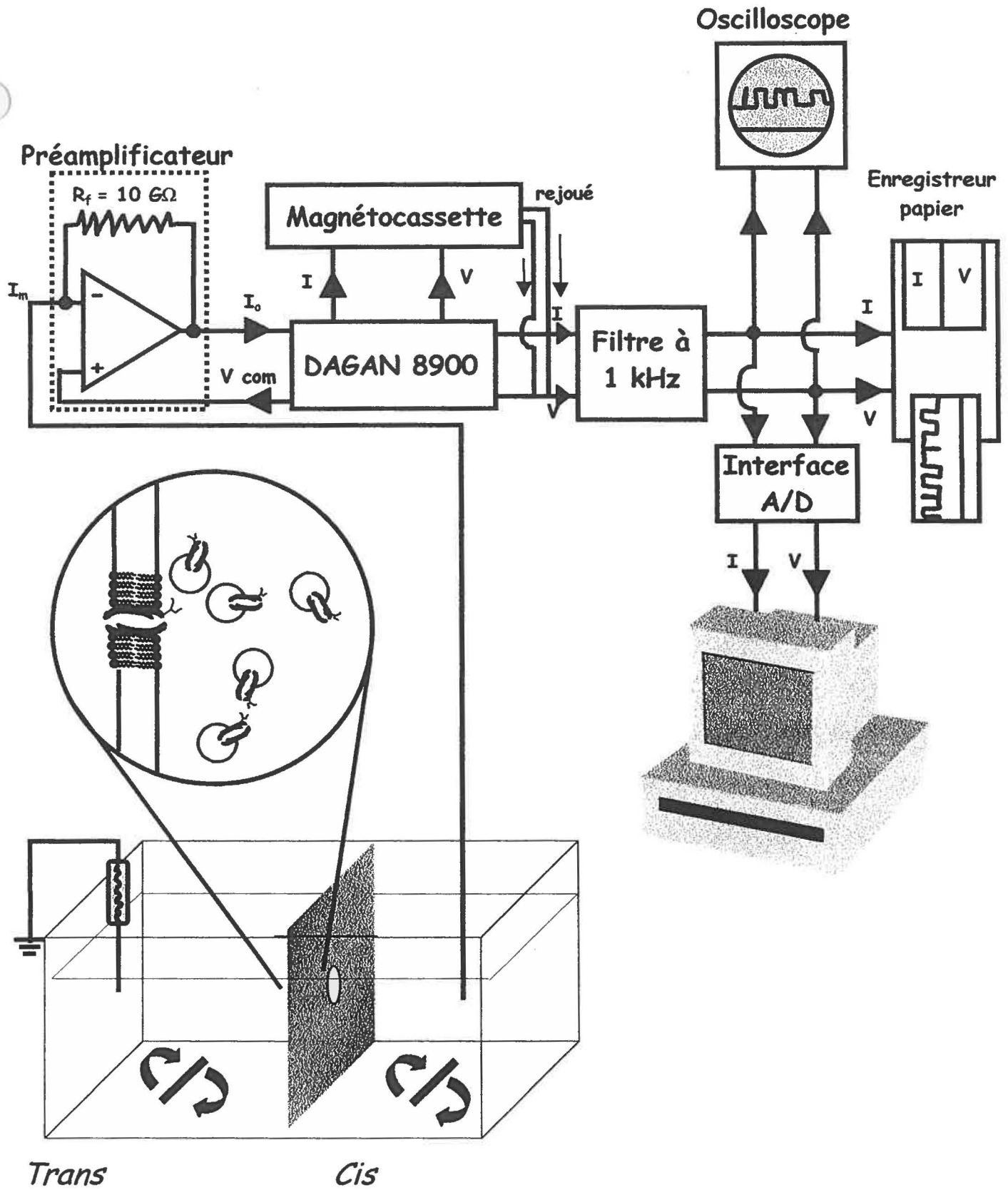


Figure 14 : Schéma du montage expérimental utilisé pour les reconstitutions membranaires.

obtenus. Pour l'analyse les signaux sont rejoués et filtrés à 0.5 kHz par un filtre passe-bas (8-pole Bessel, LPF-100, Warner Instrument Corporation, Handen, CT, USA) et ensuite, digitalisés à 2 kHz par une interface analogue/digitale (TL1-M, Axon Instruments Inc. , Foster City, USA), à partir de la bande magnétique, sur le disque dur l'ordinateur PC (DTK Computer 486). La fréquence de digitalisation (2 kHz) correspond à 4 fois la fréquence d'acquisition.

2.4.3 Analyse des courants potassiques

La digitalisation des signaux sur le disque rigide de l'ordinateur permet leur analyse ultérieure par le logiciel SCA (Single Channel Analysis) développé par le Dr Mark Nelson (U. of Vermont, VT, USA). Ce logiciel permet de mesurer plusieurs paramètres des canaux tels que leur probabilité d'ouverture (P_o), les temps moyens d'ouvertures (t_o) et de fermetures (t_f). La P_o est évaluée à partir d'histogramme d'amplitude et les temps d'ouvertures et de fermetures sont évalués à partir d'histogramme de distribution réalisé sur des enregistrements préalablement idéalisés. La probabilité d'ouverture est déterminée selon l'équation 2a où P_o est la probabilité d'ouverture, a_1 est l'aire correspondant à la période de temps où le canal est ouvert et a_0 est l'aire correspondant à la somme des temps où le canal est fermé.

$$\text{Éq.2a} \quad P_o = \frac{a_1}{a_0 + a_1}$$

Une distribution Gaussienne permet de mesurer les aires sous la courbe. Parfois plusieurs canaux sont reconstitués dans les BLPs, il est donc nécessaire de

considérer le nombre de canaux présents pour évaluer la P_o . Les valeurs de NP_o seront évaluées selon l'équation 2b où N correspond au nombre de canaux, $a_0, a_1, a_2, a_3, \dots$, et a_n correspondent aux aires de l'histogramme d'amplitude où a_0 est l'aire où tous les canaux sont fermés et a_1, a_2, a_3, \dots , et a_n sont respectivement les aires où 1, 2, 3, ..., n canaux sont ouverts simultanément. Cette équation permet de normaliser la probabilité d'ouverture lorsque plusieurs canaux ont été reconstitués et d'analyser les effets d'agents pharmacologiques sur ces paramètres.

$$\text{Eq. 2b} \quad NP_o = \frac{a_1 + a_2}{a_0 + a_1 + a_2}$$

2.4.4 Pharmacologie

Des études pharmacologiques ont été effectuées sur les canaux potassiques calcium-dépendant (K_{Ca}) reconstitués dans les BLP. Il a été nécessaire d'évaluer l'orientation des canaux reconstitués. Généralement, la chambre expérimentale *cis* est considérée comme la face extracellulaire du canal K_{Ca} et la chambre expérimentale *trans* est considérée comme la face cytoplasmique du canal K_{Ca} . Le canal K_{Ca} possède un senseur de Ca^{2+} sur sa face cytoplasmique, ainsi lors des expériences, l'activité du canal peut être diminuée en ajoutant de l'EGTA, un chélateur de Ca^{2+} , dans la chambre *trans* de façon à diminuer la quantité de Ca^{2+} libre et à s'assurer de l'orientation du canal. La fusion de microvésicules est aléatoire. Il arrive parfois que le canal K_{Ca} reconstitué ait son senseur de calcium orienté vers la chambre *cis*. Dans cette situation, la face cytoplasmique du canal est située dans la chambre expérimentale *cis*. Cette situation peut être prédite en observant le comportement du canal K_{Ca} en fonction du voltage, lorsque que celui-ci est reconstitué avec le senseur

de calcium dans la chambre expérimentale *trans* sa probabilité d'ouverture augmente lorsque la BLP est dépolarisée (le voltage augmente). Le canal K_{Ca} est très actif lorsque le Ca^{2+} libre est à une concentration de 10 μM , il est donc très facile d'évaluer le sens du canal en variant la $[Ca^{2+}]$ libre d'un côté ou de l'autre du canal. La concentration de Ca^{2+} libre peut ensuite être ramenée au niveau initial grâce à l'utilisation d'une solution de $CaCl_2$. Ainsi après avoir établi le sens du canal, le Ca^{2+} libre est diminué avec de l'EGTA sur la face cytoplasmique du canal reconstitué. Les canaux K_{Ca} sont caractérisés selon leur sensibilité au Ca^{2+} libre, leur dépendance au voltage ainsi qu'avec leur sensibilité à des inhibiteurs tels que le TEA et IbTX, ce dernier étant spécifique pour ce type de canal. Les études pharmacologiques ont été faites en utilisant deux EETs soit le 8,9- et le 14,15-EET dont la solution mère est dans 100% d'EtOH. Ces deux EETs ainsi que leur solvant (EtOH) ont été appliqués sur la face extracellulaire du canal K_{Ca} déterminée préalablement, de plus, la $[Ca^{2+}]$ libre sur la face cytoplasmique est réduit entre 0,3 à 1 μM avec de l'EGTA de façon à réduire l'activité du canal. Les EETs sont très sensibles à l'oxygène et à la lumière des précautions ont été prises pour éviter la détérioration des EETs. Les substances sont conservées à $-20^{\circ}C$ dans des flacons opaques et sous Argon. Les substances sont ajoutées dans la chambre expérimentale correspondant à la face extracellulaire avec une seringue Hamilton (Fisher, Ont.). Un agitateur magnétique permet de mélanger les solutions dans chaque chambre expérimentale. Avant et après la diminution de la $[Ca^{2+}]$ libre ainsi qu'avant et après l'application des EETs la probabilité d'ouverture et les temps d'ouvertures et de fermetures sont évalués de façon à mesurer les effets des EETs ou de leur solvant sur les canaux K_{Ca} reconstitués en BLP.

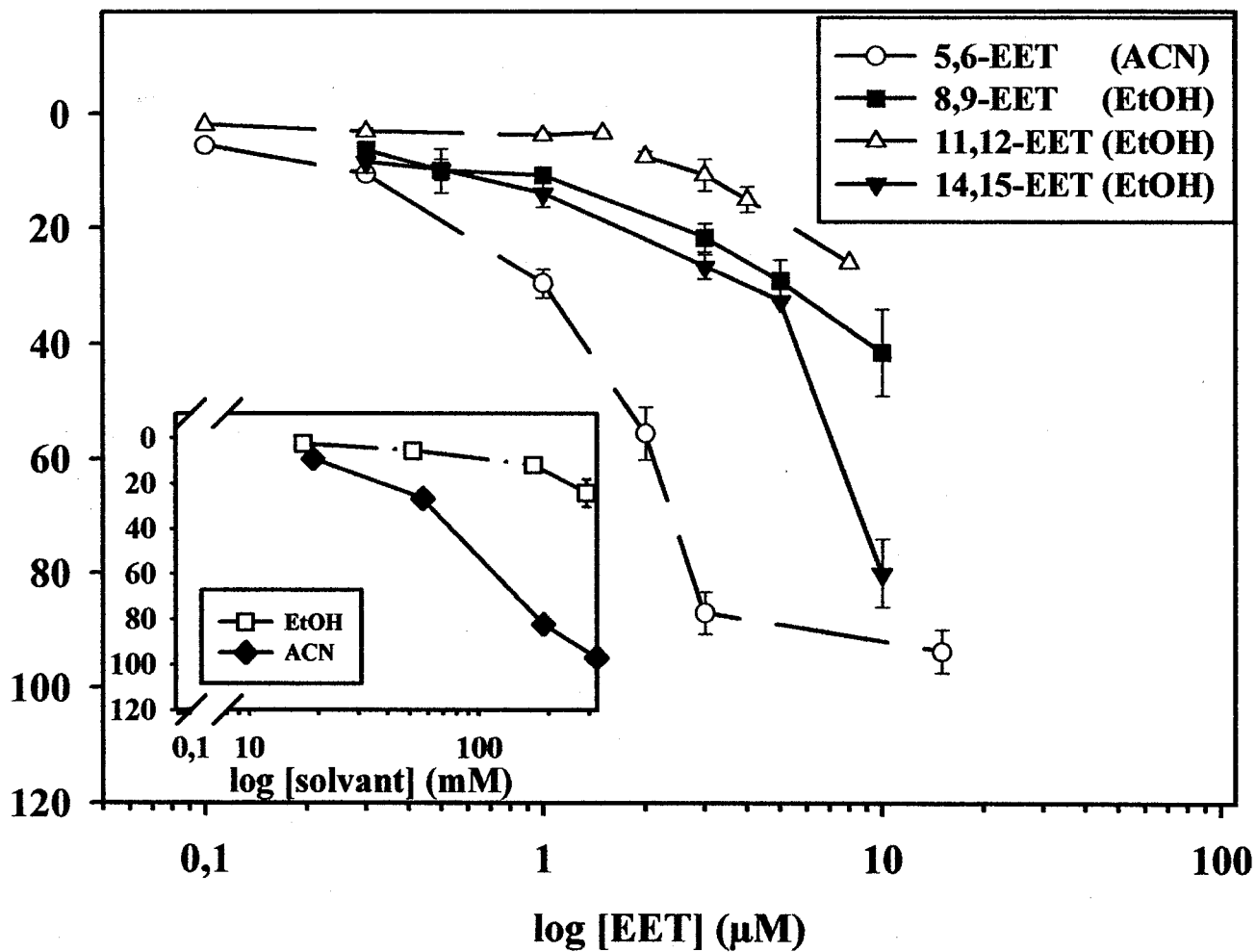
3. Résultats

3.1. Mesures de tensions isométriques

Pour vérifier les effets des EETs sur la relaxation des muscles lisses respiratoires, des trachées et des bronches de cobayes dénudées d'épithélium et disséquées en spirale ont été précontractées à l'aide de 0.2 μM CCh. Après l'obtention de la phase de plateau de la contraction, diverses concentrations d'EETs ont été ajoutées au bain. La figure 15 montre les courbes concentration-réponse pour les quatre EETs. Le 5,6-EET a l'effet le plus relaxant apparant plus marqué par rapport aux quatre régioisomères. Par contre, le solvant de cet isomère est l'acétonitril (ACN), une substance toxique pour le tissu. L'ACN seul provoque une forte relaxation du tissu et à forte concentration, 3 μM , il relaxe de presque 100% (Fig. 15 en insertion). La figure 15 en insertion montre l'effet des solvants (ACN 100% et EtOH 100%) sur la relaxation des MLVRs de cobayes précontractés. Les solvants ont été ajoutés aux bains d'organe de façon à correspondre au volume maximal de solvant injecté en présence de la substance testée (EET). Si l'effet des solvants est pris en considération le 8,9- et le 14,15-EET sont les régioisomères les plus efficaces car ils provoquent des relaxations de 42% et 82%, respectivement, à la concentration maximale testée (10 μM). Bien que le solvant de ces deux régioisomères d'EET, l'EtOH, provoque une relaxation des tissus, à la concentration maximale utilisée, ses effets relaxants sont significativement plus faibles que ceux des EETs. Les effets du 8,9- et du 14,15-EET seront donc étudiés plus amplement puisque ce sont les régioisomères d'acide époxyeicosatriénoïque les plus efficaces.

Figure 15 : Effets des quatre EETs en fonction de leurs concentrations sur la relaxation des MLVRs de cobayes.

Les MLVRs de cobaye disséqués en spirale et dénudés d'épithélium ont été précontractés avec 0.2 μ M de carbamylcholine chloride (CCh), par la suite, diverses concentrations d'EETs ont été ajoutées au bain d'organe. Les EETs étaient dissouts dans de l'ACN ou dans de l'EtOH. En insertion : effet des solvants sur la relaxation des MLVRs de cobaye. Sur des MLVRs de cobaye précontractés avec un agoniste muscarinique (CCh 0.2 μ M), des concentrations de solvants, ACN ou EtOH, représentant 0.1, 0.3, 1 et 1.7% du volume total du bain d'organe ont été ajoutées. 0.1, 0.3, 1, 1.7% de véhicule représentent respectivement 18.95, 56.85, 189.5 et 322.15 mM d'ACN et 17.12, 51.36, 171.2 et 291 mM d'EtOH (n = 10). L'ACN a un pouvoir relaxant plus important que l'EtOH. Ainsi les effets sur la relaxation du 5,6-EET dans ces conditions sont causés principalement par le solvant et les effets de ce régioisomère n'ont pas été vérifiés plus amplement. Tel que montré par ces résultats le 8,9- et le 14,15-EET provoquent des relaxations importantes de 42% et 82% respectivement. (n = 15)



3.1.2 Comparaison des résultats obtenus sur les trachées et les bronches d'animaux sains et sensibilisés

La figure 16 montre la quantification de la relaxation obtenue sur des trachées versus des bronches d'animaux sains précontractées à la CCh (0.2 μ M) et relaxées avec le 8,9-, le 14,15-EET ou l'EtOH (solvant). De plus, les trachées et les bronches sont dénudées d'épithélium de façon à vérifier l'effet exogène des EETs sur le MLVR. La relaxation des trachées et des bronches semble être dépendante de la concentration des substances ajoutée au bain. Ainsi à la concentration minimale testée (0.3 μ M) le 8,9- et le 14,15-EET relaxent les trachées de respectivement $4.1 \pm 0.9\%$ et $5.4 \pm 1.6\%$ et relaxent les bronches de respectivement $4.9 \pm 1.3\%$ et $5.1 \pm 1.5\%$. À la concentration maximale testée de (5 μ M) le 8,9- et le 14,15-EET relaxent les trachées de respectivement $34.5 \pm 5.1\%$ et $39.9 \pm 2.6\%$ et relaxent les bronches de respectivement $35.4 \pm 4.5\%$ et $39.4 \pm 1.3\%$. Les différences de pourcentage de relaxation entre les trachées et les bronches ne sont pas significatives. À ces deux concentrations d'EETs (0.3 et 5 μ M), le solvant (EtOH) relaxe significativement moins que les EETs. En effet, l'EtOH (0.1%) relaxe les trachées de $1.5 \pm 1\%$ et les bronches de $3.1 \pm 1.6\%$ et à 1,7% l'EtOH relaxe les trachées de $19.0 \pm 3.3\%$ et les bronches de $17.0 \pm 2.3\%$.

La figure 17 montre la quantification de la relaxation obtenue sur des trachées versus des bronches d'animaux sensibilisés précontractées à la CCh (0.2 μ M) et relaxées avec le 8,9-, le 14,15-EET ou l'EtOH (solvant). La relaxation des trachées et des bronches semble dépendante de la concentration des substances ajoutées au bain.

Figure 16 : Effets du 8,9- et du 14,15-EET sur des trachées et des bronches de cobayes normaux (contrôle).

Pourcentage de relaxation sur des trachées et des bronches, dépourvues de leur épithélium et précontractées avec 0.2 μ M de CCh, induit par l'addition de 8,9- EET, 14,15-EET ou de leur solvant (EtOH). À une concentration de 5 μ M le 8,9-EET relaxe les trachées et les bronches de cobayes de respectivement $34.5 \pm 5.1\%$ et $35.4 \pm 4.5\%$. À une concentration de 5 μ M le 14,15-EET relaxe les trachées et les bronches de cobayes de respectivement $39.9 \pm 2.6\%$ et $39.4 \pm 1.3\%$. Pour des concentrations de 0.3, 1, 3 et 5 μ M d'EET les volumes maximaux de solvant sont de 4, 12, 40 et 67 μ l correspondant à 0.1, 0.33, 1 et 1.7% de véhicule soit respectivement 17.12, 51.36, 171.2 et 291 mM d'EtOH. * signifie que la valeur de relaxation est significativement plus grande que la valeur de relaxation pour le véhicule seul avec $P < 0.05$ ou ** avec $P < 0.001$. (n = 15)

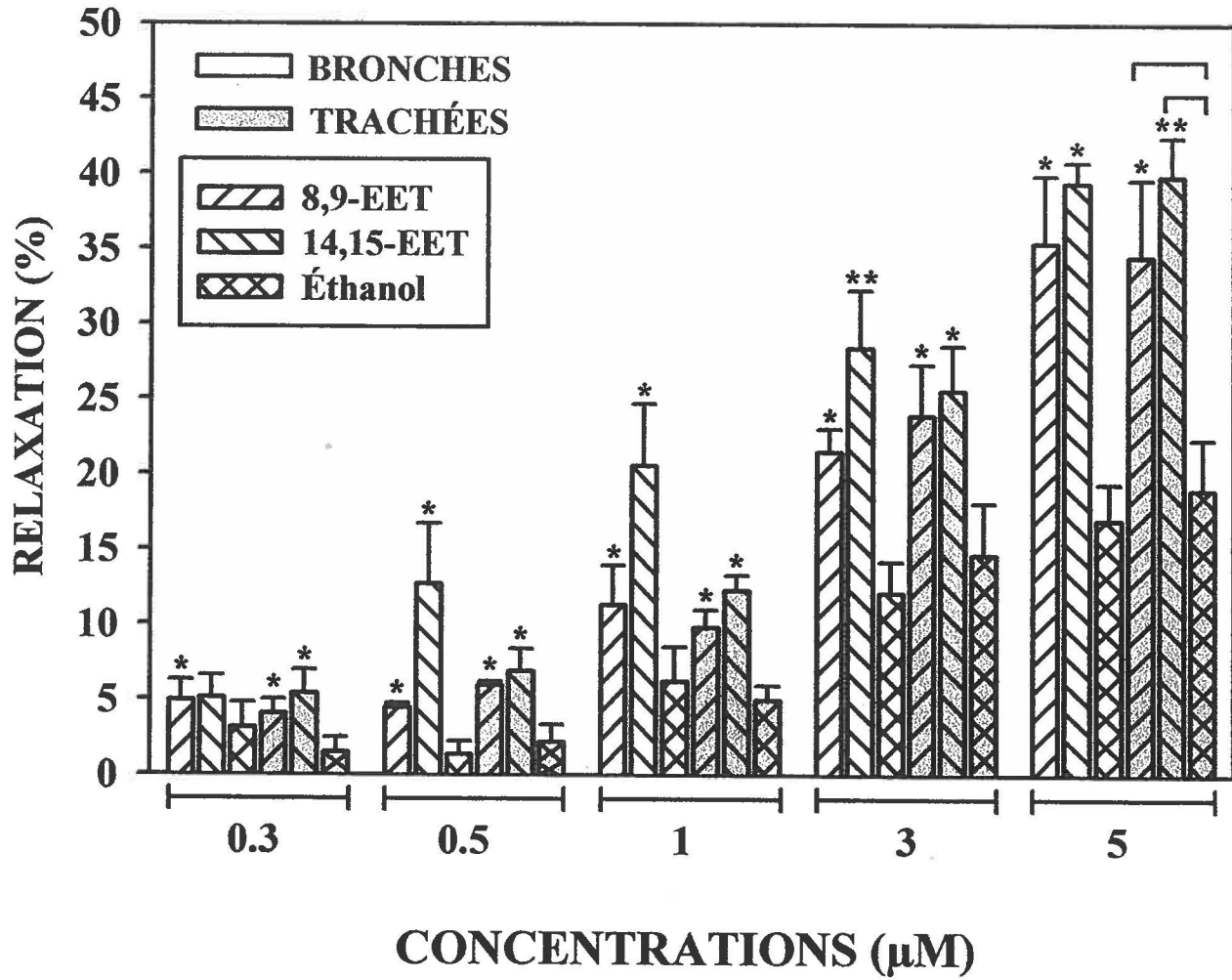
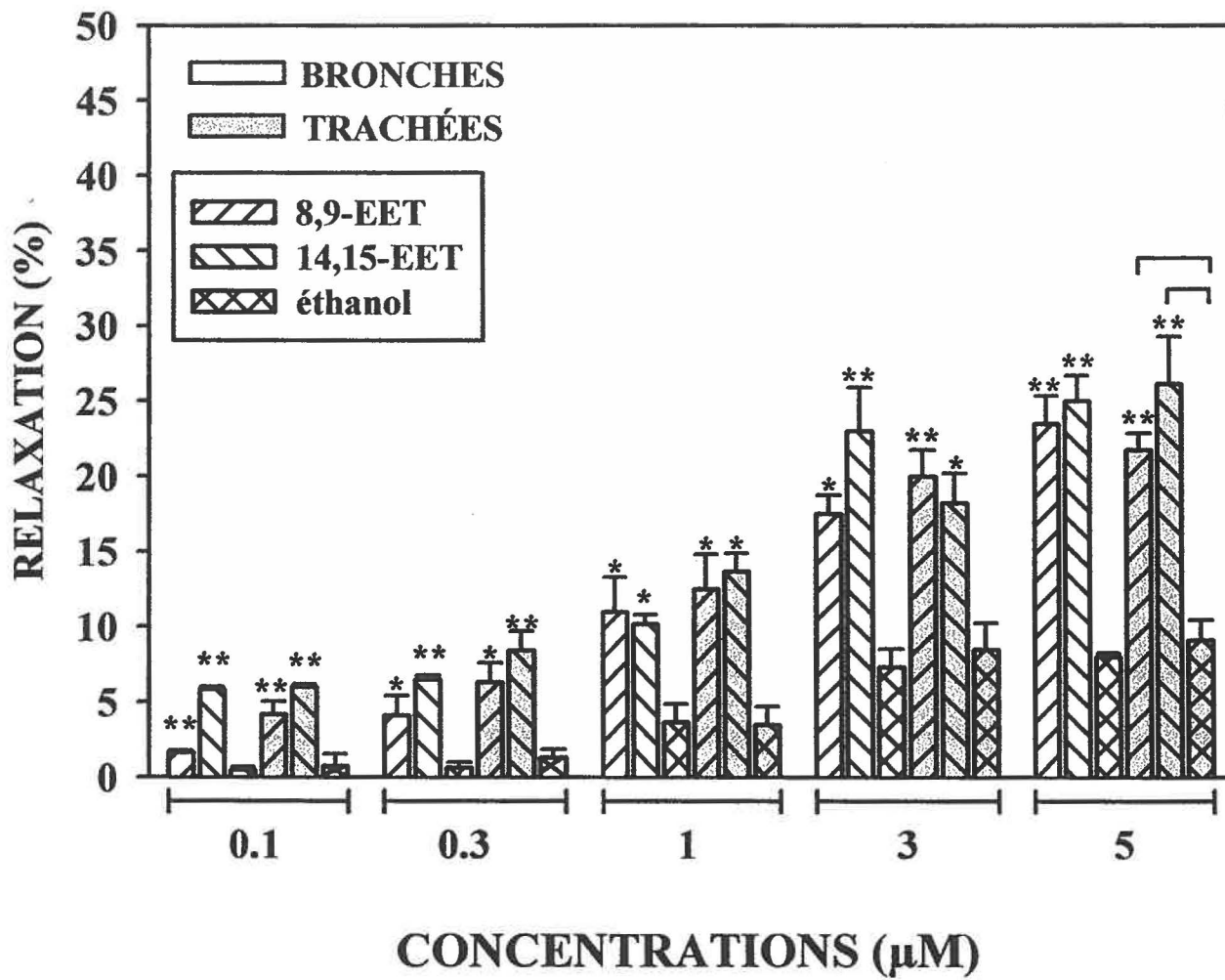


Figure 17 : Effets du 8,9- et du 14,15-EET sur des trachées et des bronches de cobayes sensibilisés.

