



UNIVERSITÉ DE  
**SHERBROOKE**

**Effets électrophysiologiques de l'acide 20-  
hydroxyeicosatétraénoïque sur les muscles lisses des voies  
respiratoires.**

par  
**Martin Cloutier**

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)

**Composition du Jury**

Dr Paul C. Pape : Membre du programme  
Dr Éric Rousseau : Maître de thèse  
Dr Pierre Larivée : Examineur externe

Février 2003

**À tous les membres de ma famille,  
À tous mes amis et ceux que j'ai oubliés...**

## Table des matières

<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTES DES TABLEAUX ET DES FIGURES .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>12</b>
RÔLE ET DESCRIPTION ANATOMIQUE DES VOIES RESPIRATOIRES .....	12
CONTRÔLE DE LA TENSION MÉCANIQUE DES MLVR .....	15
<i>Couplage pharmacomécanique .....</i>	<i>17</i>
<i>Modulation électromécanique .....</