Pourcentage de relaxation sur des trachées et des bronches, dépourvues de leur épithélium et précontractées avec 0.2 μ M de CCh, induit par l'addition de 8,9- EET, 14,15-EET ou de leur solvant (EtOH). À une concentration de 5 μ M le 8,9-EET relaxe les trachées et les bronches de cobayes de respectivement $21.8 \pm 1.1\%$ et $23.5 \pm 1.8\%$. À une concentration de 5 μ M le 14,15-EET relaxe les trachées et les bronches de cobayes de respectivement $26.1 \pm 3.1\%$ et $25.0 \pm 1.7\%$. Pour des concentrations de 0.3, 1, 3 et 5 μ M EET les volumes maximaux de véhicule sont 4, 12, 40 et 67 μ l correspondant à 0.1, 0.33, 1 et 1.7% de véhicule soit respectivement 17.12, 51.36, 171.2 et 291 mM d'EtOH. * signifie que la valeur de relaxation est significativement plus grande que la valeur de relaxation pour le véhicule seul avec $P < 0.05$ ou ** avec $P < 0.001$. (n = 3-7)



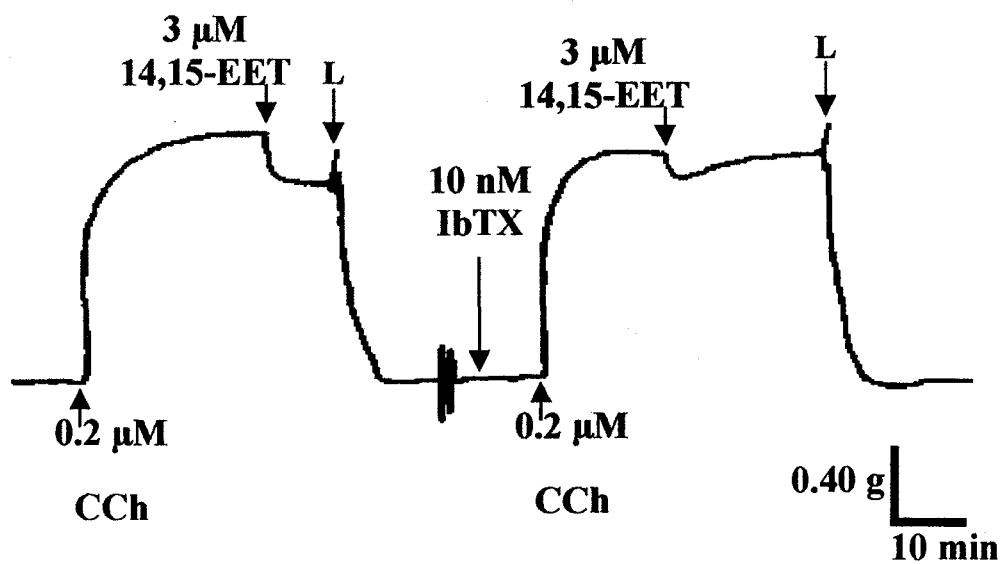
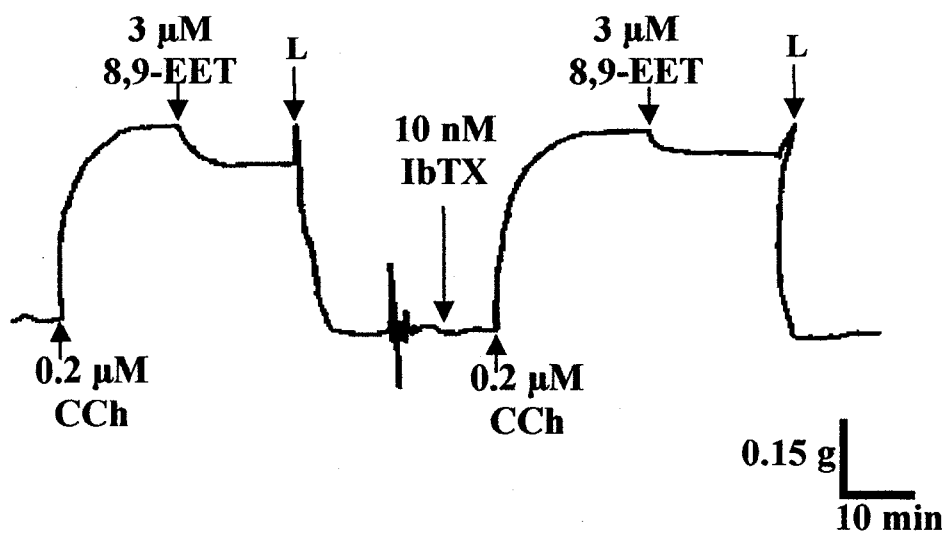
L'application de 0.1 μM à la concentration minimale testée le 8,9- et le 14,15-EET relaxent les trachées de respectivement $4.2 \pm 1\%$ et $6.0 \pm 0.2\%$ et relaxent les bronches de respectivement $1.7 \pm 0.1\%$ et $5.8 \pm 0.2\%$. À la concentration maximale testée (5 μM) le 8,9- et le 14,15-EET relaxent les trachées de respectivement $21.8 \pm 1.1\%$ et $26.1 \pm 3.1\%$ et relaxent les bronches de respectivement $23.5 \pm 1.8\%$ et $25.0 \pm 1.7\%$. Les différences de pourcentage de relaxation entre les trachées et les bronches précontractées au CCh ne sont pas significatives. À ces deux concentrations (0.1, 5 μM) le solvant seul (EtOH) relaxe significativement moins les tissus que les EETs ($0.5 \pm 0.2\%$, $0.8 \pm 0.8\%$, $8.0 \pm 0.2\%$, $9.1 \pm 1.4\%$).

3.1.3 Effet de l'IbTX sur la relaxation induite par les EETs sur des trachées et bronches d'animaux sains et d'animaux sensibilisés

Lorsqu'il y a dépolarisation du potentiel de membrane d'une cellule celle-ci se contracte et l'ouverture des canaux tels que les canaux K_{Ca} permettent la repolarisation de son potentiel membranaire et ainsi la relaxation de la cellule. Afin de vérifier l'implication des canaux K_{Ca} dans la relaxation observée avec les EETs un prétraitement des tissus a été effectué avec de l'IbTX, un bloqueur spécifique des canaux K_{Ca} . Ainsi 10 nM IbTX ont été ajoutés au bain d'organe avant l'application de 0.2 μM CCh. Suite à l'obtention d'un plateau de la tension mécanique, la relaxation a été induite par l'addition de 3 μM d'EET. Les figures 18A et B représentent des traces de mesures de tension obtenues en présence ou en absence d'IbTX avec du 8,9-EET (A) ou du 14,15-EET (B). Les traces montrent tout d'abord l'effet relaxant des EETs en condition de contrôle (sans IbTX) et en présence d'un prétraitement de 10 nM

Figure 18 : Effet relaxant du 8,9- et du 14,15-EET sur des muscles lisses respiratoires précontractés de cobayes.

A : trace représentative d'une mesure de tension musculaire isométrique de bronches dénudées mécaniquement d'épithélium et précontractées au CCh (0.2 μ M). 3 μ M de 8,9-EET ont été appliqués sur des tissus en absence et en présence d'un prétraitement de 10 nM d'IbTX. B : trace représentative d'une mesure de tension musculaire isométrique de bronches sans épithélium et précontractées au CCh (0.2 μ M). 3 μ M de 14,15-EET ont été appliqués sur des tissus en absence et en présence d'un prétraitement de 10 nM d'IbTX. L représente le lavage des tissus avec une solution Krebs oxygénée à 37°C.



d'IbTX appliqué dans le bain avant la CCh. L'IbTX diminue la relaxation induite par les EETs. La figure 19A montre la quantification de la relaxation des tissus sains (à gauche) et sensibilisés (à droite) dénudés de leur épithélium en absence (contrôle) et en présence d'IbTX (hachuré). Tel qu'indiqué à la figure 19B, le prétraitement à l'IbTX des tissus sains ou sensibilisés entraîne une diminution de la relaxation soulignant l'implication des canaux K_{Ca} dans le mécanisme de la relaxation induit par les EETs dans les deux conditions expérimentales. Par contre, cette inhibition de la relaxation n'étant pas totale (environ 50% pour les 8,9-, 11,12- et 14,15-EETs), il semble clair que des mécanismes autres que l'activation des canaux K_{Ca} soient impliqués dans la relaxation. Par contre, l'IbTX a relativement plus d'effet sur les tissus sains (50%) que sur les tissus d'animaux sensibilisés à l'ovalbumine (<40%).

3.1.4 Effet concentration-réponse du 8,9- et 14,15-EET sur la relaxation des trachées et des bronches de cobayes saines et sensibilisées

La figure 20 montre des courbes concentration-réponse des effets du 8,9- et du 14,15-EET sur la relaxation du muscle lisse respiratoire sans épithélium de trachées et de bronches de cobayes sains et sensibilisés. Les paramètres dérivés de la courbe de Hill suivaient l'équation 3 décrite ci-dessous.

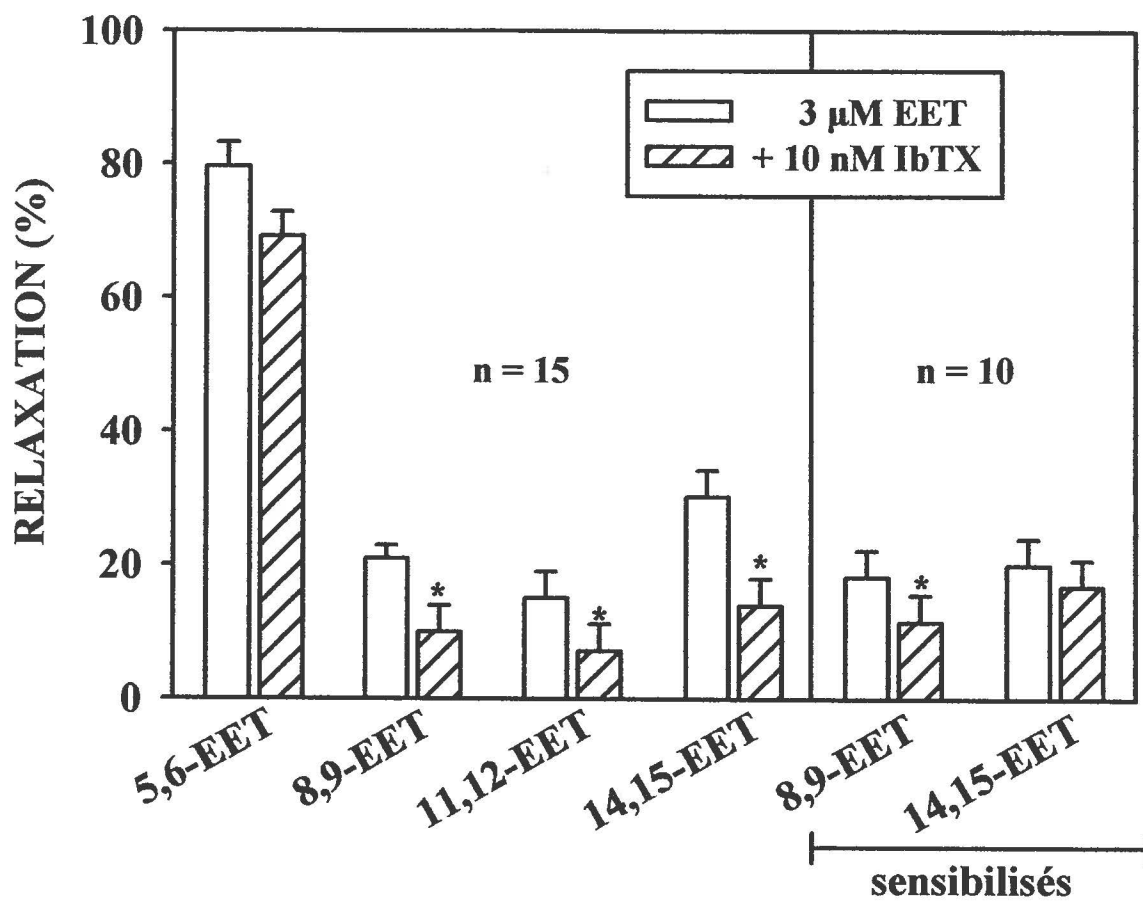
$$\text{Éq.3} \quad y = (ax^b/[c^b + x^b]) + d$$

Où a correspond à l'amplitude de l'effet, b correspond au coefficient de Hill, c est la valeur de l' EC_{50} et d est le minimum asymptotique.

Figure 19 : Effet d'un prétraitement à l'IbTX sur la relaxation induite par les EETs sur des muscles lisses respiratoires de cobayes normaux ou sensibilisés.

A : analyse quantitative de l'effet des régioisomères d'acides époxyeicosatriénoïque sur l'amplitude de la relaxation sur des tissus sains pour tous les régioisomères d'acide époxyeicosatriénoïque (gauche) ou sensibilisés pour le 8,9- et le 14,15-EET (droite) en absence ou en présence d'IbTX (10 nM), un bloqueur spécifique des canaux potassiques dépendant du calcium de grande conductance (K_{Ca}). B : analyse quantitative du pourcentage d'inhibition de la relaxation induite par les quatre régioisomères sur des tissus sains (gauche) ou sensibilisés (droite). Les résultats sont la moyenne \pm SEM de $n = 10-15$. * signifie que la valeur de relaxation est significativement plus grande que la valeur de relaxation pour le véhicule seul avec $P < 0.05$.

A



B

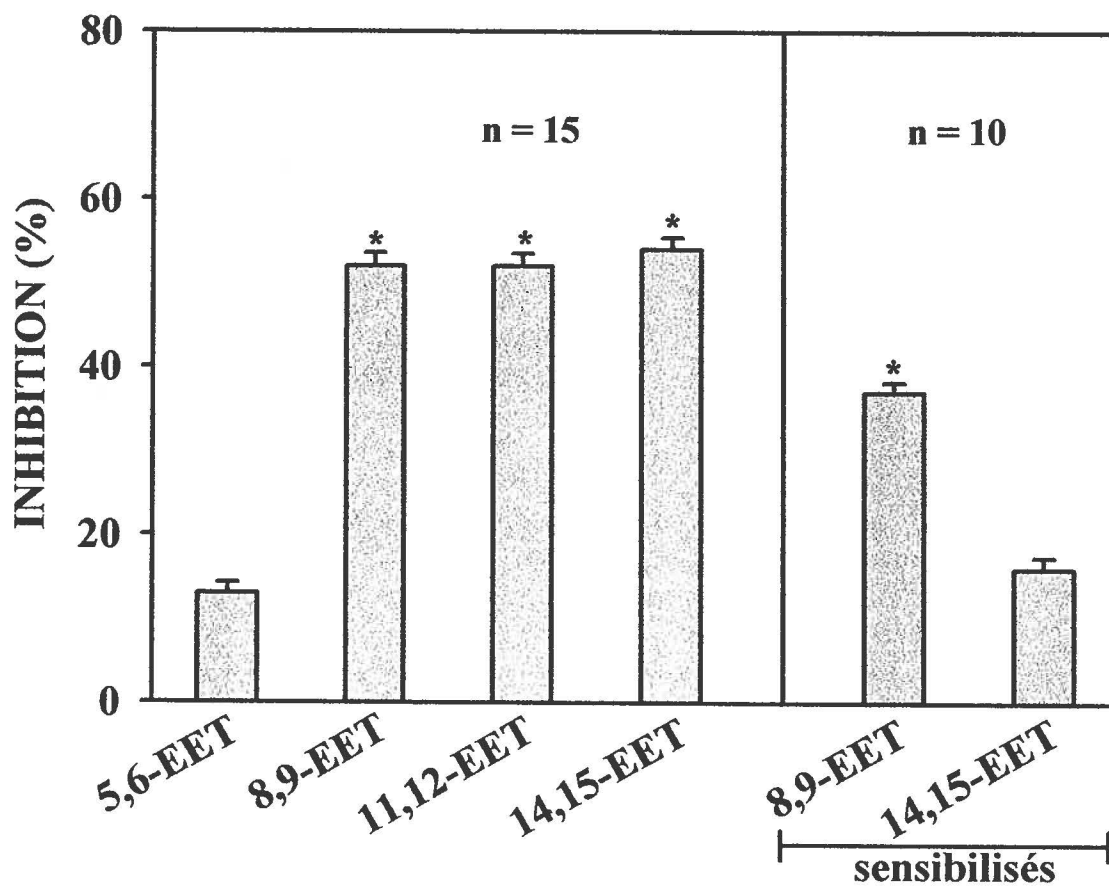
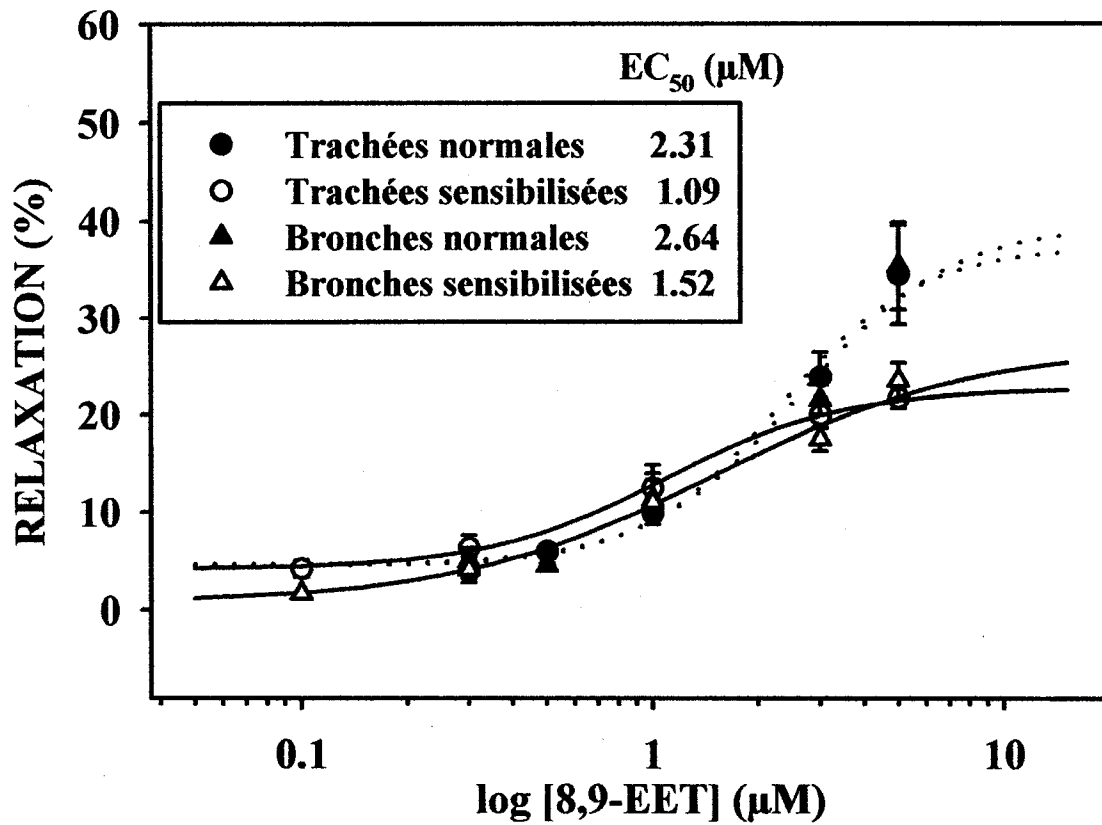


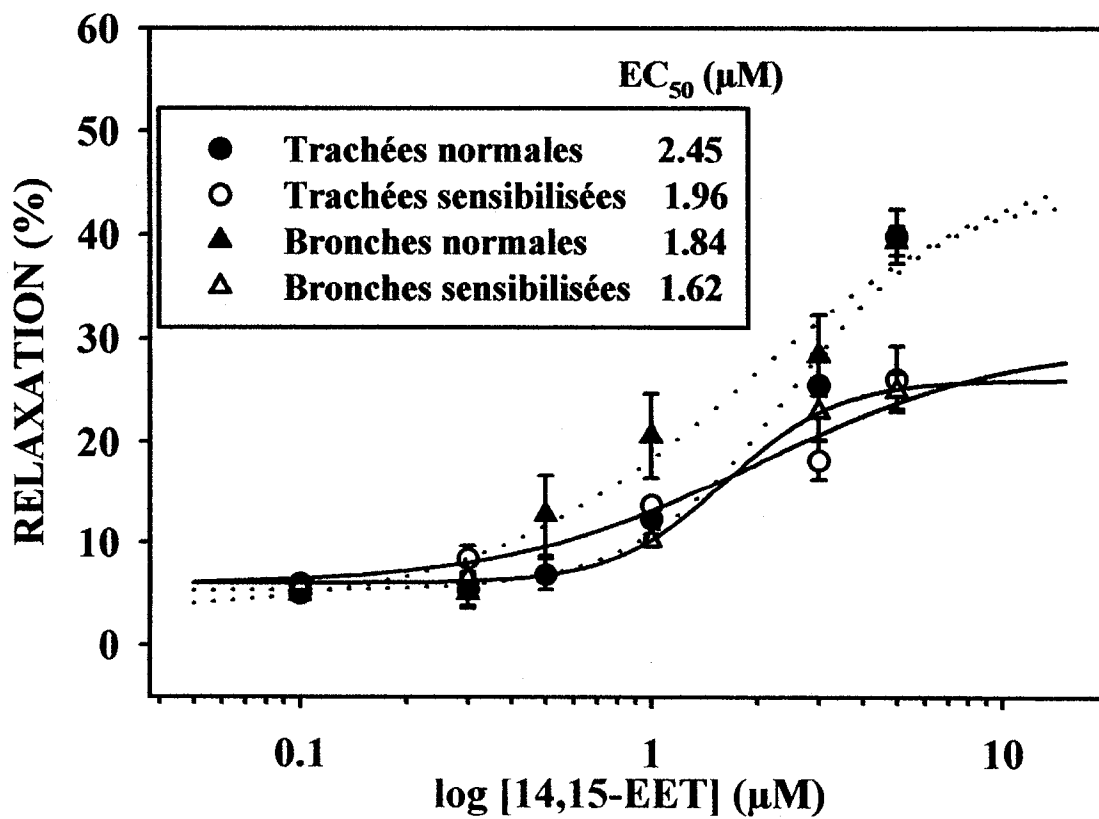
Figure 20: Effets du 8,9- et du 14,15-EET en fonction de la concentration sur la relaxation des trachées et des bronches de cobayes normaux et sensibilisés.

A : courbe concentration-réponse cumulative pour le 8,9-EET sur des trachées et des bronches de cobayes sains (n = 5- 18) et de cobayes traités selon le protocole de sensibilisation (n = 3-9). B : courbe concentration-réponse cumulative pour le 14,15-EET sur des trachées et des bronches de cobayes sains (n = 8-21) et de cobayes traités selon le protocole de sensibilisation à l'ovalbumine (n = 3-8). Les valeurs de relaxation ont été obtenues suite à l'application de 8,9- ou de 14,15-EET sur des tissus précontractés avec 0.2 μ M de CCh. Les paramètres sont dérivés de l'équation de Hill (Éq.3).

A



B



La comparaison entre les résultats obtenus pour les trachées et les bronches saines montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux tissus en ce qui concerne leur relaxation par le 8,9- et le 14,15-EET. Par contre, il y a une différence significative entre la relaxation des tissus sains et des tissus sensibilisés aux concentrations maximales d'EET testées dans nos expériences. Les courbes montrent qu'à partir de 3 μM que ce soit pour le 8,9- ou le 14,15-EET, elles se dissocient clairement et tendent à atteindre deux plateaux significativement différents. À la concentration maximale testée (5 μM), les effets maximaux observés pour les animaux sains et sensibilisés sont clairement différents. De plus, les valeurs d' EC_{50} déterminées à partir des courbes concentration-réponse des relaxations induites par le 8,9-EET sur les trachées et les bronches, saines et sensibilisées, (dénudées de leur épithélium) et précontractées avec 0.2 μM de CCh. Ces courbes concentration-réponse (Fig. 20A) montrent que les tissus sensibilisés ont des valeurs d' EC_{50} plus faibles (soit 1.52 μM pour les trachées et 1.09 μM pour les bronches) que les valeurs d' EC_{50} des tissus sains (soit 2.64 μM pour les trachées et 2.31 μM pour les bronches). Cet effet, qui est plus marqué pour le 8,9-EET, est aussi observable avec le 14,15-EET. Ainsi les résultats obtenus avec le 14,15-EET pour les trachées saines et sensibilisées donnent des valeurs d' EC_{50} de 1.84 et 2.45 μM et des valeurs d' EC_{50} de 1.62 et 1.96 μM pour les bronches saines et sensibilisées (Fig. 20B). Les muscles lisses respiratoires de trachées et de bronches de cobayes traitées à l'ovalbumine semblent être plus sensibles aux effets des EETs, mais les relaxations maximales obtenues avec une concentration de 5 μM d'EET sont plus faibles. Il est à noter que l'effet du solvant (EtOH 100%) est significativement le même sur les tissus sains et sensibilisés, cette différence de sensibilité entre les tissus sains et traités à l'ovalbumine ne peut donc pas être attribuée à un effet du solvant.

3.2 Mesures du potentiel de membrane

3.2.1 Effet du 8,9- et du 14,15-EET sur le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses de trachées de lapins

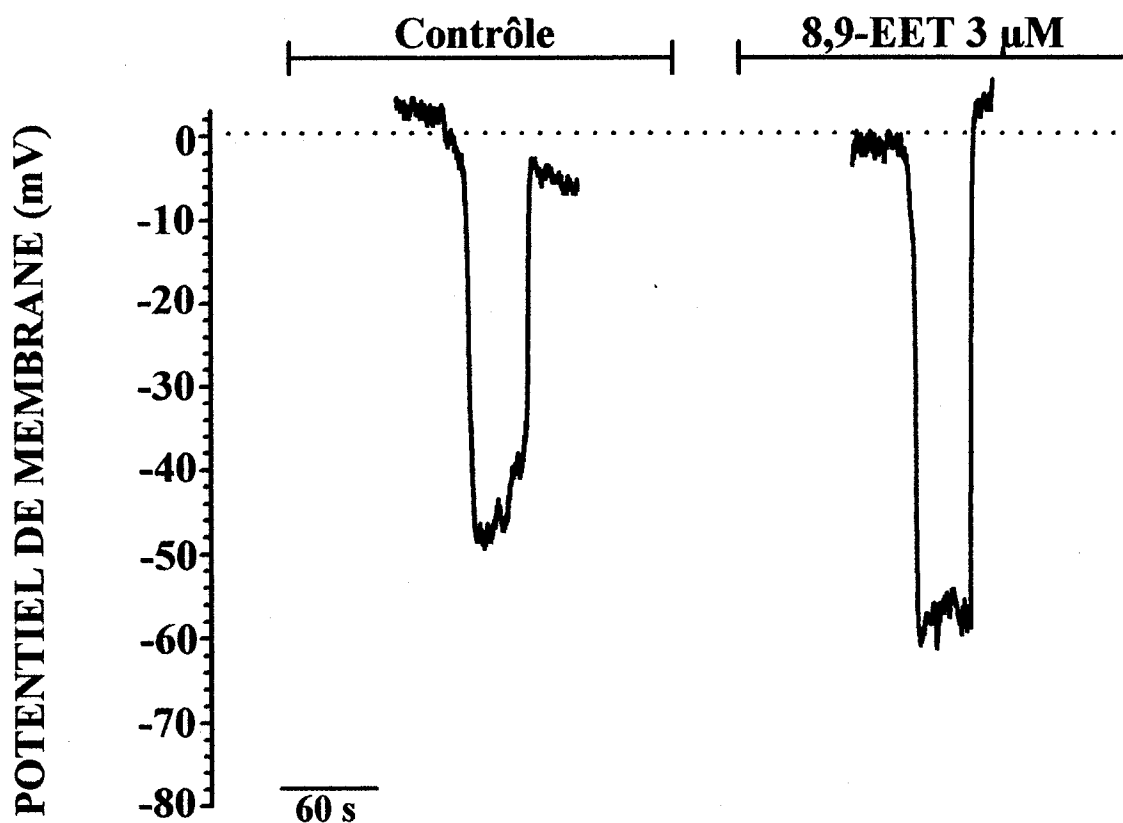
Lors de la relaxation, le potentiel de membrane des cellules des MLVRs devient souvent plus négatif et il est possible d'observer une hyperpolarisation. Ainsi pour vérifier si la relaxation provoquée par les EETs implique une hyperpolarisation des cellules des MLVRs ; la technique de microélectrodes classiques a été utilisée. Lorsque le tissu se trouve dans une solution de Tyrode oxygénée, à 37°C et à un pH 7.4, le potentiel de repos moyen des cellules musculaires des trachées de lapin sans épithélium est de -50 ± 1.7 mV. Lorsque l'épithélium recouvrant les cellules des MLVRs est intact, le potentiel de membrane moyen des cellules musculaires au repos est de -60 ± 1.3 mV. Les résultats sont la moyenne \pm SEM de $n = 45$.

Pour vérifier l'effet des EETs exogènes sur le potentiel de membrane, des tissus sans épithélium ont été utilisés. L'application de 3 μ M de 8,9- et de 14,15-EET dans la chambre de perfusion provoque des hyperpolarisations -12 ± 3.5 et -16 ± 3.0 mV du potentiel de membrane, ce qui représente une forte hyperpolarisation (Fig. 21). Les paramètres des courbes concentration-réponse aux EETs ont été dérivés de l'équation de Hill (Éq.3). Les valeurs d' EC_{50} du 8,9- et du 14,15-EET sont très semblables soient respectivement 0.14 et 0.13 μ M. Les hyperpolarisations provoquées

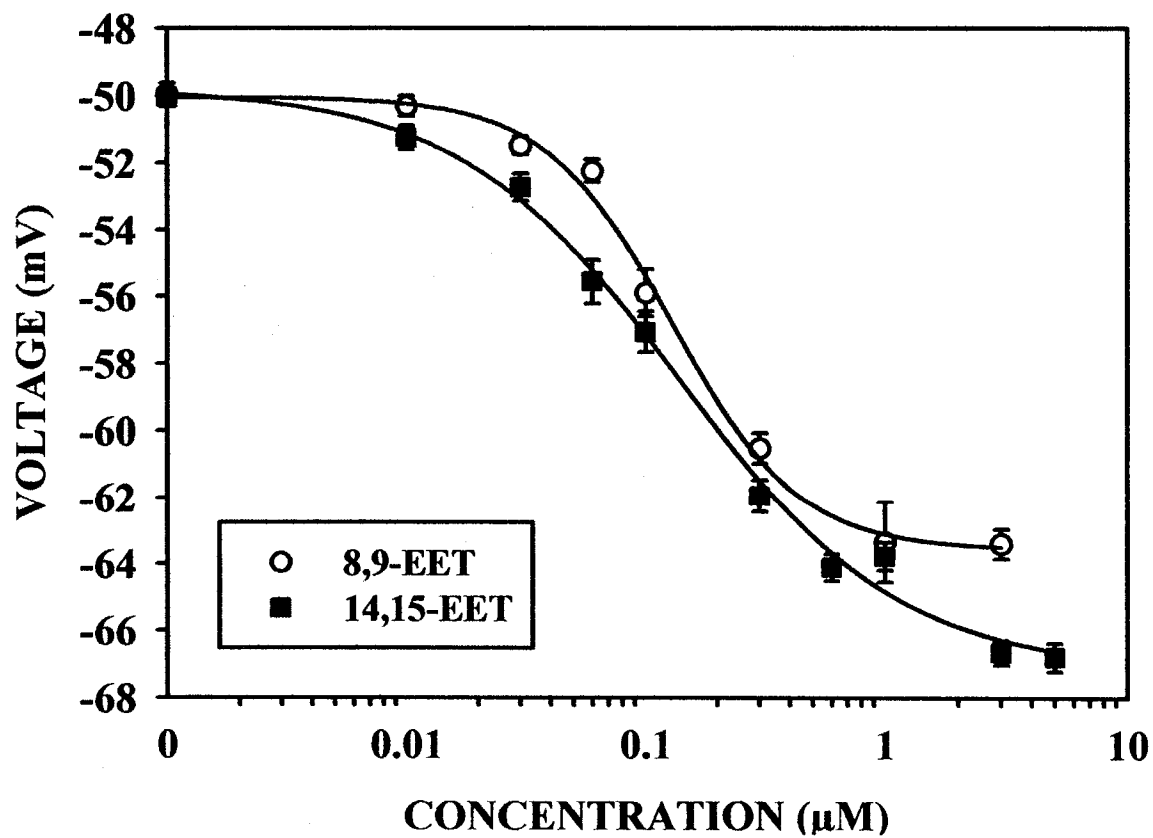
Figure 21 : Courbe concentration-réponse du 8,9- et 14,15-EET sur le potentiel de membrane de cellules du MLVR en absence d'épithélium.

A : Traces représentatives de deux impalements effectuées à l'aide de la technique de microélectrodes en absence (contrôle) et en présence de 8,9-EET. B : Les valeurs moyennes des variations de potentiel de membrane ont été mesurées en présence de 8,9- (O) et de 14,15-EET (■). Les valeurs d' EC_{50} ainsi que les valeurs de coefficient de Hill ont été dérivées de l'équation 3 et sont de respectivement 0.14 et 0.13 μM et 1.64 et 0.94. Chaque concentration d'EETs a été testée sur au moins 3 tissus indépendants. (n = 45)

A



B



par les EETs sont complètement réversibles suite à une perfusion de 20 minutes dans la solution de Tyrode oxygénée, à 37°C, pH 7.4. Dans les mêmes conditions, le solvant (EtOH) n'a pas d'effet détectable sur le potentiel de membrane des cellules des MLVRs.

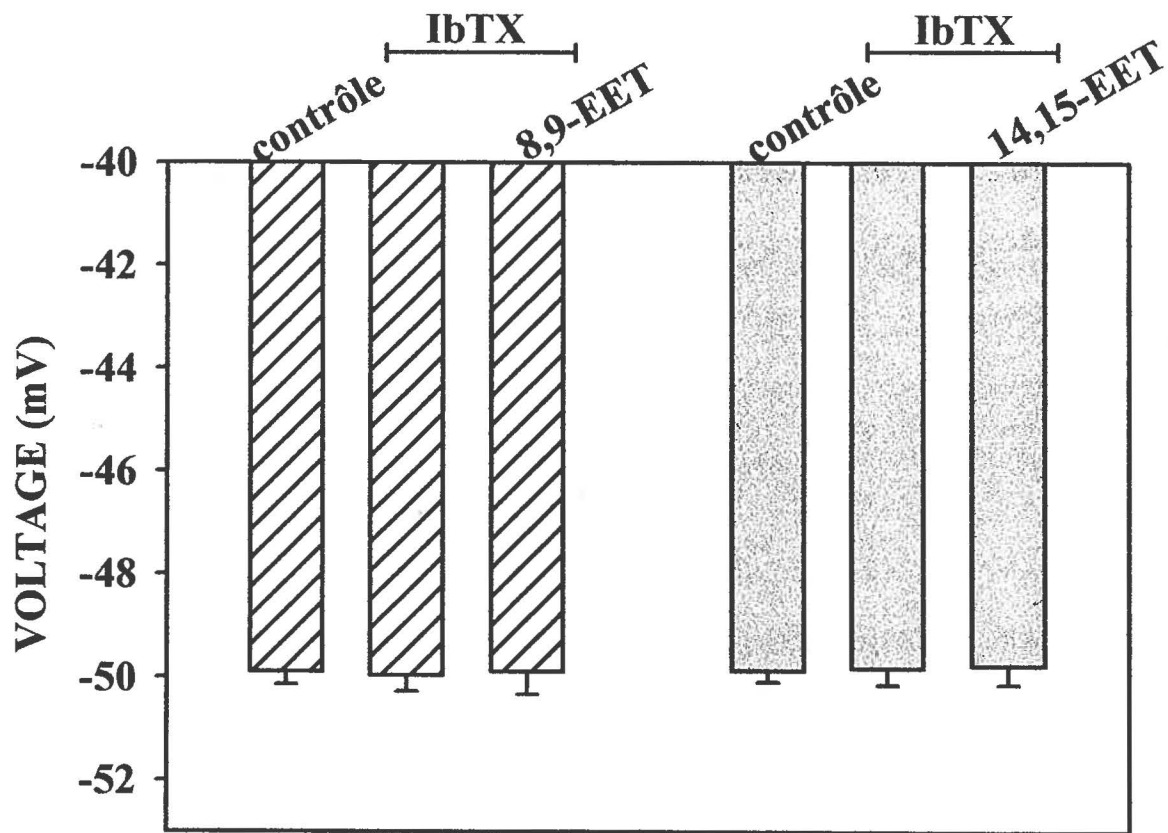
3.2.3 Effet de l'IbTX sur l'hyperpolarisation induite par les EETs.

Pour vérifier l'implication des canaux K_{Ca} dans l'hyperpolarisation du potentiel de membrane provoquée par les EETs, un prétraitement de 10 nM d'IbTX a été utilisé. L'IbTX a été perfusée dans la chambre du montage de microélectrodes durant 20 minutes. Comme l'indique la figure 22A, 10 nM IbTX n'affecte pas le potentiel de repos des cellules musculaires lisses sans épithélium. Par contre, l'application subséquente des EETs à la chambre de perfusion montre qu'un prétraitement de 10 nM d'IbTX empêche complètement l'hyperpolarisation provoquée par le 8,9- et le 14,15-EET à leur valeur d' EC_{50} respective (Fig. 22A). Cette hyperpolarisation du potentiel de membrane des MLVRs de lapin est abolie par l'application subséquente de 10 nM d'IbTX. La figure 22B montre que les hyperpolarisations induites par le 8,9- ou le 14,15-EET (-57.3 et -59.1 mV) à leur valeur EC_{50} respective, sont complètement annulées par l'application d'IbTX et la valeur du potentiel de membrane retourne à celle du potentiel de membrane au repos (-50 ± 1.7 mV). Bien que les canaux K_{Ca} semblent être impliqués dans l'hyperpolarisation tel que révélé par l'effet de l'IbTX, d'autres mécanismes cellulaires sont responsables de la relaxation des muscles lisses respiratoires puisque le potentiel de membrane est beaucoup plus sensible à l'effet des EETs que la relaxation. Les expériences sur le potentiel de membrane ainsi que celles sur la relaxation ont été faites en utilisant les EETs dans

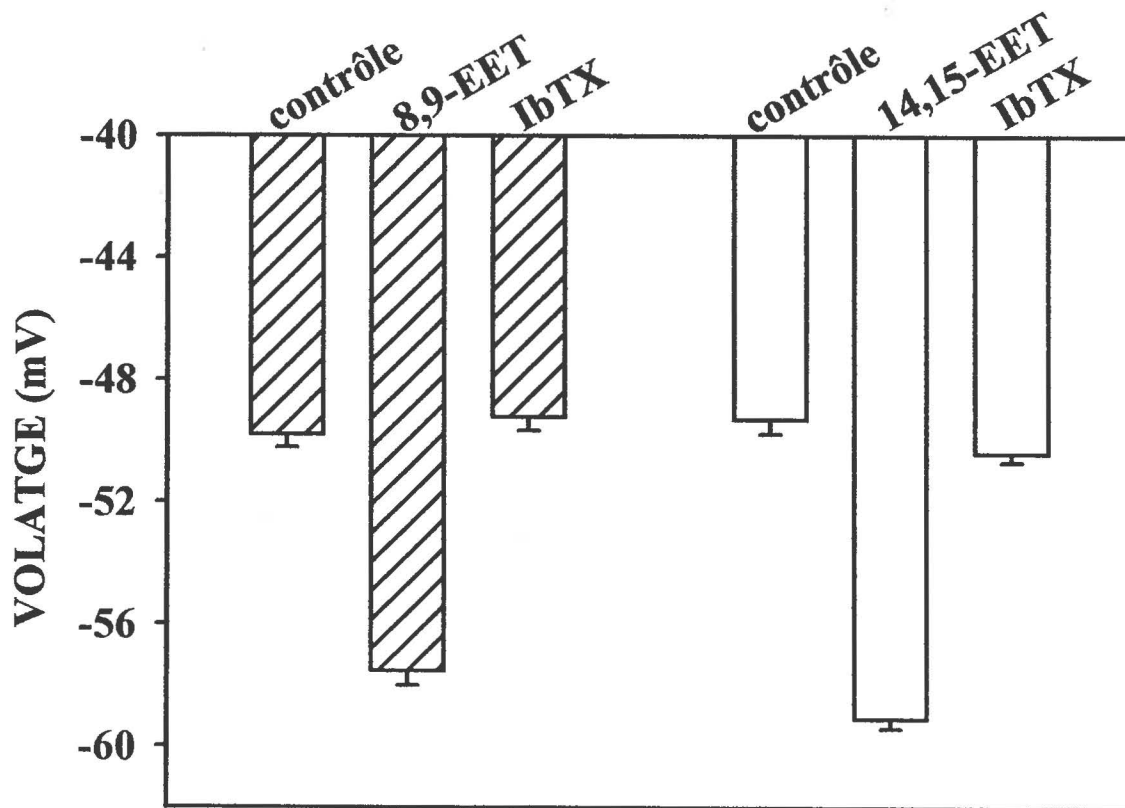
Figure 22 : Valeurs moyennes du potentiel de membrane suite à l'application d'IbTX seule, avant et après l'application de 8,9- et de 14,15-EET.

A : 10 nM d'IbTX ont été ajoutés à la chambre de perfusion avant l'addition des EETs. Ce prétraitement à l'IbTX prévient l'hyperpolarisation induite soit par le 8,9- ou le 14,15-EET. Les EETs ont été ajoutés selon leur valeur d' EC_{50} respective (0.14 et 0.13 μ M). 10 nM d'IbTX seule n'influence pas le potentiel de membrane de repos (-49.3 mV; n = 60). B : Le 8,9- ou le 14,15-EET ajoutés à la chambre de perfusion selon leur valeur d' EC_{50} induisent des hyperpolarisations de -57.33 et -59.09 mV, respectivement. Ces hyperpolarisations sont complètement renversées par l'application ultérieure de 10 nM d'IbTX. Chaque concentration d'EET ou d'IbTX a été testée sur au moins 3 tissus indépendants sur lesquels 15 empacements consécutifs et indépendants ont été effectués. (n = 45)

A



B



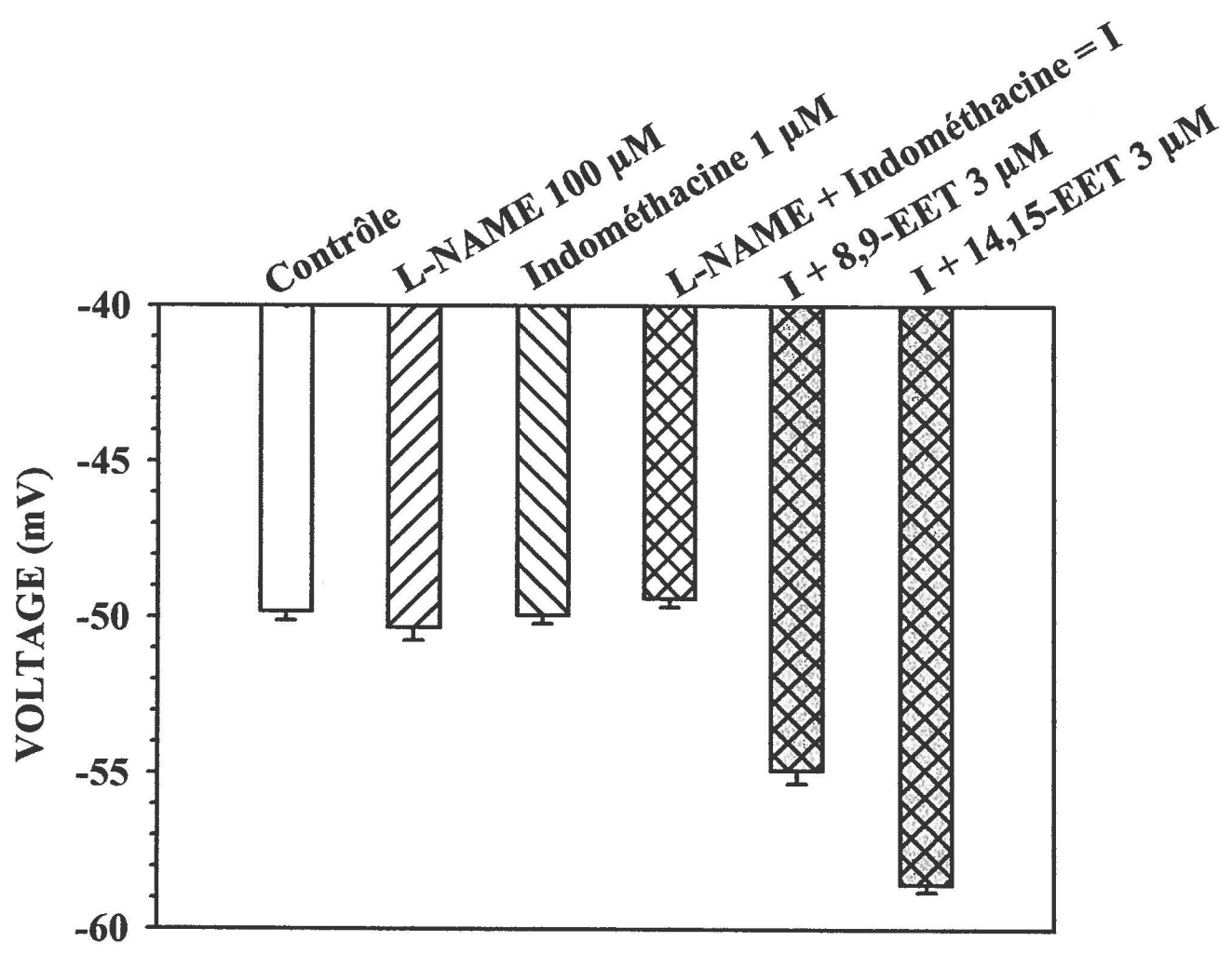
l'EtOH selon les mêmes concentrations. Par contre, tels que le démontrent les résultats obtenus pour les effets de l'EtOH 100% sur la relaxation et sur l'hyperpolarisation des cellules des MLVRs. La relaxation est sensible au solvant puisqu'il semble être responsable d'environ 20% de l'effet des EETs sur la relaxation contrairement au potentiel de membrane qui ne varie pas significativement en présence des mêmes concentrations d'EtOH. Il est donc possible qu'une partie de la différence observée entre les effets des EETs au niveau de la relaxation et de l'hyperpolarisation soit attribuable à l'effet de l'EtOH sur les tissus.

3.2.4 Effets d'inhibiteurs de NOS et COX sur hyperpolarisation induite par les EETs

Le tonus des MLVRs est modulé par plusieurs phénomènes électrophysiologiques et par des métabolites actifs tels que les PGs. Les effets de ces molécules sur les MLVRs ont été bien identifiés. Ainsi les PGs provoquent une relaxation du MLVR via une hyperpolarisation. Le NO induit une relaxation du MLV via une hyperpolarisation (Roman et al., 1999). Pour être considéré comme un facteur hyperpolarisant dérivé de l'épithélium une molécule ne doit pas être issue de l'action de ces deux enzymes (NOS et COX). Par conséquent, afin de s'assurer que les hyperpolarisations du MLVR observées lors de l'application des EETs n'étaient pas causées par la production de NO ou de PG, nous avons effectué des mesures de potentiels de membrane en présence d'inhibiteurs de la NOS et de la COX soit le L-NAME et l'indométhacine. La figure 23 montre les mesures de potentiel de membrane de trachées de lapin dénudées d'épithélium obtenues en présence de L-NAME, d'indométhacine et de 8,9- ou 14,15-EET (contrôle : -49.8 ± 0.3 mV,

Figure 23 : Hyperpolarisations produites par les EETs en présence de L-NAME et d'indométhacine.

L'application de 100 μM de L-NAME ou de 1 μM d'indométhacine, inhibiteurs respectifs des enzymes NOS et COX, seuls ou appliqués simultanément, ne provoque pas de changements significatifs du potentiel de membrane en conditions de contrôle soit de Tyrode barboté normale (contrôle : -49.8 ± 0.3 mV, L-NAME : -50.3 ± 0.4 mV et indométhacine: -49.9 ± 0.3 mV). Par contre, l'application de 8,9- et de 14,15-EET (3 μM) induit une hyperpolarisation des MLVRs malgré la présence combinée de ces deux inhibiteurs (I). Les hyperpolarisations induites par le 8,9- ou le 14,15-EET sont de respectivement -54.9 ± 0.4 et -58.5 ± 0.2 mV. Chaque condition expérimentale a été testée sur au moins 3 tissus indépendants. Les résultats sont la moyenne \pm SEM de $n = 45$.



L-NAME : -50.3 ± 0.4 mV et indométhacine : -49.9 ± 0.3 mV). L'application de L-NAME ou d'indométhacine, seuls, ne fait pas varier le potentiel de membrane des MLVRs. De plus, l'application simultanée de ces inhibiteurs n'affecte pas le potentiel de membrane de façon significative (-49.4 ± 0.3 mV). Par contre, l'application de 8,9- ou de 14,15-EET en présence de ces inhibiteurs de NOS et de COX provoque des hyperpolarisations de -54.9 ± 0.4 et -58.5 ± 0.2 mV, respectivement. Ces hyperpolarisations sont moins importantes que celles obtenues en présence d'EETs seulement. En effet, à une concentration de 3 μ M le 8,9- et le 14,15-EET induisent des hyperpolarisations de -63.4 ± 0.5 et -65.3 ± 0.1 mV, respectivement.

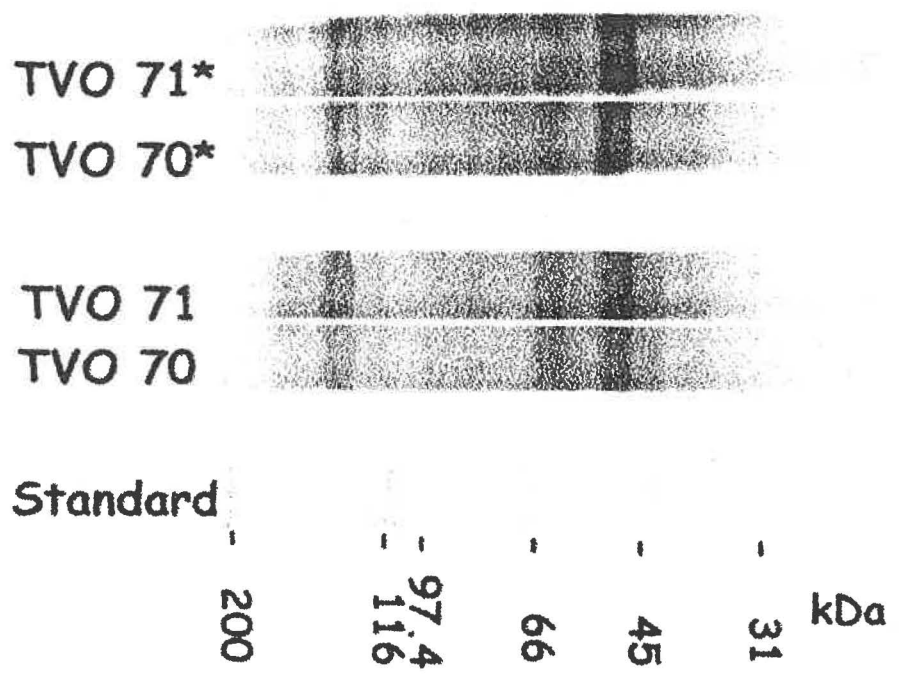
3.3 Résultat des expériences d'immunobuvardage

Afin de vérifier la présence des canaux K_{Ca} dans les préparations microsomales, une étude par immunobuvardage a été effectuée à l'aide d'anticorps spécifiques. La figure 24A montre une photographie digitalisée d'un gel 10% SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie pour révéler les différents profils protéiques des fractions microsomales, deux échantillons de préparation microsomale "TVO70" et "TVO71" en conditions non-réductrices et en conditions réductrices ont été séparés. Un standard a aussi été mis sur le gel pour permettre d'évaluer les poids moléculaires des différentes protéiques. La présence de plusieurs bandes démontre la composition protéique complexe des fractions microsomales. En conditions réductrices, on peut remarquer la présence d'une plus grande quantité de bandes car l'utilisation de l'agent réducteur permet la réduction des ponts disulfures. La figure 24B montre une photographie d'une membrane de nitrocellulose suite à une analyse par

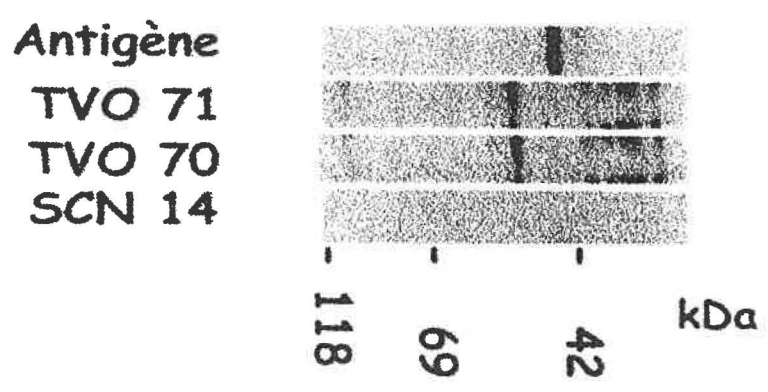
Figure 24 : Profil protéique de fractions microsomales sur un gel SDS 10% et un immunobuvardage faits avec des anticorps contre les canaux K_{Ca} .

A : séparation des protéines sur un gel SDS-PAGE 10% de deux préparations microsomales (TVO70 et TVO71) obtenues à partir de trachées de bœufs. Chaque colonne contient 40 μ g de protéines en conditions non-réductrices ou en conditions réductrices (+ 1 ou 2 mM de mercapthoéthanol *). Note : un standard (BioRad) a été utilisé pour permettre l'évaluation des poids moléculaires des protéines dans chaque échantillon. B : représentation d'un immunobuvardage sur membrane de nitrocellulose en présence d'anticorps contre les canaux K_{Ca} pour deux fractions microsomales (TVO70 et TVO71), un antigène (contrôle positif), SCN14 (contrôle négatif) et d'un standard. Les bandes expriment la présence de la partie C-terminale de la sous-unité α des canaux K_{Ca} dans les échantillons. Dans les deux préparations microsomales de trachées de bœufs, la présence d'une bande à 62 kDa souligne la présence du canal K_{Ca} et la présence d'une bande à 67 kDa souligne la présence de la portion C-terminale de la sous-unité α .

A



B



K_{Ca} . Cette préparation d'anti-canaux K_{Ca} est spécifique à la partie C-terminale de la sous-unité α du canal K_{Ca} . Deux préparations microsomales de trachées (TVO70 et TVO71) ainsi qu'un contrôle négatif (SCN14) et d'un contrôle positif (antigène) ont été traitées selon le même protocole. Tel qu'observé sur la membrane de nitrocellulose suite à une séparation sur un gel 10% SDS-PAGE, il y a présence d'une bande à 62 kDa correspondant à la partie C-terminale de la sous-unité α du canal K_{Ca} (Alioua et al., 1995). La présence de l'antigène permet d'observer une bande à 67 kDa représentant la sous-unité α du canal K_{Ca} de souris (mSlo). La différence de poids moléculaire pourrait provenir de différences interspécifiques, puisque notre préparation utilisait des tissus bovins et l'antigène provenait de tissus murins. De plus, l'anticorps a été produit à partir de la partie C-terminale de la sous-unité α du canal K_{Ca} et l'antigène était la protéine porteuse plus le segment antigène utilisés pour produire l'anticorps, son poids moléculaire est donc plus petit que celui des protéines canal présente dans la fraction microsomale de trachées de bœuf.

3.4 Reconstitution des canaux dans des bicouches lipidiques planes

3.4.1 Canaux potassiques de grande conductance dépendant du calcium

Comme le démontre les résultats les canaux K_{Ca} semblent être impliqués dans les phénomènes d'hyperpolarisation et de relaxation induits par les EETs des cellules des MLVRs. Puisque le traitement à l'IbTX, un bloqueur spécifique des canaux K_{Ca} , inhibe partiellement la relaxation des cellules des MLVRs et totalement l'hyperpolarisation de leur potentiel de membrane induites par les deux isomères testés systématiquement.

Les études en bicouche lipidique plane (BLP) ont permis de confirmer les effets directs des EETs sur des canaux K_{Ca} reconstitués. Ces canaux sont caractérisés par : une grande conductance (environ 250 pS), des blocages pharmacologiques par le TEA, par la ChTX et par l'IbTX. Ils ont aussi une dépendance au voltage et à la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} libre. Ces diverses caractéristiques des canaux K_{Ca} ont été étudiées dans notre laboratoire par Savaria et al. (1992), Alioua et al. (1995) et par Dumoulin et al. (1998). Dans cette étude seulement les dépendances au voltage et à la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} libre serviront à caractériser les canaux avant d'être soumis aux tests avec les deux EETs.

3.4.2 Caractérisation des canaux K_{Ca}

3.4.2.1 Courbe du courant en fonction du voltage

Avant de procéder à une étude pharmacologique des effets des EETs sur les canaux K_{Ca} reconstitués, les canaux ont été caractérisés selon leur dépendance au voltage. La courbe courant-voltage (Fig. 25) montre la variation de l'amplitude du courant unitaire en fonction du voltage appliqué en conditions asymétriques (\blacktriangle) (50/250 mM KCl *trans/cis*) et en conditions symétriques (\blacksquare) (250/250 mM KCl *trans/cis*). Dans cet exemple, les valeurs moyennes de conductance des canaux K_{Ca} reconstitués en conditions asymétriques et symétriques étaient de 219 et 292 pS, respectivement. Le potentiel d'inversion du courant en conditions asymétriques est -38 mV et 0 mV en conditions symétriques. Cette valeur de potentiel d'inversion est conciliable avec une bonne sélectivité des ions K^+ ; le potentiel d'équilibre (E_{K^+}) du K^+ en conditions asymétriques étant de -41 mV et le potentiel d'équilibre (E_{Cl^-}) du Cl^- en conditions asymétriques étant de +41.5 mV.

Figure 25: Courbe I/V moyenne des canaux K_{Ca} reconstitués en BLP à partir de fractions microsomales.

En conditions asymétriques 50/250 mM KCl *trans/cis* (n = 12) et en conditions symétriques 250/250 mM KCl *trans/cis* (n = 14). La pente des courbes représente la conductance moyenne (γ) des canaux, en picoSiemens (pS), 219 pS en conditions asymétriques et 292 pS en conditions symétriques.

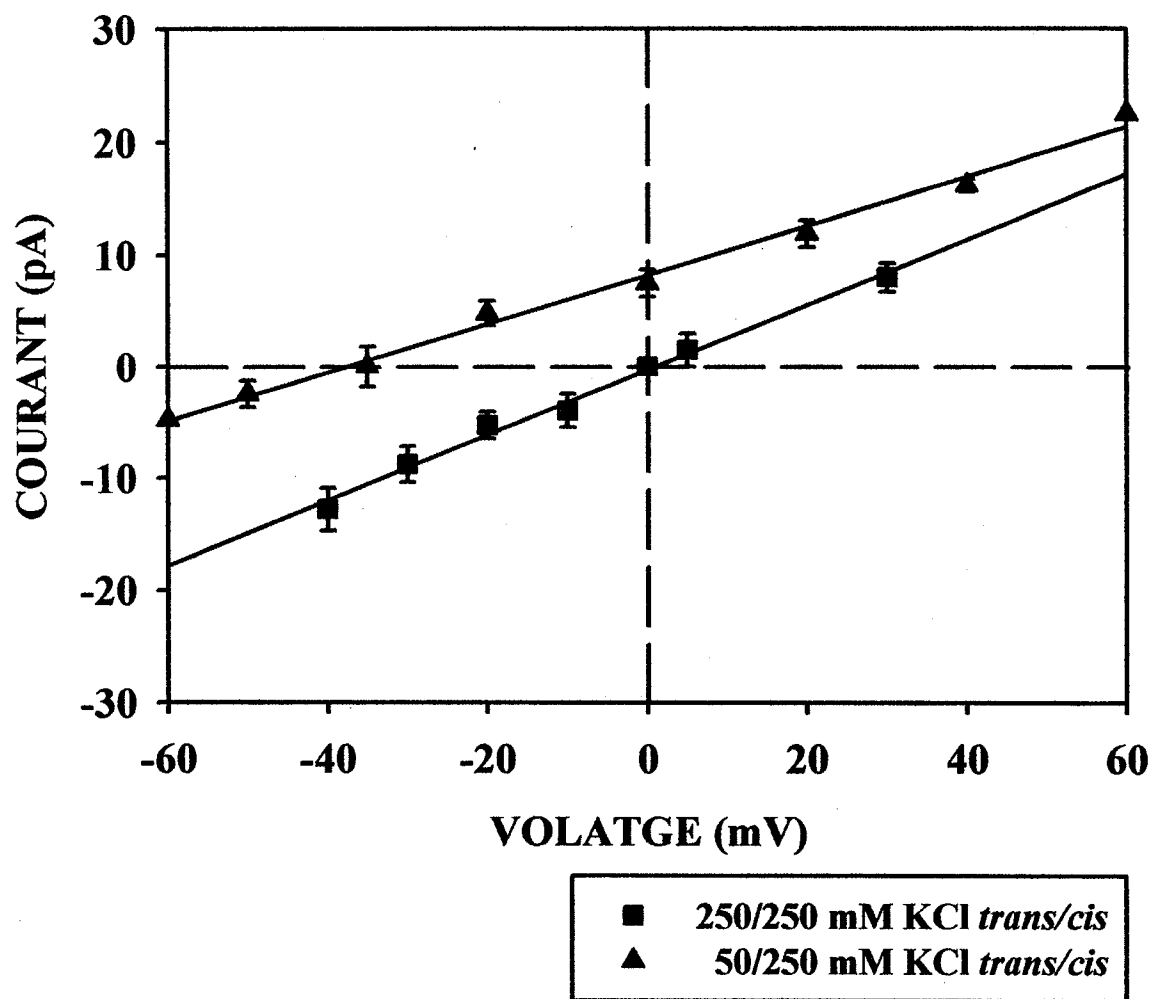
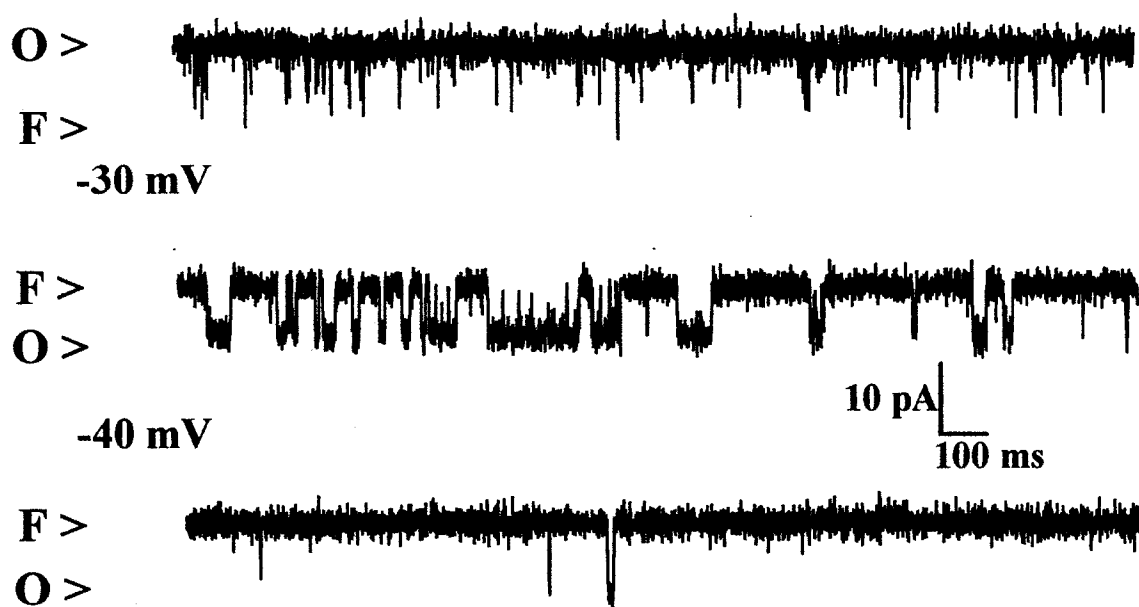


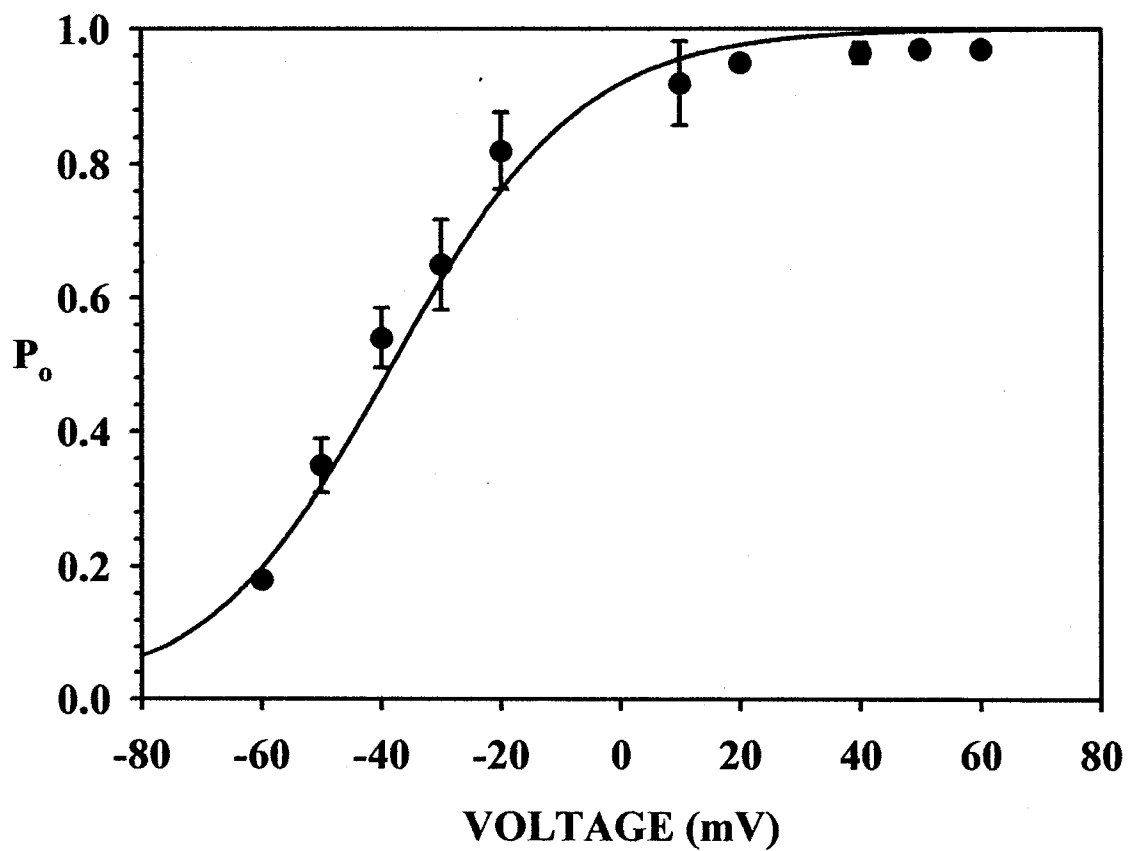
Figure 26 : Variation de l'activité des canaux K_{Ca} reconstitués en BLP en fonction du voltage.

A : les traces représentent un courant unitaire obtenu en conditions symétriques (250 mM KCl *trans/cis*) et avec 10 μ M de $[Ca^{2+}]_{trans}$ libre, pH 7.4. Sur les traces la lettre O signifie que le canal est ouvert et la lettre F signifie qu'il est fermé. B : quantification de la dépendance au voltage de plusieurs canaux K_{Ca} ($n = 6$), les résultats ont été obtenus en conditions symétriques et avec 10 μ M de $[Ca^{2+}]_{trans}$ libre. Les résultats en B représente la moyenne \pm SEM sur 6 expériences. Notez qu'à 0 mV il n'y a pas de valeur mesurée ni mesurable le courant net étant nul.

+40 mV, 250/250 mM KCl *trans/cis*, 10 μ M (Ca²⁺)_{trans} libre



3



3.4.2.2 Comportement des canaux K_{Ca} en fonction du voltage

La figure 26 décrit la dépendance au voltage des canaux K_{Ca} en présence de 10 μM de Ca^{2+} libre *cis* et *trans*. Les traces présentées en 26A illustrent le comportement typique de P_o des canaux K_{Ca} en présence de 10 μM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intracellulaire}}$ libre. Les canaux sont très actifs à des potentiels positifs (+40 mV) et leur probabilité d'ouverture diminue progressivement lorsque le voltage diminue. À des voltages négatifs < à -40 mV, les courants sont inversés et la probabilité d'ouverture des canaux est faible. En conditions symétriques, la valeur du potentiel de zéro courant est à 0 mV. Les paramètres de P_o en fonction du voltage ont été dérivés à l'aide d'une équation de type Boltzmann (Éq.4) ; où V_m est le voltage, $V_{1/2}$ est le voltage auquel la P_o est 0.5 estimé à -38.2 mV à 10 μM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{trans}}$ libre et K est le degré d'inclinaison de la courbe et équivaut à 15.65 mV.

$$\text{Éq.4} \quad P_o = 1 / (1 + \exp [-(V_m - V_{1/2}) / K])$$

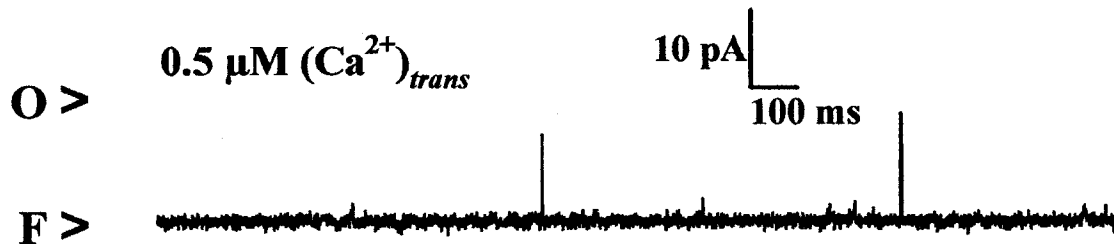
3.4.2.3 Comportement des canaux K_{Ca} en fonction de la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique libre

De plus, la sensibilité à la concentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cytoplasmique}}$ libre a été vérifiée afin de caractériser les canaux K_{Ca} . La figure 27 montre la sensibilité des canaux K_{Ca} aux variations de concentration Ca^{2+} libre du côté intracellulaire. En effet, la probabilité d'ouverture du canal K_{Ca} et par conséquent, son activité diminue lorsque la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} libre diminue, cette concentration de Ca^{2+} libre a pu être diminuée par l'ajout d'EGTA un chélateur de Ca^{2+} du côté intracellulaire du canal (chambre *trans*). Cette diminution de l'activité du canal K_{Ca} lorsque le Ca^{2+} libre intracellulaire diminue (Fig. 27A) souligne la présence d'un senseur de Ca^{2+} sur le

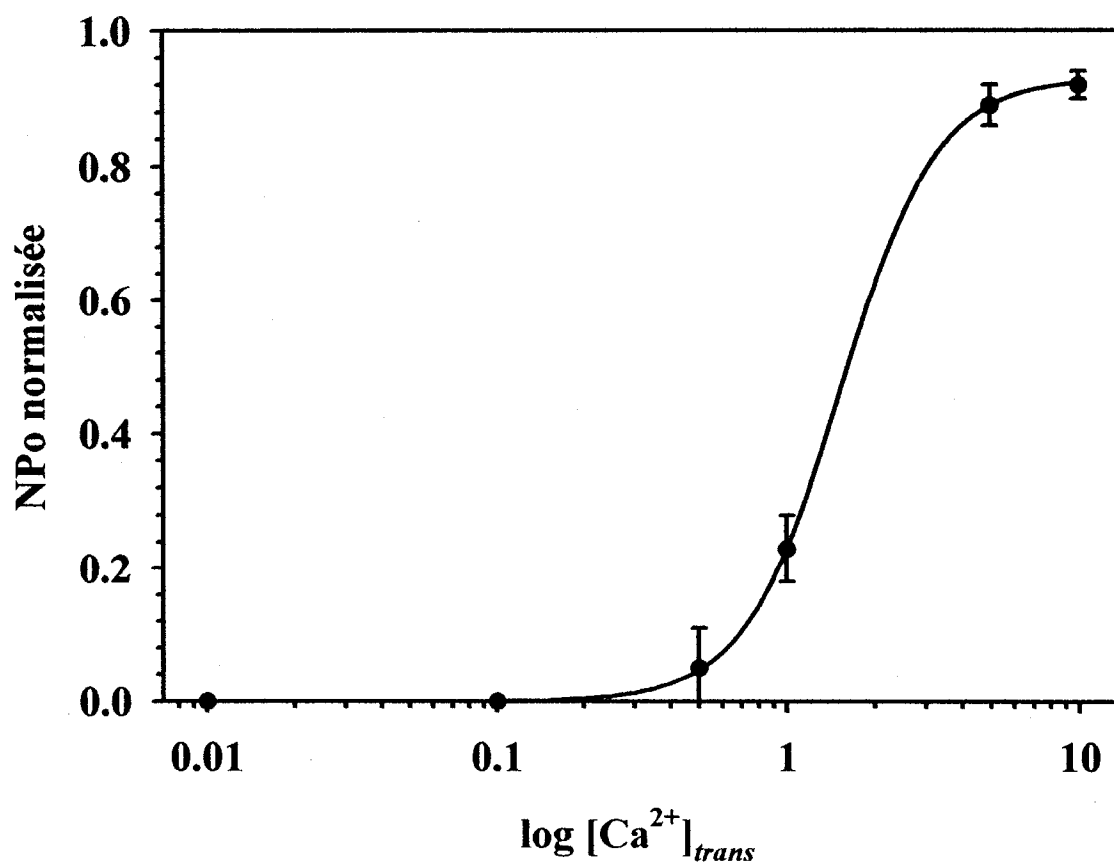
Figure 27 : Représentation de la sensibilité à la $[Ca^{2+}]_{\text{cytoplasmique}}$ libre des canaux K_{Ca} de grande conductance des MLVRs de trachées de bœufs.

A : enregistrement d'un canal unitaire reconstitué en BLP en présence de 10 μM de Ca^{2+} libre en conditions symétriques (250 mM KCl *trans/cis*) et à un voltage de +30 mV, à un pH 7.4 (contrôle). La concentration cytoplasmique de Ca^{2+} fut graduellement diminuée par l'ajout d'un aliquot précalibré d'EGTA (chélateur de Ca^{2+}). Sur les traces la lettre O signifie que le canal est dans l'état ouvert et la lettre F signifie qu'il est dans l'état fermé. B : Quantification de la probabilité d'ouverture des canaux en fonction de la concentration de Ca^{2+} libre dans la chambre *trans*. Les résultats ont été obtenus à +30 mV. Les résultats en B représente la moyenne \pm SEM à partir de 6 expériences.

A

 $+30 \text{ mV}, 250/250 \text{ mM KCl}, 10 \mu\text{M } (\text{Ca}^{2+})_{trans}$  $3 \mu\text{M } (\text{Ca}^{2+})_{trans}$  $0.5 \mu\text{M } (\text{Ca}^{2+})_{trans}$ 

B



permet une quantification de l'effet de la diminution de la $[Ca^{2+}]_{trans}$ sur la P_o ($n = 8$). Les paramètres ont été dérivés suivant l'équation de Hill (Éq.3) pour laquelle le coefficient de Hill (n) obtenu est de 0.93 et la demi-activation est obtenue pour une concentration de $[Ca^{2+}]_{trans}$ de 1.53 μM . La courbe démontre la formation d'un plateau pour les concentrations $[Ca^{2+}]_{trans}$ de $> 5 \mu M$, reflétant l'activité maximale du canal.

Lorsque la $[Ca^{2+}]_{trans}$ libre passe de 5 μM à 1 μM la probabilité d'ouverture du canal diminue abruptement et lorsque la concentration passe de 1 μM à 0.1 μM elle devient très proche de zéro, le canal est donc principalement fermé et ne passe que très rarement à son état ouvert.

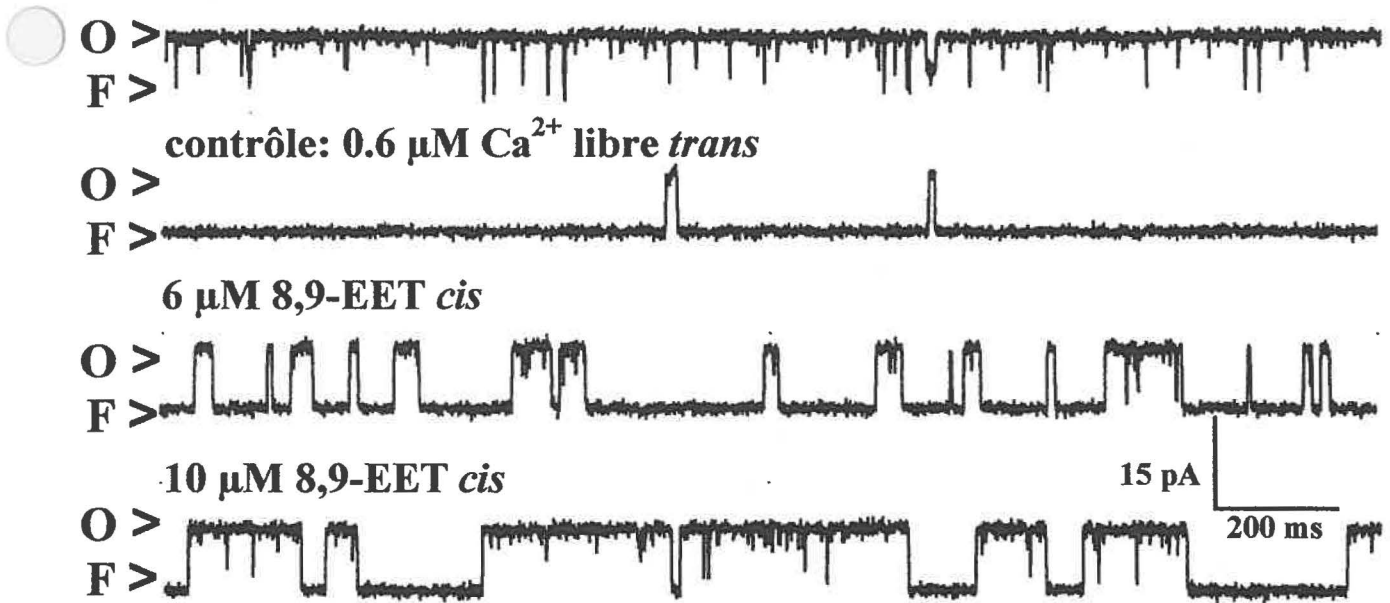
3.4.3 Effets pharmacologiques du 8,9-EET sur les canaux K_{Ca}

La figure 28 décrit les effets du 8,9-EET sur l'activation des canaux K_{Ca} reconstitués en bicouche lipidique plane. Les traces de canal unitaire montrées en A sont représentatives du comportement des canaux suite à l'application du 8,9-EET. Ce canal reconstitué a été enregistré en conditions symétriques (250/250 mM KCl) à +30 mV. L'activité du canal K_{Ca} est diminuée en ajoutant de l'EGTA sur le côté intracellulaire du canal, là où se situe le senseur de Ca^{2+} . La diminution de l'activité du canal est quantifiée par une diminution de la valeur de la P_o . L'ajout d'EET sur la face extracellulaire du canal, de façon à imiter la libération endogène d'EET par les cellules épithéliales, induit une augmentation de son activité et par conséquent de sa P_o . Les histogrammes (Fig. 28B) représentent la quantification de l'augmentation de l'activité du canal K_{Ca} suite à l'application de concentrations cumulatives de 8,9-EET.

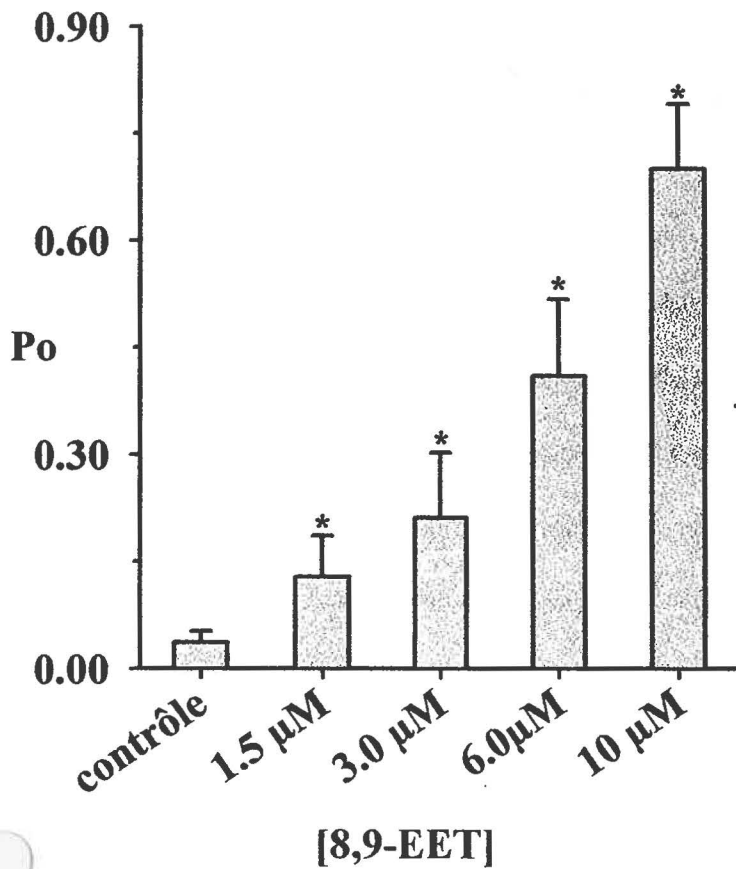
Figure 28 : Effet concentration dépendant du 8,9-EET sur l'activité des canaux K_{Ca} , leur P_o et l'amplitude des courants.

A : enregistrements représentatifs d'un canal K_{Ca} obtenus dans une solution tampon KCl 250 mM *cis/trans* à +30 mV et avec une concentration de Ca^{2+} libre de 10 μ M, avec une faible concentration de $(Ca^{2+})_{trans}$ libre (0.6 μ M) (contrôle) et suite à l'addition de concentrations cumulatives de 8,9-EET dans la chambre *cis*. B : quantification de l'effet du 8,9-EET sur l'activation de canaux K_{Ca} dans les mêmes conditions qu'en A. Une augmentation significative de l'activité du canal a été obtenue après l'addition de $[8,9-EET] \geq 1.5 \mu$ M dans la chambre *cis*. C : courbe de l'amplitude du courant unitaire en fonction du voltage, en conditions contrôle (solution tampon 250 mM *cis/trans* et 0.6 μ M $(Ca^{2+})_{trans}$ libre) et en présence de diverses concentrations de 8,9-EET. 8,9-EET n'a pas d'effet sur l'amplitude du courant et sur la conductance unitaire. Toutes les données sont exprimées \pm SEM ; n = 7 expériences. * $P \leq 0.05$

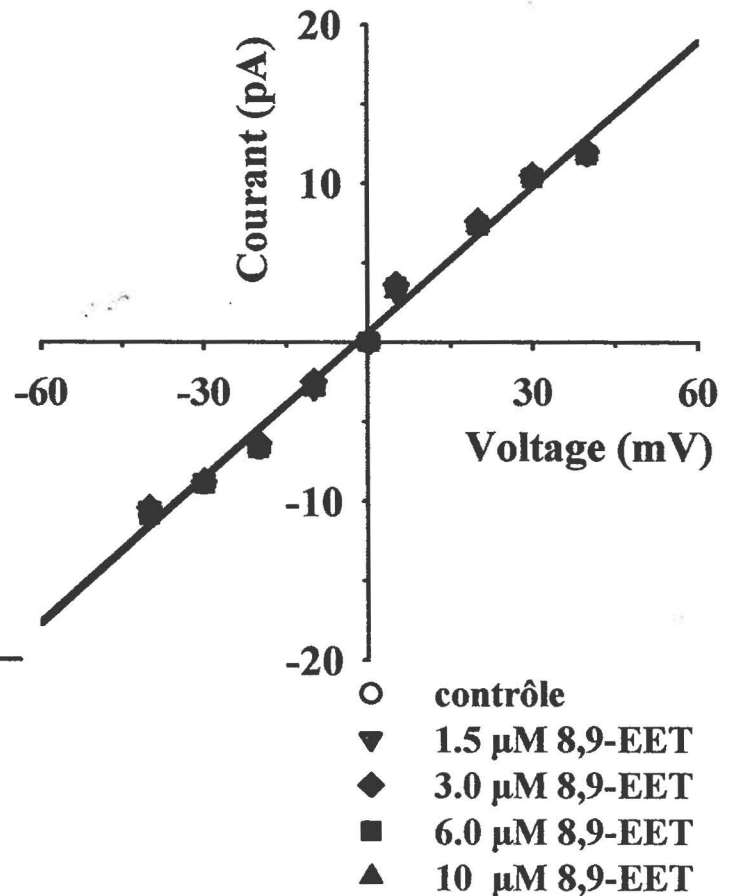
A +30 mV, 250/250 mM KCl, *trans/cis*, 10 μM Ca^{2+} libre



B



C



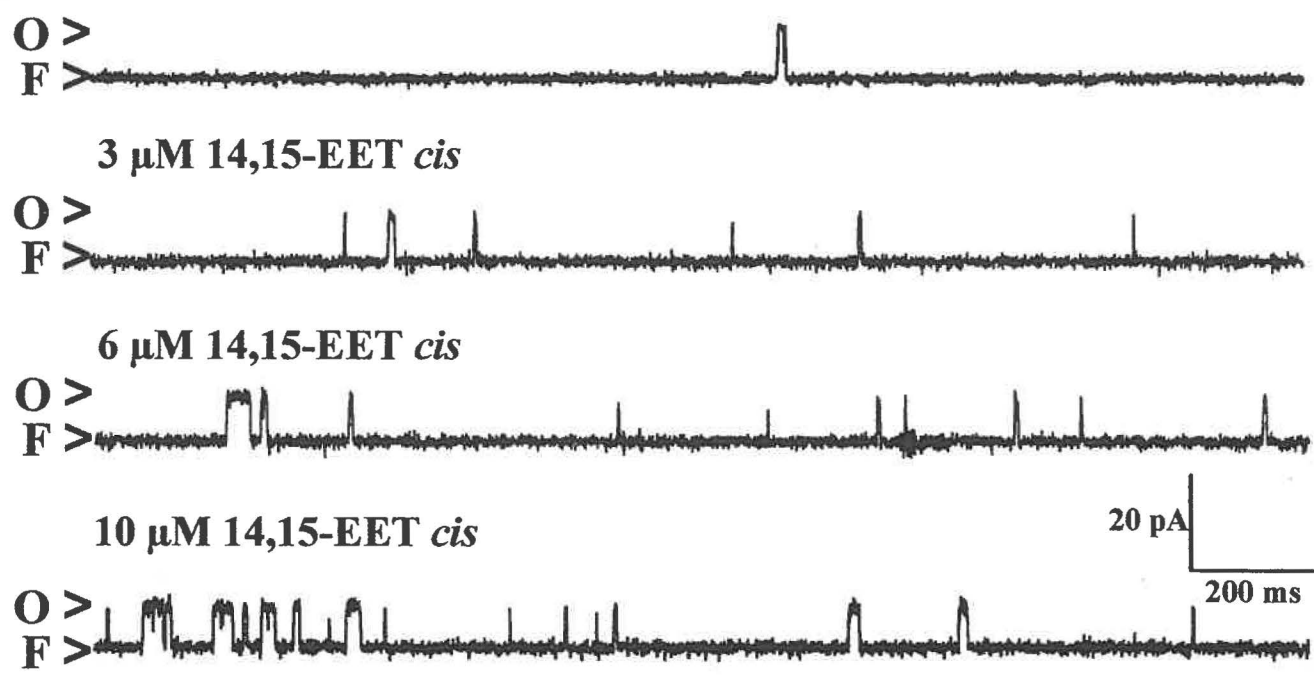
La concentration minimale de 8,9-EET nécessaires à une augmentation significative de la P_o est 1.5 μM . Cette concentration de 1.5 μM augmente d'un facteur 3 la probabilité d'ouverture du canal. À la concentration maximale testée (10 μM) la probabilité d'ouverture est augmentée d'un facteur de 60. La courbe de l'amplitude du courant unitaire en fonction du voltage (Fig. 28C) démontre que l'application d'EET n'affecte ni l'amplitude du courant unitaire ni la conductance du canal.

Le même type d'expérience a été réalisé en présence de 14,15-EET, le régioisomère le plus efficace à relaxer les trachées et les bronches, et à hyperpolariser le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses. La figure 29A montre des traces de canal K_{Ca} unitaire représentatives et l'effet du 14,15-EET qui a un effet partiellement activateur sur les canaux K_{Ca} reconstitués. Cet effet est plus faible que celui obtenu avec le 8,9-EET (Fig. 28). La figure 29B représente la quantification de l'effet activateur induit par le 14,15-EET sur les canaux K_{Ca} . La concentration minimale nécessaire pour observer une augmentation significative de la probabilité d'ouverture induite par le 14,15-EET est 1.5 μM , cette concentration augmente d'un facteur 2 l'activité du canal. À la concentration maximale testée (10 μM) le 14,15-EET induit une augmentation de la P_o d'un facteur 4, ce qui est beaucoup plus faible que les résultats obtenus avec le 8,9-EET. Comme les résultats obtenus avec le 8,9-EET, l'application de concentrations cumulatives de 14,15-EET augmente la P_o des canaux K_{Ca} sans affecter ni l'amplitude du courant unitaire ni leur conductance (Fig. 29C).

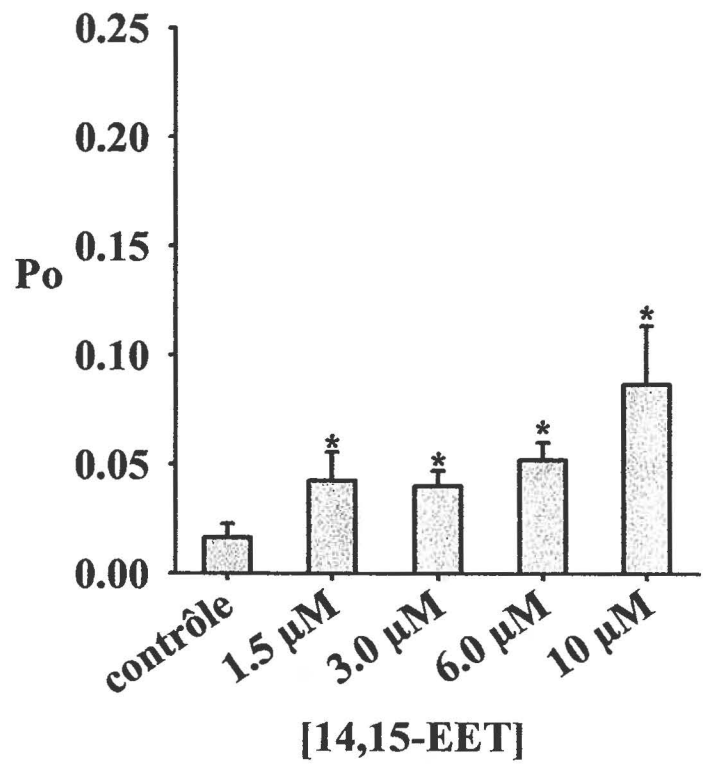
Figure 29 : Effet concentration dépendant du 14,15-EET sur l'activité des canaux K_{Ca} , leur P_o et l'amplitude des courants.

A : enregistrements représentatifs d'un canal K_{Ca} obtenus dans un tampon KCl 250 mM *cis/trans* à +30 mV et avec une concentration de Ca^{2+} libre de 0.6 μ M et suite à l'addition de concentrations cumulatives de 14,15-EET dans la chambre *cis*. B : quantification de l'effet du 14,15-EET sur l'activation de canaux K_{Ca} dans les mêmes conditions qu'en A. Une augmentation significative de l'activité du canal a été obtenu après l'addition de [14,15-EET] \geq 1.5 μ M dans la chambre *cis*. C : courbe de l'amplitude du courant unitaire en fonction du voltage, en conditions contrôle (solution tampon 250 mM *cis/trans* et 0.6 μ M $(Ca^{2+})_{trans}$ libre) et en présence de diverses concentrations de 14,15-EET. 14,15-EET n'a pas d'effet sur l'amplitude du courant et sur la conductance unitaire. Toutes les données sont exprimées \pm SEM ; n = 5 expériences. * $P \leq 0.05$

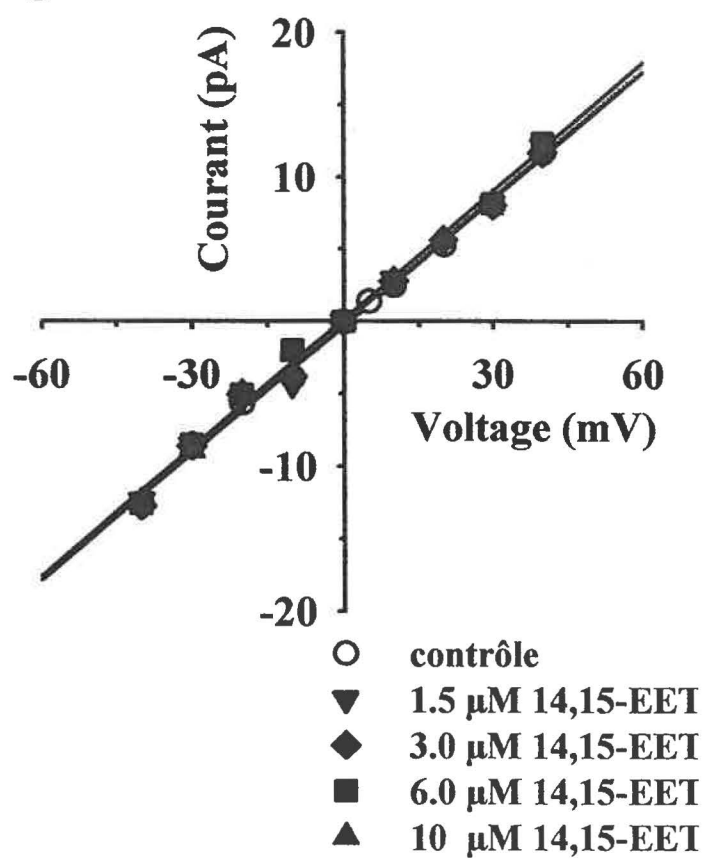
A **contrôle: +30 mV, 250/250 mM KCl, *trans/cis*, 0.6 μM Ca^{2+} libre**



B



C



3.4.4 Les activations induites par les EETs sont bloquées par l'IbTX

Lors des expériences précédentes l'implication des canaux K_{Ca} dans les phénomènes de relaxation et d'hyperpolarisation du muscle lisse respiratoire a été montrée par l'inhibition de ces phénomènes provoquée par le prétraitement ou l'application subséquente d'IbTX. La figure 30 montre des enregistrements de courants unitaires représentant l'augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux K_{Ca} . La première trace de la figure 30A représente un canal dont l'activité a été diminuée par l'ajout d'EGTA pour réduire le Ca^{2+} libre sur la face intracellulaire (0.5 μM Ca^{2+} libre). L'activité du canal a été augmentée par l'application de 3 μM de 8,9-EET sur la face extracellulaire et l'enregistrement présenté montre cette augmentation de la probabilité d'ouverture canaux K_{Ca} . La troisième trace de la figure 30A montre que l'activation du canal K_{Ca} est sensible à l'IbTX, puisque la probabilité d'ouverture est presque nulle suite à l'ajout de 10 nM d'IbTX.

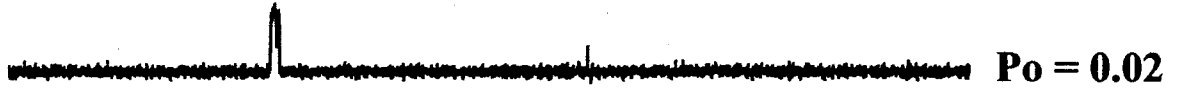
Le même type de résultats a été obtenu avec le 14,15-EET. En effet, les résultats présentés en B montrent que 6 μM de 14,15-EET ajouté à la face extracellulaire du canal K_{Ca} augmente l'activité du canal. L'augmentation de la P_o et donc de l'activité du canal est complètement abolie par l'application d'IbTX sur la face extracellulaire du canal, reflétée dans une P_o pratiquement nulle.

Figure 30 : IbTX bloque les canaux K_{Ca} activés par le 8,9- et le 14,15-EET.

A : traces représentatives d'un canal unitaire obtenu dans une solution tampon 250 mM KCl *cis/trans* avec une concentration de Ca^{2+} libre de 0.5 μ M à +30 mV en contrôle (haut), suite à l'activation du canal par 3.0 μ M of 8,9-EET dans la chambre *cis* (milieu) et après l'addition de 10 nM IbTX dans la chambre *cis* (bas). B : traces représentatives d'un canal unitaire obtenu dans un tampon 250 mM KCl *cis/trans* avec une concentration de Ca^{2+} libre de 0.5 μ M à +30 mV en contrôle (haut), activation du canal K_{Ca} par 3.0 μ M de 14,15-EET dans la chambre *cis* (milieu) et après l'addition de 10 nM IbTX dans la chambre *cis* (bas). L'addition de l'IbTX (10 nM) résulte dans un blocage complet de l'activité du canal K_{Ca} . À droite : valeurs de P_o calculées pour chaque condition.

A

+30 mV, 250/250 mM KCl *trans/cis*, 0.5 μM (Ca^{2+})_{*trans*} libre



+ 3.0 μM 8,9-EET *cis*

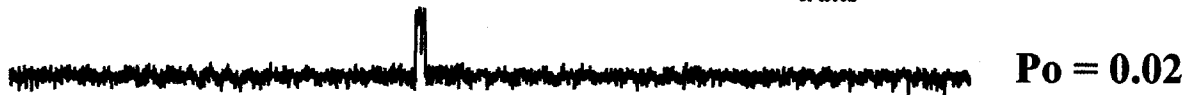


+ 0.01 μM IbTX *cis*

10 pA
200 ms

**B**

+30 mV, 250/250 mM KCl *trans/cis*, 0.5 μM (Ca^{2+})_{*trans*} libre



+ 6.0 μM 14,15-EET *cis*



+ 0.01 μM IbTX *cis*

10 pA
200 ms



4. Discussion

4.1. Effets des EETs sur les MLVRs.

Les 5,6-, 8,9-, 11,12- et 14,15-EETs, les quatre régioisomères de l'acide époxyeicosatriénoïque, sont obtenus par le métabolisme de l'acide arachidonique par le CYP450 épooxygénase (Capdevila et al., 1992a; Holtzman, 1992; Needleman et al., 1986; Shimizu et Wolfe, 1990; Watkins, 1992). Cet enzyme est présent dans de nombreux tissus notamment les reins (Karara et al., 1989; Katoh et al., 1991), le foie (Karara et al., 1989), les tissus reproducteurs (Zosmer et al., 1995) et les poumons (Knickle et Bend, 1994; Zeldin et al., 1995). Le CYP450 épooxygénase produit les quatre isomères d'EET en agissant comme le catalyseur d'une époxydation stéréosélective NADPH dépendante de l'acide arachidonique (Karara et al., 1989). La production endogène d'EET a été identifiée au niveau de l'épithélium des voies respiratoires (Holtzman, 1992; Knickle et Bend, 1994; Zeldin et al., 1995). Les EETs seraient donc libérés de l'épithélium et iraient agir sur les muscles lisses respiratoires, mais leurs effets sur ces tissus n'ont pas été clairement identifiés.

Au niveau du lit vasculaire, les effets et les modes d'action des EETs sont mieux connus. Plusieurs études ont identifié les EETs comme des molécules bioactives capables de relaxer (EDRF) ou d'hyperpolariser (EDHF) le muscle lisse vasculaire (Bauersachs et al., 1994; Campbell et al., 1996; Campbell et Harder, 1999; Fisslthaler et al., 1999; Gebremedhin et al., 1998; Weintraub et al., 1997).

Peu d'études ont tenté d'identifier le rôle des EETs au niveau des muscles lisses respiratoires. Les résultats obtenus dans cette étude tendent à démontrer que les EETs pourraient jouer un rôle similaire au niveau des MLVs et des MLVRs.

En effet, les résultats montrent que les EETs exogènes relaxent les MLVRs de cobayes précontractés avec un agoniste muscarinique (CCh). Dumoulin et al. (1998) avaient démontré que deux isomères d'EET relaxaient les mêmes tissus précontractés à l'histamine. L'observation des résultats obtenus (Fig. 15) pour les mesures de tensions isométriques démontre que le 5,6-EET posséderait l'effet relaxant le plus important des quatre régioisomères ($92 \pm 3\%$). Cependant, un examen plus approfondi souligne l'effet important de l'ACN, le solvant du 5,6-EET. En effet, à 1.7% correspondant à une concentration de $5 \mu\text{M}$ de 5,6-EET, l'ACN relaxe de presque 100% les trachées et les bronches de cobayes précontractés. L'utilisation de ce solvant est nécessaire puisque le 5,6-EET est une molécule hydrophobe très instable. Pour évaluer le pouvoir relaxant de cette molécule il est nécessaire d'éliminer l'effet du solvant. Des tentatives ont été faites avec des cyclodextrines des polyglucosides cycliques utilisés dans le transport intratissulaire de composés très hydrophobes comme le cholestérol ou les PGs (Irie et Uekama K., 1996). Malheureusement, ces tentatives avec les EETs se sont révélées infructueuses et il n'y a pas eu d'utilisation ultérieure de l'isomère 5,6-EET dans nos expériences.

Les trois autres isomères d'EET sont moins instables que le 5,6-EET et sont conservés dans l'éthanol. L'EtOH possède aussi un effet relaxant sur les MLVRs précontractés mais cet effet est moindre que celui des EETs. À 1.7% correspondant à $5 \mu\text{M}$ de 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET l'EtOH relaxe les MLVRs précontractés de $19 \pm$

3.4% tandis qu'à cette concentration les deux EETs testés relaxent de $35.1 \pm 4.8\%$, $18 \pm 2.4\%$ et $39.7 \pm 2.6\%$ respectivement. À la lumière de ces effets des solvants, l'ACN et de l'EtOH, les deux EETs possédant l'effet relaxant le plus significatif sont le 8,9- et le 14,15-EET. Ainsi toutes les expériences subséquentes ont été réalisées avec ses deux isomères. Lorsque l'effet relaxant du solvant est soustrait, le 8,9- et le 14,15-EET relaxe les MLVRs d'environ 16 et 20%, respectivement.

L'élimination de l'épithélium des trachées et des bronches a permis de vérifier l'effet exogène du 8,9- et du 14,15-EET, puisque la production endogène d'EETs est minimisée (Holtzman, 1992; Knickle et Bend, 1994; Zeldin et al., 1995). De plus, Dumoulin et al. (1998) ont démontré que les EETs appliqués exogènement n'ont peu ou pas d'effets sur des trachées et des bronches pourvues d'épithélium. Cette observation souligne l'importance de l'épithélium de son rôle de barrière protectrice et métabolique pour le MLVR (Bertrand et Tschirhart, 1993).

En effet, dans la physiopathologie respiratoire de l'asthme il est possible d'observer des symptômes tels qu'une diminution ou une disparition de l'épithélium corrélée avec une augmentation de la masse musculaire respiratoire entraînant une hypertrophie et une hypersensibilité et une diminution du diamètre des voies respiratoires (Sparrow et Mitchell, 1991; Vignola et al., 1998). Parallèlement à cette perte d'épithélium fonctionnel, il y a une diminution de la production endogène de facteurs relaxants et hyperpolarisants entraînant l'augmentation de la contraction du muscle lisse respiratoire (Bertrand et Tschirhart, 1993). Plusieurs études ont montré l'implication des prostaglandines, des tromboxanes et des leucotriènes dans cette physiopathologie respiratoire (Holtzman, 1992; Silverman et al., 1998; Wenzel, 1998).

Ces composés sont tous produits à partir de l'acide arachidonique via l'action de la cyclooxygénase (COX) ou de la lipoxygénase (LO) (Holtzman, 1992).

Afin de mesurer les effets éventuels des EETs dans la physiopathologie respiratoire de l'asthme ; un protocole de sensibilisation à l'ovalbumine a été utilisé sur un model animal. Ce protocole décrit par Lawrence et al. (1997), (matériels et méthodes) s'étale sur 21 jours et permet, suite à une provocation avec un allergène, combiné à un adjuvant (alum), l'obtention chez le cobaye traité de symptômes semblables à ceux se développant dans l'asthme. Ces symptômes sont la manifestation des phases précoce et retardée de l'asthme, d'une infiltration des eosinophiles et des cellules mononuclées dans les voies respiratoires (Corrigan et Kay, 1991). Le 8,9- et le 14,15-EET ont été testés sur des trachées et des bronches dépourvues de leur couche cellulaire épithéliale. Les résultats montrent que les MLVRs de cobayes sensibilisés sont plus sensibles à l'effet relaxant du 8,9 et du 14,15-EET puisque les valeurs d'EC₅₀ respectives de ces tissus sont plus faibles que ceux des tissus normaux (Fig. 20). Par contre, l'effet maximal est moins important chez les animaux sensibilisés que chez les animaux sains. Ces observations soulignent que dans cette réaction allergique produite chez les cobayes sensibilisés qu'il y a eu non seulement une modification de l'épithélium (Sparrow et Mitchell, 1991) mais aussi probablement une modification du MLVR puisque celui-ci réagit différemment que le muscle lisse respiratoire sain. Les modifications provoquées lors de cette sensibilisation des animaux pourraient provenir de l'augmentation du nombre de récepteurs aux EETs sur les cellules musculaires lisses respiratoires mais l'existence de tels récepteurs reste encore à être prouvée. Malgré que Wong et al. (1993) aient trouvé l'existence de sites de liaison à haute affinité pour le 14(R),15(S)-EET sur des

monocytes de cobaye et que Li et al., (1997) aient postulé l'existence d'un site de liaison spécifique pour le 11,12-EET sur les membranes cellulaires d'artères coronaires de bœuf, l'existence d'un tel site au niveau des muscles lisses respiratoires reste à être prouvée.

Lorsqu'il y a une dépolarisation du potentiel de membrane, une cellule se contracte, ensuite l'ouverture de canaux provoque une hyperpolarisation de la cellule et celle-ci se relaxe. La relaxation observée sur le MLVR de cobaye précontracté avec un agoniste muscarinique est corrélée avec une hyperpolarisation des cellules. Les résultats obtenus avec les mesures de potentiel de membrane à l'aide de la technique de microélectrodes classiques montrent que le potentiel de membrane des cellules des MLVRs de lapin est très sensible aux effets du 8,9- et du 14,15-EET. En effet, ces deux isomères d'EET induisent de fortes hyperpolarisations concentration-dépendantes du potentiel de membrane des cellules musculaires lisses des voies respiratoires de lapins (Fig. 21B). À la concentration maximale testée soit 3 μM le 8,9- et le 14,15-EET induisent des hyperpolarisations de -13 et -16 mV avec des valeurs d' EC_{50} de 0.14 et de 0.13 μM respectivement. Cette forte sensibilité du potentiel de membrane des cellules des MLVRs tend à supporter l'existence de récepteurs spécifiques pour les EETs sur ce type de cellules.

Cependant, il existe une différence majeure entre la relaxation des MLVRs de cobayes et l'hyperpolarisation du potentiel de membrane des cellules des muscles lisses respiratoires de lapin. En effet, la sensibilité aux concentrations du 8,9- et du 14,15-EET est différente dans les deux cas. De fait, l'hyperpolarisation du potentiel de membrane est beaucoup plus sensible à l'effet des EETs que la relaxation. La

sensibilité pour l'hyperpolarisation du potentiel de membrane se situe entre 0.01 et 3 μM tandis que dans la relaxation elle se situe entre 0.1 et 10 μM . Les effets maximaux sur la relaxation et l'hyperpolarisation sont observés à 10 et 3 μM respectivement. Tel qu'observé dans le MLV (Bauersachs et al., 1994; Campbell et Harder, 1999; Fisslthaler et al., 1999; Gebremedhin et al., 1998; Hoebel et al., 1998; Komori et Vanhoutte, 1990), les EETs induisent une hyperpolarisation des MLVRs. Cette hyperpolarisation a été démontrée comme capable de réduire directement le tonus des muscles lisses mais le mécanisme par lequel ce phénomène est produit n'est pas complètement élucidé, bien que des hypothèses plausibles aient été formulées. Les différences entre ces deux phénomènes soulignent l'implication d'autres cascades moléculaires puisque l'hyperpolarisation du potentiel de membrane n'est pas le seul phénomène responsable de la relaxation du muscle lisse. De plus, deux espèces animales différentes ont été utilisées pour analyser les effets des EETs, mais il ne semble pas exister d'évidences démontrant des mécanismes de relaxation et d'hyperpolarisation très différents entre ces deux espèces.

De plus, l'IbTX renverse partiellement la relaxation induite par le 8,9- et le 14,15-EET et complètement l'hyperpolarisation du potentiel de membrane induite par les deux isomères d'EETs. De surcroît, l'IbTX prévient complètement l'effet des EETs sur le potentiel de membrane (Fig. 22). Ces résultats donnent de bonnes évidences sur l'implication des canaux K_{Ca} de grande conductance dans les hyperpolarisations et les relaxations induites par les EETs puisque l'IbTX est un bloqueur spécifique de ces canaux.

4.2 Implication des canaux K_{Ca} dans les phénomènes de relaxation et d'hyperpolarisation des MLVRs induits par les 8,9- et 14,15-EETs.

Les résultats montrent que les canaux K_{Ca} de grande conductance sont impliqués dans le contrôle de l'hyperpolarisation et de la relaxation des MLVRs puisque l'application d'IbTX inhibe partiellement la relaxation et totalement l'hyperpolarisation induite par les 8,9- et 14,15-EETs. À l'aide de fractions microsomales de trachées de bœuf, il a été possible de mesurer l'effet direct du 8,9- et du 14,15-EET sur les canaux K_{Ca} reconstitués dans des membranes artificielles de composition fixe.

Bien que la présence des canaux K_{Ca} dans les fractions microsomales de trachées de bœuf ait déjà été rapportée (Alioua et al., 1995; Dumoulin et al., 1998), une analyse par immunobuvardage avec des anticorps contre les canaux K_{Ca} a été effectuée pour confirmer cette présence. Cette analyse montre la présence des canaux K_{Ca} dans nos fractions microsomales (Fig. 24). En effet, les anticorps ont révélé la présence d'une bande immunoréactive à environ 62 kDa correspondant à la sous-unité α des canaux K_{Ca} de grande conductance (Alioua et al., 1995; Garcia-Calvo et al., 1994). La présence de la sous-unité α du canal K_{Ca} dans les fractions microsomales est aussi appuyée par la bande produite par le contrôle positif. Le contrôle positif est constitué de l'antigène utilisé pour produire l'anticorps. L'anticorps est spécifique pour la partie C-terminale de la sous-unité α du canal K_{Ca} . La bande produite par le contrôle positif se situe dans les poids moléculaires plus faibles que la bande détectée dans fraction microsomale, révélant ainsi que la sous-unité α native a un poids moléculaire plus élevé (120-130 kDa) que l'anticorps. Les deux fractions microsomales (TVO70 et TVO71) montrent aussi des bandes de poids moléculaire

plus faibles (< 42 kDa) qui sont probablement issues de la protéolyse de la protéine formant la sous-unité α .

L'importante présence des canaux K_{Ca} au niveau des muscles lisses des voies respiratoires (McCann et Welsh, 1986) est appuyée par ces résultats d'immunobuvardage. Ces préparations microsomales ont donc été utilisées pour reconstituer les canaux K_{Ca} de grande conductance à l'aide de la technique de reconstitution membranaire. Cependant, avant d'effectuer une étude pharmacologique des effets des EETs sur les canaux K_{Ca} de grande conductance, la caractérisation sommaire de ces canaux reconstituée a été effectuée. Les résultats obtenus sont globalement compatibles avec ceux obtenus par notre laboratoire ainsi que par d'autres groupes (Meera et al., 1994; Knauss et al., 1994; Alioua et al., 1995)

La technique de reconstitution membranaire permet la fusion de microvésicules natives. La fusion de ces microvésicules et l'utilisation de tampon KCl, permettent de détecter, la plus part du temps, la présence de canaux K_{Ca} . Par contre, il y a quelques fois présence de canaux sélectifs aux ions Cl^- (Salvail et al., 1998). Ce type de canal Cl^- est facilement dissociable des canaux K_{Ca} puisque ces canaux Cl^- sont insensibles aux ions Ca^{2+} et possèdent un potentiel d'inversion à environ +30 mV (conditions assymétriques 50/250 mM KCl *cis/trans*).

La caractérisation des canaux K_{Ca} a été faite selon certaines caractéristiques biophysiques et pharmacologiques. Tout d'abord, la conductance et le potentiel de zéro courant des canaux ont été vérifiés en présence ou en absence de gradients potassiques (Fig. 25). L'étude du comportement des canaux K_{Ca} en conditions

asymétriques (50/250 Mm KCl *trans/cis*) montre qu'ils ont une conductance moyenne de 219 pS et un potentiel d'inversion de -35 mV. Par contre, le comportement des canaux K_{Ca} en conditions symétriques (250/250 mM KCl *trans/cis*) montre que leur conductance est plus élevée 292 pS et un potentiel d'inversion à 0 mV. Les valeurs de conductance des canaux K_{Ca} en conditions symétriques et asymétriques sont équivalents à celles rapportées dans la littérature (Dumoulin et al., 1998; Savaria et al., 1992). La conductance d'un canal correspond à l'aptitude du canal à laisser passer les ions.

De plus, les valeurs de potentiel d'inversion sont compatibles avec les valeurs de potentiel E_K théoriques obtenues avec l'équation de Nernst :

$$\text{Éq.5 :} \quad E_K = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[K^+]_{\text{extracellulaire}}}{[K^+]_{\text{intracellulaire}}}$$

Où R représente la constante des gaz parfaits, T représente la température absolue, Z représente la valence de l'ion et F représente la constante de Faraday. À 20°C, $RT/F = 25.26$ mV et la valeur de la valence de l'ion K^+ est +1. Par conséquent, lorsque le canal K_{Ca} se trouve dans des conditions asymétriques où la concentration en K^+ extracellulaire est 250 mM et la concentration en K^+ intracellulaire est 50 mM, le potentiel d'inversion (E_K) est -41 mV. Et lorsque le canal se trouve dans des conditions symétriques soit des concentrations en K^+ extracellulaire (*cis*) et intracellulaire (*trans*) équivalentes de 250 mM le potentiel d'inversion (E_K) est 0 mV. De plus, les cations Tris et les anions HEPES présents dans le tampon sont en quantité équivalente de part et d'autre de la membrane, et ne possèdent pas de gradient

électrochimique. Ces résultats démontrent que les canaux K_{Ca} reconstitués en bicouche lipidique plane sont sélectifs aux ions K^+ et ne le sont pas pour les ions Cl^- présents dans les solutions composants les milieux extra et intracellulaires (Garcia-Calvo et al., 1994; Giangiacoimo et al., 1995; Savaria et al., 1992). À la valeur du potentiel d'inversion soit -35 mV et 0 mV, respectivement en conditions asymétriques et symétriques, le flux net d'ions K^+ à travers le canal est nul et donc le courant aussi. La loi d'Ohm ($V = RI$) permet de mesurer un courant en connaissant le voltage et la résistance d'un système. En considérant certains paramètres il est possible de mesurer le courant unitaire qui passe à travers un canal. Ces paramètres sont : la conductance unitaire du canal, le potentiel de membrane et le potentiel d'inversion des ions formant le courant. Cette équation dérivée de la loi d'Ohm est la suivante :

$$\text{Éq.6 :} \quad i_K = \gamma_K (V_m - E_K)$$

Où i_K représente le courant unitaire des ions K^+ , γ_K représente la conductance unitaire du canal, V_m représente le potentiel de membrane et E_K le potentiel d'équilibre des ions K^+ (dont la valeur théorique est donnée par l'équation de Nernst, Éq.5). Le gradient électrochimique correspond à $(V_m - E_K)$, ce gradient électrochimique est la force motrice qui pousse les ions à traverser le canal. Par conséquent, si le potentiel de membrane (V_m) est égal au potentiel d'inversion des ions K^+ (E_K), $V_m = E_K$ et donc, $V_m - E_K = 0$, la force motrice sera nulle et le courant (i_K) sera égal à 0 pA. Le gradient électrochimique dépend donc du gradient de concentration pour un ion donné et du voltage appliqué et il est directement responsable du courant produit par le canal.

En plus de leur grande conductance et de la valeur de leur potentiel d'inversion, les canaux K_{Ca} se caractérisent par leur dépendance au voltage et à la concentration intracellulaire d'ions Ca^{2+} libres ainsi que leur sensibilité à certains bloqueurs spécifiques tel que l'IbTX. Les résultats montrent que les canaux K_{Ca} sont sensibles au voltage (Fig. 26) ainsi plus le voltage est positif plus les canaux sont actifs et cette augmentation d'activité se reflète dans une augmentation de leur probabilité d'ouverture (P_o). Par contre, la probabilité d'ouverture du canal est relativement insensible au gradient électrochimique contrairement au courant produit par le canal (Dumoulin et al., 1998). La dépendance au voltage des canaux K_{Ca} serait causée par la présence d'un senseur de voltage intrinsèque (Meera et al., 1994; Stefani et al., 1997). Ce senseur de voltage permettrait de percevoir les changements de voltage durant la dépolarisation et induire un courant de gating (Stefani et al., 1997). Ce senseur de voltage se situerait sur le segment transmembranaire S4 de la sous-unité α du canal (Aggarwal et MacKinnon, 1996; Garcia-Calvo et al., 1994; Seoh et al., 1996). Des résultats discutés et non illustrés de Meera et Toro (1998) démontrent que des mutations dans les résidus chargés positivement du segment S4 du canal K_{Ca} de grande conductance entraînent des changements dans leur dépendance au voltage (Meera et al., 1994).

Les résultats montrent que la P_o du canal est élevée lorsque le voltage est très positif et qu'elle diminue lorsque le potentiel devient négatif (Fig. 26). L'équation de Boltzmann (Éq.3) a été utilisée pour ajuster les valeurs de probabilité d'ouverture obtenues selon les différents voltages. Selon cette équation la valeur de $V_{1/2}$ est estimée à -38.18 mV en présence d'une concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre de

10 μM . Certaines études ont montré que la sensibilité au voltage pourrait dépendre de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre et du niveau de phosphorylation du canal (Savaria et al., 1992 ; Alouia et al., 1995). De plus, la composition lipidique des membranes où se situe le canal K_{Ca} influencer leur sensibilité au voltage (McManus et al., 1995; Moczydlowski et Latorre, 1983).

Les résultats démontrent aussi que l'activité des canaux K_{Ca} de grande conductance varie en fonction de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre (Fig. 27). Ainsi plus la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre est élevée plus la probabilité d'ouverture des canaux K_{Ca} est grande. L'équation de Hill (Éq.2) a été utilisée pour dériver les paramètres de probabilité d'ouverture obtenues dans nos conditions expérimentales. Selon cette équation la valeur du coefficient de Hill (n) est 0.93 et la concentration de Ca^{2+} libre où la probabilité d'ouverture du canal est égale à 0.5 est de 1.53 μM . Ces valeurs sont inférieures à celles rapportées dans la littérature (Dumoulin et al., 1998; DiChiara et Reinhart, 1995; Vergara et Latorre, 1983). En effet, les résultats obtenus dans notre étude démontrent que les canaux K_{Ca} sont plus sensibles à la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre. Il est rapporté dans la littérature qu'il peut exister une différente sensibilité au Ca^{2+} entre les tissus mais encore entre les différentes cellules formant un tissu (Carl et al., 1996; Chang et al., 1997; DiChiara et Reinhart, 1995). De plus, cette dépendance de la probabilité d'ouverture à la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre pourrait aussi varier selon la composition lipidique de la membrane (McManus, 1991).

La sensibilité à la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre des canaux K_{Ca} serait due à un senseur de Ca^{2+} situé sur la face cytoplasmique du canal. Ce senseur de calcium se situerait sur les segments hydrophobes S9 et S10 (Wei et al., 1994), la séquence du canal K_{Ca} de grande conductance la plus conservée entre les espèces (Meera et al., 1994), il y aurait une série de charges négatives juste avant le segment S10 qui participeraient à la formation du senseur de Ca^{2+} nommé en anglais “calcium bowl” (Wei et al., 1996).

Au niveau d’une cellule, ces caractéristiques des canaux K_{Ca} signifient qu’ils sont peu actifs au potentiel de repos (environ -60 mV). Cependant, lors d’une dépolarisation ils vont s’activer pour permettre la repolarisation de la cellule. De plus, le niveau intracellulaire de Ca^{2+} libre présent dans la cellule (0.1 μM) ne favorise pas une grande activité des canaux K_{Ca} . Et ce n’est que lors des augmentations transitoires intracellulaires de Ca^{2+} libre que l’activité des canaux K_{Ca} augmentera.

Les canaux K_{Ca} de grande conductance ont été caractérisés selon leur aptitude à être bloquer par certaines substances. Parmi ces bloqueurs des canaux K_{Ca} il y a le tétraéthylammonium (TEA), la charybdotoxine (ChTX) et l’ibériotoxine (IbTX). Le TEA est un bloqueur non spécifique des canaux K_{Ca} de grande conductance. Cette molécule obstrue le pore du canal et empêche le passage des ions K^+ . La ChTX et l’IbTX sont deux bloqueurs issus du venin de scorpion qui sont plus spécifiques pour ce type de canal. En 1985, il a été démontré que le venin provenant du scorpion *Leirus quinquestriatus hebraeus* pouvait bloquer le canal K_{Ca} de grande conductance

selon simple une réaction de liaison bimoléculaire. La ChTX est un peptide de 37 a.a. possédant une structure très compacte grâce à des ponts disulfures ainsi que plusieurs résidus chargés positivement. Ces résidus chargés positivement sont très importants pour l'interaction avec la face externe du pore du canal K_{Ca} possédant des résidus chargés négativement (Anderson et al., 1988; MacKinnon et Miller, 1988; Park et al., 1991). Par contre, la ChTX n'est pas un bloqueur spécifique des canaux K_{Ca} de grande conductance, il a été rapporté dans la littérature que la ChTX pouvait aussi bloquer d'autres types de canaux K^+ tels que les canaux K_{Ca} de petite conductance des cellules sanguines (Leonard et al., 1992; Lucchesi et al., 1989; Wolff et al., 1988) ainsi que les canaux K^+ voltage-dépendants dans les lymphocytes (Sands et al., 1989) et probablement aussi dans le cerveau (Vazquez et al., 1990). Une fraction du venin de scorpion *Buthus tamulus* a été purifiée et caractérisée (Galvez et al., 1990). Il en résulta l'IbTX, un bloqueur très spécifique des canaux K_{Ca} de grande conductance. L'IbTX est un peptide de 37 a.a. possédant 68% d'homologie avec la ChTX. Mais l'IbTX possède plusieurs résidus acides et une charge positive nette plus faible que la ChTX. L'IbTX bloque le canal de la même manière que le fait la ChTX mais son taux de dissociation est plus lent que celui de la ChTX (Candia et al., 1992; Giangiacomo et al., 1992). L'IbTX étant le plus spécifique de ces bloqueurs il a été utilisé comme outil pharmacologique pour caractériser le canal et tester son implication dans certains phénomènes. Les résultats ont montré que 10 nM d'IbTX ont suffi à inhiber la relaxation et l'hyperpolarisation des MLVRs induites par les 8,9- et 14,15-EETs. De plus, 10 nM d'IbTX ont aussi complètement bloqué l'activation des canaux K_{Ca} reconstitués induite par les EETs.

4.3 Effets directs des EETs sur les canaux K_{Ca} .

Les résultats obtenus dans cette étude démontre que le 8,9- et le 14,15-EET sont capables d'activer directement les canaux K_{Ca} sans affecter l'amplitude du courant et la conductance du canal K_{Ca} (Fig. 28 et 29). Ces résultats sont corroborés par ceux obtenus par Dumoulin et al. (1998) où le 11,12-EET cause une activation directe des canaux K_{Ca} sans affecter la conductance ou l'amplitude du courant du canal K_{Ca} . Cependant l'activation observée avec le 11,12-EET semble être de plus grande que celle obtenue avec les deux autres isomères d'EET. Cette observation pourrait soutenir l'hypothèse que les EETs ont des effets régio- et stéréospécifiques. Ainsi la conformation du 11,12-EET pourrait favoriser l'interaction de la molécule d'EET avec le canal K_{Ca} ou les protéines voisines. Cette interaction provoquerait un changement de conformation allostérique du canal et favoriserait l'ouverture du canal K_{Ca} .

Cette activation des canaux K_{Ca} par les EETs est un effet direct c'est-à-dire qu'elle ne passe pas par l'intermédiaire d'une cascade intracellulaire impliquant soit l'AMPc, le GMPc, l'ATP, le GTP ou d'autres seconds messagers puisque dans ces conditions expérimentales il y a absence de ces intervenants intracellulaires. Puisque les canaux K_{Ca} natifs sont reconstitués à partir de microvésicules issues de trachées de bœufs et qu'il n'y a aucune addition de ces molécules dans la solution initiale des chambres expérimentales, de plus, les BLPs sont constituées à partir d'un mélange de phospholipides standard éliminant toutes traces de ces composants intracellulaires. Ainsi les EETs activent directement les canaux K_{Ca} très probablement par une interaction directe entre les molécules d'EETs et le canal, soit par une interaction des EETs avec les phospholipides membranaires ou par une interaction entre les molécules d'EETs et les protéines voisines du canal (sous-unité β). À partir de nos observations et de

celles faites par d'autres groupes (Wong et al., 1993 ; Wong et al., 1997) il semble que l'existence d'un récepteur spécifique aux EETs sur les membranes de surface soit tout à fait plausible, mais ce récepteur n'a pas encore été identifié.

4.4 Mécanismes d'action des EETs sur les MLVRs : effet E_pDHF ?

Les quatre régioisomères d'EET sont produits par l'épithélium et les tissus pulmonaires (Devereux et al., 1981) sous l'action de l'enzyme CYP450 époxygénase sur l'acide arachidonique (Capdevila et al., 1990). Ils peuvent être considérés comme des facteurs paracrins puisqu'ils possèdent une courte demi-vie et agissent sur le MLVR sous-jacent. Les quatre régioisomères d'EETs induisent une relaxation des MLVRs. Cette relaxation des MLVRs semble être causée en partie par l'hyperpolarisation du potentiel de membrane des cellules du MLVR. Selon les résultats obtenus avec l'application d'IbTX, un bloqueur spécifique, les canaux K_{Ca} sont impliqués dans ces phénomènes physiologiques. De plus, les EETs agissent directement sur les canaux K_{Ca} , c'est-à-dire sans l'intervention de seconds messagers comme le GTP, l'ATP, le $GMPc$ ou l' $AMPc$.

Si on regarde dans l'ensemble les résultats obtenus on peut tenter de les mettre les uns dans les autres à la manière de poupées russes puisque nos expériences se complètent et se situent à différents niveaux physiologiques: moléculaire, membranaire et tissulaire. La relaxation des MLVRs induite par le 8,9- et le 14,15-EET semble être causée en partie par l'hyperpolarisation du muscle. Les résultats démontrent que le potentiel de membrane des cellules du MLVR est très sensible aux effets hyperpolarisants des EETs. Par contre, il semble que d'autres mécanismes

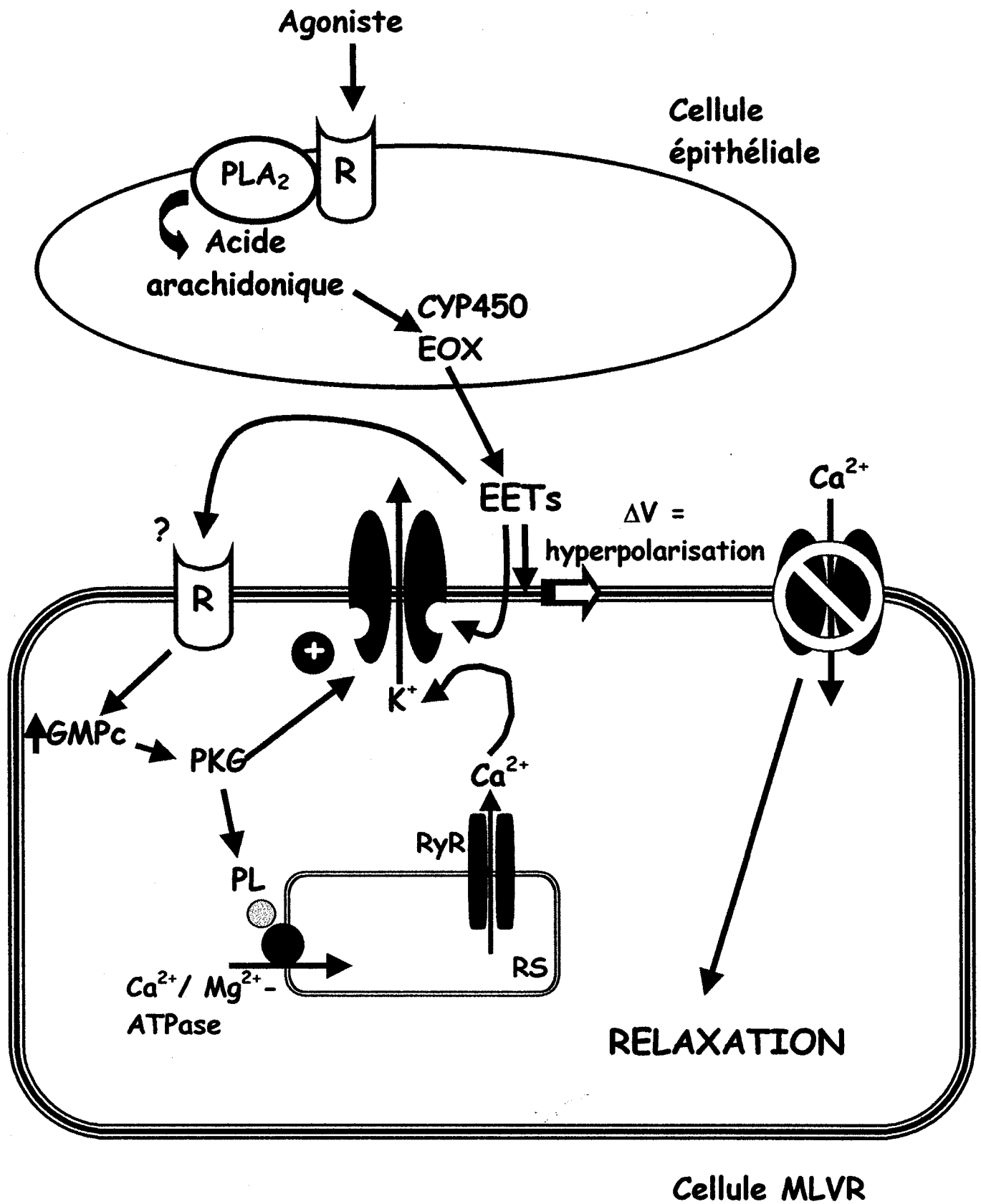
physiologiques puissent être impliqués dans le contrôle de la relaxation car cette dernière est moins sensible aux effets des EETs que l'hyperpolarisation mesurée à l'aide de microélectrodes.

De plus, un autre point en faveur de l'intervention d'autres mécanismes intracellulaires est la différence entre l'hyperpolarisation des MLVRs et l'activation directe des canaux K_{Ca} induites par le 8,9- et 14,15-EET. En effet, l'activation directe des canaux K_{Ca} est moins sensible aux effets des EETs que la relaxation et l'hyperpolarisation. Ainsi l'hyperpolarisation des MLVRs n'est pas seulement causée par une activation directe des canaux K_{Ca} mais aussi par l'intervention de mécanismes intracellulaires qui sont absents lors des expériences de reconstitution tels que la phosphorylation. Ainsi une des façons de provoquer la phosphorylation du canal K_{Ca} par l'action des EETs a été proposée par Wong et al. (1997): lors de la liaison de la molécule de 14,15-EET à un récepteur présent sur la membrane d'un monocyte, il y a augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc et l'activation d'une PKA. Cette PKA activée pourrait provoquer la phosphorylation et donc l'activation du canal K_{Ca} .

Il est donc possible de poser une hypothèse quant aux modes d'action des EETs sur les MLVRs. Les EETs produits par l'épithélium respiratoire peuvent se lier à un récepteur spécifique situé sur le MLVR, cette liaison active une PKG qui agit sur le phospholambane (PL) situé sur le réticulum sarcoplasmique (RS). Le PL active la pompe Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase et ainsi le repompage du Ca^{2+} à l'intérieur du RS et la diminution de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . De plus, la PKG activée active le canal K_{Ca} en le phosphorylant. Cette activation des canaux K_{Ca} favorise la sortie de K^+ de la cellule et l'hyperpolarisation de la cellule musculaire. Cette diminution de

Figure 31 : Schéma récapitulatif des hypothèses de l'action des EETs sur le MLVR.

Légende : R : Récepteur, PLA₂ : Phospholipase A₂, CYP450 EOX : Cytochrome P450 époxygénase, EETs : acides époxyeicosatriénoïques, PL : Phospholambane, GMPC : Guanosine monophosphate cyclique, PKG : protéine kinase G, RyR : Récepteur à la ryanodine, RS : réticulum sarcoplasmique, Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase : Pompe Ca²⁺/Mg²⁺.



potentiel de membrane entraîne la fermeture des canaux Ca^{2+} et par le fait même la diminution de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Cette diminution de la concentration Ca^{2+} intracellulaire (activation de la pompe $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase du RS et fermeture des canaux Ca^{2+} de la membrane de surface) entraîne la relaxation du MLVR. Une autre hypothèse quant à l'action des EETs sur le MLVR est qu'ils peuvent se lier directement sur au canal K_{Ca} , favoriser son ouverture et ainsi la sortie de K^+ , la diminution du potentiel membranaire et la fermeture des canaux Ca^{2+} . La troisième hypothèse sur l'action des EETs sur le MLVR est une interaction entre les EETs et les phospholipides. Cette interaction entraîne une ouverture des canaux K_{Ca} en provoquant un changement allostérique des canaux.

L'étude des médiateurs intercellulaires a permis de révéler qu'il y a production au niveau de l'épithélium de facteurs capables d'hyperpolariser le MLVR. En extrapolant de la définition d'un EDHF (Hecker, 2000), un EpDHF serait un facteur produit par l'épithélium qui se caractérise par sa capacité à hyperpolariser le MLVR par son action sur les canaux K_{Ca} de grande conductance (Dumoulin et al., 1998). Une des caractéristiques importantes d'un EpDHF est qu'il faut que le facteur hyperpolarisant ne soit pas produit par les voies métaboliques de la NOS ou/et de la COX. Ces deux voies métaboliques produisent respectivement le NO et les PGs (Bertrand et Tschirhart, 1993). Comme le démontre les expériences faites à l'aide de la technique de microélectrodes, les EETs produisent une hyperpolarisation du MLVR en présence d'inhibiteurs de ces voies métaboliques (L-NAME et indométhacine). Ceci semble démontrer le caractère EpDHF des EETs au niveau du tractus respiratoire. Dans le muscle lisse vasculaire plusieurs facteurs produits par

l'endothélium ont été identifiés comme des molécules bioactives qui possèdent une action hyperpolarisante sur le muscle lisse vasculaire. Les mêmes cascades métaboliques de l'acide arachidonique ont été identifiées au niveau de l'épithélium respiratoire (Bertrand et Tschirhart, 1993).

Dans le muscle lisse vasculaire, les produits du CYP450 époxygénase sont soupçonnés par plusieurs auteurs d'être des EDHFs (Campbell et Harder, 1999; Gebremedhin et al., 1998 ; Hecker, 2000). Par contre, au niveau respiratoire l'identification des EpDHF n'avait jamais été réalisée. Le rôle des produits de la NOS, de la COX ou de la LO a été identifié: les produits des deux premiers enzymes ont de façon générale une action relaxante sur les MLVRs, sauf pour les TxA₂ et la PGF₂ qui ont une action inotrope positive tout comme les produits de la LO (LTD₄). Les rôles physiologiques de la voie métabolique du CYP450 époxygénase dans les MLVRs ont été peu étudiés. Des études antérieures suggèrent la possibilité que les régioisomères de l'acide époxyeicosatriénoïque puissent être des EpDHF, puisqu'ils induisent une hyperpolarisation des MLVRs et qu'ils possèdent une action activatrice directe des canaux K_{Ca} de grande conductance (Dumoulin et al., 1998). Il semble donc qu'au niveau du tractus respiratoire, les EETs pourraient être considérés comme des EpDHF.

Le rôle des EETs sur les MLVRs serait semblable à celui qu'ils ont sur les MLVs. Les EpDHF, et donc possiblement les EETs, seraient libérés en plus grande quantité en situation physiologique normale. Par contre, lors d'une situation pathologique il y aurait un débalancement entre la diminution de la production

d'EDHFs et l'augmentation d'autres métabolites de l'acide arachidonique (leucotriènes et prostaglandines) qui produiraient des bronchoconstrictions.

Les canaux K_{Ca} sont également présents sur la membrane de surface et sarcolemmale d'autres cellules comme les neurones, ainsi les EETs pourraient avoir une action complémentaire au niveau des terminaisons nerveuses et agir sur la libération de neurotransmetteurs dans les synapses.

5. Conclusions

Cette étude a permis de mesurer les effets du 8,9- et du 14,15-EET sur la relaxation, sur l'hyperpolarisation du potentiel de membrane des MLVRs ainsi que sur l'activation directe des canaux K_{Ca} reconstitués dans une bicouche lipidique plane à partir de fractions microsomales provenant de trachées.

Il a été démontré que le 8,9- et le 14,15-EET relaxe d'une manière concentration dépendante les trachées et les bronches de cobayes précontractées avec un agoniste muscarinique. L'isomère d'EET le plus efficace semble être le 14,15-EET car, en considérant l'effet du solvant, il produit une plus grande relaxation que les autres. Un mécanisme possible pour l'effet des EETs au niveau des muscles lisses respiratoires en situation normale est que les EETs sont produits de façon continue par les cellules de l'épithélium et vont agir sur le MLVR en les hyperpolarisant et ainsi permettre de maintenir un tonus musculaire normal.

Par contre, en situation pathologique il y aurait au niveau de l'épithélium une moins grande production d'EETs et plus grande production de facteurs contractants tels que les leucotriènes puisque ces molécules proviennent toutes du même bassin d'acide arachidonique et par conséquent, il y aurait contraction du MLVR. Les EETs agiraient en activant les canaux K_{Ca} présents sur le MLVR, ce qui provoquerait une hyperpolarisation du potentiel de membrane de ces cellules et une relaxation du muscle. Cette activation du canal par les EETs pourrait se faire de façon directe entre le canal et la molécule bioactive ou indirecte, par l'activation d'un système de seconds messagers intracellulaires suite à sa liaison à un récepteur spécifique et indépendant.

De part leurs effets électrophysiologiques sur les muscles lisses respiratoires, les EETs produits par le CYP450 époxygénase peuvent être considérés comme des molécules modulatrices du tonus des MLVRs où ils semblent agir comme facteurs hyperpolarisants dérivés de l'épithélium. De plus, les effets hyperpolarisants des EETs en présence de L-NAME et d'indométhacine, inhibiteurs de NOS et COX, semblent démontrer que les EETs répondent à la définition pharmacologiques et fonctionnelles des EpDHF.

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais grandement remercier Dr Éric Rousseau pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour avoir participé à ma formation scientifique.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce projet. En particulier le Dr Alain Cadieux qui m'a permis d'utiliser l'un de ses montages expérimentaux et m'a fait bénéficier de son expertise scientifique ainsi que son équipe : Sophie B. Gaudreault qui m'a appris à travailler avec les bains d'organe isolé, Simon Adam et Marlyne Beattie qui m'ont été d'un grand secours à plus d'une reprise.

Je remercie toutes les personnes qui ont formé l'équipe du Bilarium que j'ai connu et apprécié : Dany Salvail, Karel Côté qui a partagé avec moi les méandres des études supérieures et finalement, Sonia Proteau qui m'a expliqué et aidé à plusieurs reprises dans les expériences biochimiques et Dr Barbara Renaudon qui m'a appris la technique de microélectrodes mais surtout a été un modèle de persévérance.

Je voudrais aussi remercier mes parents Jacinthe Bachand et Réal Benoit ainsi que mes sœurs Geneviève et Élisabeth qui m'ont grandement soutenu et encouragé.

Je remercie les membres de jury de mon mémoire Dr Paul Pape, Dr James Martin et Dr Éric Rousseau qui ont bien voulu évaluer mon mémoire de maîtrise. Je tiens également à remercier le CRM du Canada pour leur subvention (CRM MT-15173).

Bibliographic

- Adelman, J. P., Shen, K. Z., Kavanaugh, M. P., Warren, R. A., Wu, Y. N., Lagrutta, A., Bond, C. T., et North, R. A. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* 1992; 15: 209-216.
- Aggarwal, S. K. et MacKinnon, R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 1996; 42 : 1169-1177.
- Agosti, J. M., Altman, L. C., Ayars G.H., Loegering, D. A. Gleich G. J., et Klebanoff, S. J. The injurious effect of eosinophil peroxidase, hydrogen peroxide, and halides on pneumocytes *in vitro*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1987; 79: 496-511.
- Alioua, A., Huggins, J. P., et Rousseau, E. PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GK_{Ca} channels from tracheal smooth muscle. *American Journal of Physiology* 1995; 268: L1057-L1063.
- Amedee, T., Benham, C. D., Bolton, T. B., Byrne, N. G., et Large, W. A. Potassium, chloride and non-selective cation conductances opened by noradrenaline in rabbit ear artery cells. *Journal of Physiology* 1990; 376: 551-568.
- Anderson, C. S., MacKinnon, R., Smith, C., et Miller, C. Charybdotoxin block of single Ca²⁺-activated K⁺ channels. Effects of channel gating, voltage, and ionic strength. *Journal of General Physiology* 1988; 73: 317-333.
- Atkinson, N. S., Robertson, G. A., et Ganetzky, B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* 1991; 4: 551-555.
- Barnes, P. J. Pharmacology of airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998; 30: S123-S132.
- Barnes, P. J., et Woolcock, A. J. Difficult asthma. *European Respiratory Journal* 1998; 48: 1209-1218.
- Bauersachs, J., Hecker, M., et Busse, R. Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation. *British Journal of Pharmacology* 1994; 113: 1548-1553.
- Bernstrom, K., Kayganich, K., et Murphy, R. C. Incorporation and distribution of epoxyeicosatrienoic acids into cellular phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 3686-3690.

- Bertrand, C., et Tschirhart, E. Epithelial factors: modulation of the airway smooth muscle tone. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 1993; 7: 261-273.
- Black, J. L., et Barnes, P. J. Potassium channels and airway function: new therapeutic prospects. *Thorax* 1990; 54: 213-218.
- Brayden, J. E., et Nelson, M. T. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 1992; 24: 532-535.
- Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D. P., Wei, A., et Salkoff, L. mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* 1993; 5: 221-224.
- Cadieux, A., Lanoue, C., Sirois, P., et Barabe, J. Carbamylcholine- and 5-hydroxytryptamine-induced contraction in rat isolated airways: inhibition by calcitonin gene-related peptide. *British Journal of Pharmacology* 1990; 101: 193-199.
- Campbell, W. B., Gebremedhin, D., Pratt, P. F., et Harder, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circulation Research* 1996; 78: 415-423.
- Campbell, W. B., et Harder, D. R. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circulation Research* 1999; 84: 484-488.
- Candia, S., Garcia, M. L., et Latorre, R. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Biophysical Journal* 1992; 156: 583-590.
- Capdevila, J. H., Chacos, N., Falck, J. R., Manna, S., Negro-Vilar, A., et Ojeda, S. R. Novel hypothalamic arachidonate products stimulate somatostatin release from the median eminence. *Endocrinology* 1983; 113: 421-423.
- Capdevila, J. H., Falck, J. R., et Estabrook, R. W. Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB* 1992b; 6: 731-736.
- Capdevila, J. H., Falck, J. R., et Estabrook, R. W. Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB Journal* 1992a; 6: 731-736.
- Capdevila, J. H., Karara, A., Waxman, D. J., Martin, M. V., Falck, J. R., et Guengerich, F. P. Cytochrome P-450 enzyme-specific control of the regio- and enantiofacial selectivity of the microsomal arachidonic acid epoxidase. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 5: 10865-10871.
- Capdevila, J. H., Parkhill, L., Chacos, N., Okita, R., Masters, B. S., et Estabrook, R. W. The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P-450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1981; 101: 1357-1363.

- Capdevila, J. H., Wei, S., Yan, J., Karara, A., Jacobson, H. R., Falck, J. R., Guengerich, F. P., et DuBois, R. N. Cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase. Regulatory control of the renal epoxygenase by dietary salt loading. *Journal of Biological Chemistry* 1992c; 25: 21720-21726.
- Carl, A., Lee, H. K., et Sanders, K. M. Regulation of ion channels in smooth muscles by calcium. *American Journal of Physiology* 1996; 86: C9-34.
- Chang, C. P., Dworetzky, S. I., Wang, J., et Goldstein, M. E. Differential expression of the alpha and beta subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel: implication for channel diversity. *Brain Research Molecular Brain Research* 1997; 42: 33-40.
- Cinti, D. L., et Feinstein, M. B. Platelet cytochrome P450: a possible role in arachidonate-induced aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1976; 8: 171-179.
- Corrigan, C. J., et Kay, A. B. The roles of inflammatory cells in the pathogenesis of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *American Review of Respiratory Disease* 1991; 143: 1165-1168.
- Costello, R. W., Jacoby, D. B., et Fryer, A. D. Pulmonary neuronal M2 muscarinic receptor function in asthma and animal models of hyperreactivity. *Thorax* 1998; 61: 613-616.
- Devereux, T. R., Serabjit-Singh, C. J., Slaughter, Shelley R., Wolf, C. Roland, Philpot, Richard M., et Fouts, James R. Identification of Cytochrome P-450 Isozymes in Nonciliated Bronchiolar Epithelial (Clara) and Alveolar Type II Cells Isolated From Rabbit Lung. *Experimental Lung Research* 1981; 2: 221-230.
- DiAugustine, R. P., et Fouts, J. R. The effects of the unsaturated fatty acids on hepatic microsomal drug metabolism and cytochrome P-450. *Biochemical Journal* 1969; 115: 547-554.
- Diaz, L., Meera, P., Amigo, J., Stefani, E., Alvarez, O., Toro, L., et Latorre, R. Role of the S4 segment in a voltage-dependant calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 73: 32430-32436.
- DiChiara, T. J., et Reinhart, P. H. Distinct effects of Ca^{2+} and voltage on the activation and deactivation of cloned Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Journal of Physiology* 1995; 1: 403-418.
- Douglas, J. S. Receptors on target cells. Receptors on airway smooth muscle. *American Review of Respiratory Disease* 1990; 439: S123-S126.

- Driska, S. P., Laudadio, R. E., Wolfson, M. R., et Shaffer, T. H. A method for isolating adult and neonatal airway smooth muscle cells and measuring shortening velocity. *Journal of Applied Physiology* 1986; 412: 427-435.
- Dumoulin, M., Salvail, D., Gaudreault, S. B., Cadieux, A., et Rousseau, E. Epoxyeicosatrienoic acids relax airway smooth muscles and directly activate reconstituted K_{Ca} channels. *American Journal of Physiology* 1998; 275: L423-L431.
- Dworetzky, S. I., Boissard, C. G., Lum-Ragan, J. T., McKay, M. C., Post-Munson, D. J., Trojnacki, J. T., Chang, C. P., et Gribkoff, V. K. Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *Journal of Neuroscience* 1991; 1 : 4543-4550.
- Dworetzky, S. I., Trojnacki, J. T., et Gribkoff, V. K. Cloning and expression of a human large-conductance calcium-activated potassium channel. *Brain Research Molecular Brain Research* 1994; 53: 189-193.
- Ehlert, F. J., Ostrom, R. S., et Sawyer, G. W. Subtypes of the muscarinic receptor in smooth muscle. *Life Sciences* 1997; 61: 1729-1740.
- Fang, X., Kaduce, T. L., Weintraub, N. L., et Spector, A. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid: rapid incorporation and hydration of 14,15-epoxyeicosatrienoic acid in arterial smooth muscle cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1997; 143: 367-371.
- Fanger, C. M., Ghanshani, S., Logsdon, N. J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J., Beckingham, K., Chandy, K. G., Cahalan, M. D., et Aiyar, J. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance K_{Ca} channel, IK_{Ca1} . *Journal of Biological Chemistry* 1999; 26: 5746-5754.
- Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D. R., Fleming, I., et Busse, R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999; 30: 493-497.
- Fitzpatrick, F. A., et Murphy, R. C. Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: formation and biological actions of "epoxygenase"-derived eicosanoids. *Pharmacological Reviews* 1989; 40: 229-241.
- Fryer, A. D., et Maclagan, J. Muscarinic inhibitory receptors in pulmonary parasympathetic nerves in the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology* 1983; 78: 973-978.

- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J. P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G. J., et Garcia, M. L. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 76: 11083-11090.
- Garcia-Calvo, M., Knaus, H. G., McManus, O. B., Giangiaco, K. M., Kaczorowski, G. J., et Garcia, M. L. Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 465: 676-682.
- Gebremedhin, D., Harder, D. R., Pratt, P. F., et Campbell, W. B. Bioassay of an endothelium-derived hyperpolarizing factor from bovine coronary arteries: role of a cytochrome P450 metabolite. *Journal of Vascular Research* 1998; 35: 274-284.
- Gerthoffer, W. T. Regulation of the contractile element of airway smooth muscle. *American Journal of Physiology* 1991; 261: L15-L28.
- Giangiaco, K. M., Garcia-Calvo, M., Hans-Gunther, K., Mullmann, T. J., Garcia, M. L., et McManus, O. Functional reconstitution of the large-conductance, calcium-activated potassium channel purified from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* 1995; 5: 15849-15862.
- Giangiaco, K. M., Garcia, M. L., et McManus, O. B. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* 1992; 31: 6719-6727.
- Gong, M. C., Fuglsang, A., Alessi, D., Kobayashi, S., Cohen, P., Somlyo, A. V., et Somlyo, A. P. Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 10: 21492-21498.
- Grandordy, B. M., Cuss, F. M., Sampson, A. S., Palmer, J. B., et Barnes, P. J. Phosphatidylinositol response to cholinergic agonists in airway smooth muscle: relationship to contraction and muscarinic receptor occupancy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1986; 423: 273-279.
- Hartshorne, D. J., Ito, M., et Ikebe, M. Myosin and contractile activity in smooth muscle. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1989; 320: 269-277.
- Hashimoto, T., Hirata, M., et Ito, Y. A role for inositol 1,4,5-trisphosphate in the initiation of agonist-induced contractions of dog tracheal smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 1986; 26: 191-199.
- Hecker, M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor-fact or fiction? *News in Physiological Sciences* 2000; 15: 1-5.

- Hoebel, B. G., Steyrer, E., et Graier, W. F. Origin and function of epoxyeicosatrienoic acids in vascular endothelial cells: more than just endothelium-derived hyperpolarizing factor ? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1998; 25: 826-830.
- Holtzman, M. J. Arachidonic acid metabolism in airway epithelial cells. *Annual Review of Physiology* 1992; 54: 303-329.
- Irie, T., et Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996; 86 (2): 147-162.
- Jaggar, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., et Nelson, M. T. Calcium sparks in smooth muscle. *American Journal of Physiology* 2000; 278: C235-C256.
- Janssen, L.J., Acetylcholine and caffeine activate Cl^- and suppress K^+ conductances in human bronchial smooth muscle. *American Journal of Physiology* 1996; 270; L772-L781.
- Jones, A. H., Langdon, C. G., Lee, P. S., Lingham, S. A., Nankani, J. P., Follows, R. M., Tollemar, U., et Richardson, P. D. Pulmicort Turbohaler once daily as initial prophylactic therapy for asthma. *Respiratory Medicine* 1994; 152: 293-299.
- Kaczorowski, G. J., Knaus, H. G., Leonard, R. J., McManus, O. B., et Garcia, M. L. High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1996; 25: 255-267.
- Karara, A., Dishman, E., Blair, I., Falck, J. R., et Capdevila, J. H. Endogenous epoxyeicosatrienoic acids. Cytochrome P-450 controlled stereoselectivity of the hepatic arachidonic acid epoxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 1989; 25: 19822-19827.
- Katoh, T., Takahashi, K., Capdevila, J., Karara, A., Falck, J. R., Jacobson, H. R., et Badr, K. F. Glomerular stereospecific synthesis and hemodynamic actions of 8, 9-epoxyeicosatrienoic acid in rat kidney. *American Journal of Physiology* 1991; 261: F578-F586.
- Knaus, H. G., Garcia-Calvo, M., Kaczorowski, G. J., et Garcia, M. L. Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 11: 3921-3924.
- Knickle, L. C., et Bend, J. R. Bioactivation of arachidonic acid by the cytochrome P450 monooxygenases of guinea pig lung: the orthologue of cytochrome P450 2B4 is solely responsible for formation of epoxyeicosatrienoic acids. *Molecular Pharmacology* 1994; 45: 1273-1280.

- Komori, K., et Vanhoutte, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels* 1990; 27: 238-245.
- Kotlikoff, M. I., Kume, H., et Tomasic, M. Muscarinic regulation of membrane ion channels in airway smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology* 1992; 9: 5-10.
- Kume, H., Hall, I. P., Washabau, R. J., Takagi, K., et Kotlikoff, M. I. Beta-adrenergic agonists regulate K_{Ca} channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 153: 371-379.
- Kume, H., et Kotlikoff, M. I. Muscarinic inhibition of single K_{Ca} channels in smooth muscle cells by a pertussis-sensitive G protein. *American Journal of Physiology* 1991; Dec: C1204-C1209.
- Kume, H., Takai, A., Tokuno, H., et Tomita, T. Regulation of Ca^{2+} -dependent K^{+} -channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature* 1989; 14: 152-154.
- Kwan, C. Y., Lee, A. K., et Gover, A. K. Intracellular membrane fractionation of rat deferens smooth muscle. *Molecular Physiology* 1983; 3: 53-69.
- Laitinen, L. A., Heino, M., Laitinen, A., Kava, T., et Haahtela, T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *American Review of Respiratory Disease* 1985; 45: 599-606.
- Lawrence, T. E., Millecchia, L. L., et Fedan, J. S. Fluticasone propionate and pentamidine isethionate reduce airway hyperreactivity, pulmonary eosinophilia and pulmonary dendritic cell response in a guinea pig model of asthma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998; 115: 222-227.
- Leff, A. R. Endogenous regulation of bronchomotor tone. *American Review of Respiratory Disease* 1988; 63: 1198-1216.
- Leonard, R. J., Garcia, M. L., Slaughter, R. S., et Reuben, J. P. Selective blockers of voltage-gated K^{+} channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 271: 10094-10098.
- Li, P. L., Chen, C. L., Bortell, R., et Campbell, W. B. 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid stimulates endogenous mono-ADP-ribosylation in bovine coronary arterial smooth muscle. *Circulation Research* 1997; 85: 349-356.
- Liaw, J., Gau, Y. et Chao, Y.C. Effect of Baicalin on Tracheal Permeability in Ovalbumin Sensitized Guinea Pigs. *Pharmaceutical Research* 1999; 16 : 1653-1657.

- Lingle, C. J., Solaro, C. R., Prakriya, M., et Ding, J. P. Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. *Ion Channels* 1996; 350: 261-301.
- Lowry, O. H., Rosebrough, A. L., Farr, A. L., et Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 265-275.
- Lucchesi, K., Ravindran, A., Young, H., et Moczydlowski, E. Analysis of the blocking activity of charybdotoxin homologs and iodinated derivatives against Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Journal of Membrane Biology* 1989; 147: 269-281.
- MacKinnon, R., et Miller, C. Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Journal of General Physiology* 1988; Mar: 335-349.
- Marieb, N. H. *Anatomie et physiologie humaine*. ERPI, Saint-Laurent. 1993: Chap. 4
- McCann, J. D., et Welsh, M. J. Calcium-activated potassium channels in canine airway smooth muscle. *Journal of Physiology* 1986; 372: 113-127.
- McCobb, D. P., Fowler, N. L., Featherstone, T., Lingle, C. J., Saito, M., Krause, J. E., et Salkoff, L. A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology* 1995; 325: H767-H777.
- McCray, P. B., Jr., et Bentley, L. Human airway epithelia express a beta-defensin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1997; 46: 343-349.
- McDonald, T. F., Pelzer, S., Trautwein, W., et Pelzer, D. J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiological Reviews* 1994; 526: 365-507.
- McGiff, J. C. Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1981; 31: 339-369.
- McManus, O. B. Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1991; 321: 537-560.
- McManus, O. B., Helms, L. M., Pallanck, L., Ganetzky, B., Swanson, R., et Leonard, R. J. Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* 1995; 254: 645-650.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M., et Toro, L. Large conductance voltage- and calcium-dependent K^+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 9: 14066-14071.

- Meurs, H., Timmermans, A., Van Amsterdam, R. G., Brouwer, F., Kauffman, H. F., et Zaagsma, J. Muscarinic receptors in human airway smooth muscle are coupled to phosphoinositide metabolism. *European Journal of Pharmacology* 1989; 153: 369-371.
- Miller, C., et Racker, E. Ca^{2+} -induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers. *Journal of Membrane Biology* 1976; 35: 283-300.
- Mironneau, J., Arnaudeau, S., Macrez-Lepretre, N., et Boittin, F. X. Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves activate different Ca^{2+} -dependent ion channels in single myocytes from rat portal vein. *Cell Calcium* 1996; 453: 153-160.
- Miura, H., et Gutterman, D. D. Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Circulation Research* 1998; 83: 501-507.
- Miura, M., Belvisi, M. G., Stretton, C. D., Yacoub, M. H., et Barnes, P. J. Role of potassium channels in bronchodilator responses in human airways. *American Review of Respiratory Disease* 1992; 325: 132-136.
- Moczydlowski, E., et Latorre, R. Gating Kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ Channels from Rat Muscle Incorporated into Planar Lipid Bilayers. *Journal of General Physiology* 1983; 82: 511-542.
- Moss, G. W., et Moczydlowski, E. Rectifying conductance substates in a large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel: evidence for a fluctuating barrier mechanism. *Journal of General Physiology* 1996; 566: 47-68.
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., et Lefkowitz, J. B. Arachidonic Acid Metabolism. *Annual Review of Biochemistry* 1986; 55: 69-102.
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J., et Lederer, W. J. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 1995; 27: 633-637.
- Nelson, M. T., et Quayle, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology* 1995; 157: C799-C822.
- Nimigean, C. M., et Magleby, K. L. The beta subunit increases the Ca^{2+} sensitivity of large conductance Ca^{2+} -activated potassium channels by retaining the gating in the bursting states. *Journal of General Physiology* 1999; 523: 425-440.
- Okubo, S., Ito, M., Ichikawa, K., Konishi, T., Nakano, T., Kawamura, T., et Hartshorne, D. J. Smooth muscle myosin light chain phosphatase. *Japanese Journal of Pharmacology* 1993; 491: 267-275.

- Pallanck, L., et Ganetzky, B. Cloning and characterization of human and mouse homologs of the *Drosophila* calcium-activated potassium channel gene, slowpoke. *Human Molecular Genetics* 1994; 159: 1239-1243.
- Papazian, D., Rahamimoff, H., et Goldin, S. M. Reconstitution and purification by "transport specificity fractionation" of an ATP-dependent calcium transport component from synaptosome-derived vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 423: 3708-3712.
- Park, C. S., Hausdorff, S. F., et Miller, C. Design, synthesis, and functional expression of a gene for charybdotoxin, a peptide blocker of K^+ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 15: 2046-2050.
- Peng, W., Hoidal, J. R., et Farrukh, I. S. Role of a novel K_{Ca} opener in regulating K^+ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1999; 246: 737-745.
- Peng, W., Karwande, S. V., Hoidal, J. R., et Farrukh, I. S. Potassium currents in cultured human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Journal of Applied Physiology* 1996; 157: 1187-1196.
- Perez, G. J., Bonev, A. D., Patlak, J. B., et Nelson, M. T. Functional coupling of ryanodine receptors to K_{Ca} channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *Journal of General Physiology* 1999; Feb: 229-238.
- Petrou, S., Ordway, R. W., Hamilton, J. A., Walsh, J. V., Jr., et Singer, J. J. Structural requirements for charged lipid molecules to directly increase or suppress K^+ channel activity in smooth muscle cells. Effects of fatty acids, lysophosphatidate, acyl coenzyme A and sphingosine. *Journal of General Physiology* 1994; 580: 471-486.
- Popp, R., Bauersachs, J., Hecker, M., Fleming, I., et Busse, R. A transferable, beta-naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *Journal of Physiology* 1996; 15: 699-709.
- Robertson, B. E., Schubert, R., Hescheler, J., et Nelson, M. T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology* 1993; 46: C299-C303.
- Robertson, D. N., Coyle, A. J., Rhoden, K. J., Grandordy, B., Page, C. P., et Barnes, P. J. The effect of platelet-activating factor on histamine and muscarinic receptor function in guinea pig airways. *American Review of Respiratory Disease* 1988; 164: 1317-1322.

- Robitaille, R., Adler, E. M., et Charlton, M. P. Calcium channels and calcium-gated potassium channels at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology, Paris* 1993; 166: 15-24.
- Roffel, A. F., Elzinga, C. R., et Zaagsma, J. Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulmonary Pharmacology* 1990; 169: 47-51.
- Roman, R. J., et Alonso-Galicia, M. P-450 eicosanoids: A novel signaling pathway regulating renal function. *News in Physiological Sciences* 1999; 14: 238-242.
- Rosolowsky, M., et Campbell, W. B. Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Biochimica and Biophysica Acta* 1996; 19: 267-277.
- Roudbaraki, M. M., Vacher, P., et Drouhault, R. Arachidonic acid increases cytosolic calcium and stimulates hormone release in rat lactotrophs. *American Journal of Physiology* 1995; 268: E1215-E1223.
- Salvail, D., Dumoulin, M., et Rousseau, E. Direct modulation of tracheal Cl⁻ channel activity by 5,6- and 11,12-EET. *American Journal of Physiology* 1998; 275: L303-L317.
- Sands, S. B., Lewis, R. S., et Cahalan, M. D. Charybdotoxin blocks voltage-gated K⁺ channels in human and murine T lymphocytes. *Journal of General Physiology* 1989; 79: 1061-1074.
- Savaria, D., Lanoue, C., Cadieux, A., et Rousseau, E. Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle. *American Journal of Physiology* 1992; 262: L327-L336.
- Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M., et Bezanilla, F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 1996; 86: 1159-1167.
- Shimada, T., et Somlyo, A. P. Modulation of voltage-dependent Ca channel current by arachidonic acid and other long-chain fatty acids in rabbit intestinal smooth muscle. *Journal of General Physiology* 1992; 594: 27-44.
- Shimizu, T., et Wolfe, L. S. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *Journal of Neurochemistry* 1990; 55: 1-15.
- Silverman, E., In, K. H., Yandava, C., et Drazen, J. M. Pharmacogenetics of the 5-lipoxygenase pathway in asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 1998; 171: 3-33.

- Somlyo, A. P., et Himpens, B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB Journal* 1989; 177: 2266-2276.
- Somlyo, A. P., et Somlyo, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 174: 231-236.
- Sparrow, M. P., et Mitchell, H. W. Modulation by the epithelium of the extent of bronchial narrowing produced by substances perfused through the lumen. *British Journal of Pharmacology* 1991; 103: 1160-1164.
- Stefani, E., Ottolia, M., Noceti, F., Olcese, R., Wallner, M., Latorre, R., et Toro, L. Voltage-controlled gating in a large conductance Ca^{2+} -sensitive K^+ channel (hslo). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 13: 5427-5431.
- Sweeney, H. L., Yang, Z., Zhi, G., Stull, J. T., et Trybus, K. M. Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 608: 1490-1494.
- Takeda, H., Kogame, A., Tanaka, H. et Nagai, H. Time course study of airway inflammation and responsiveness by repeated provocation of aeroantigen in guinea pigs. *Prostaglandins* 1997; 54, 5: 805-820.
- Tseng-Crank, J., Foster, C. D., Krause, J. D., Mertz, R., Godinot, N., DiChiara, T. J., et Reinhart, P. H. Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca^{2+} -activated K^+ channel isoforms from human brain. *Neuron* 1994; 181: 1315-1330.
- Vazquez, J., Feigenbaum, P., King, V. F., Kaczorowski, G. J., et Garcia, M. L. Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in synaptic plasma membranes from rat brain. Evidence for a direct association with an inactivating, voltage-dependent, potassium channel. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 426: 15564-15571.
- Velden, V. H., et Versnel, H. F. Bronchial epithelium: morphology, function and pathophysiology in asthma. *European Cytokine Network* 1998; 525: 585-597.
- Vergara, C., et Latorre, R. Kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. Evidence for a Ca^{2+} and Ba^{2+} blockade. *Journal of General Physiology* 1983; 425: 543-568.
- Vignola, A. M., Chanez, P., Siena, L., Chiappara, G., Bonsignore, G., et Bousquet, J. Airways remodelling in asthma. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 1998; 11: 359-367.

- Voet, D., et Voet, J. G. *Biochemistry*. Wiley. New-York 1990: Chap. 34
- Wallner, M., Meera, P., Ottolia, M., Kaczorowski, G. J., Latorre, R., Garcia, M. L., Stefani, E., et Toro, L. Characterization of and modulation by a beta-subunit of a human maxi K_{Ca} channel cloned from myometrium. *Receptors and Channels* 1995; 35: 185-199.
- Watkins, P. B. Drug Metabolism by Cytochromes P450 in the Liver and Small Bowel. *Gastrointestinal Pharmacology* 1992; 21(3): 511-526.
- Wei, A., Jegla, T., et Salkoff, L. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* 1996; 185: 805-829.
- Wei, A., Solaro, C., Lingle, C., et Salkoff, L. Calcium sensitivity of BK-type K_{Ca} channels determined by a separable domain. *Neuron* 1994; 542: 671-681.
- Weintraub, N. L., Fang, X., Kaduce, T. L., VanRollins, M., Chatterjee, P., et Spector, A. A. Potentiation of endothelium-dependent relaxation by epoxyeicosatrienoic acids. *Circulation Research* 1997; 81: 258-267.
- Wenzel, S. E. Antileukotriene drugs in the management of asthma. *JAMA* 1998; 280: 2068-2069.
- Wolff, D., Cecchi, X., Spalvins, A., et Canessa, M. Charybdotoxin blocks with high affinity the Ca-activated K^+ channel of Hb A and Hb S red cells: individual differences in the number of channels. *Journal of Membrane Biology* 1988; 186: 243-252.
- Wong, P. Y., Lai, P. S., Shen, S. Y., Belosludtsev, Y. Y., et Falck, J. R. Post-receptor signal transduction and regulation of 14(R),15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) binding in U-937 cells. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* 1997; 75: 155-169.
- Wong, P. Y., Lin, K. T., Yan, Y. T., Ahern, D., Iles, J., Shen, S. Y., Bhatt, R. K., et Falck, J. R. 14(R),15(S)-epoxyeicosatrienoic acid (14(R),15(S)-EET) receptor in guinea pig mononuclear cell membranes. *Journal of Lipid Mediators* 1993; 327: 199-208.
- Zeldin, D. C., Plitman, J. D., Kobayashi, J., Miller, R. F., Snapper, J. R., Falck, J. R., Szarek, J. L., Philpot, R. M., et Capdevila, J. H. The rabbit pulmonary cytochrome P450 arachidonic acid metabolic pathway: characterization and significance. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 95: 2150-2160.
- ZhuGe, R., Sims, S. M., Tuft, R. A., Fogarty, K. E., et Walsh, J. V., Jr. Ca^{2+} sparks activate K^+ and Cl^- channels, resulting in spontaneous transient currents in guinea-pig tracheal myocytes. *Journal of Physiology* 1998; 15: 711-718.

Zosmer, A., Rendell, N. B., Taylor, G. W., Elder, M. G., et Sullivan, M. H. F. Formation and metabolism of 14,15-epoxyeicosatrienoic acid by human reproductive tissues. *Biochimica and Biophysica Acta* 1995; 1258: 234-240.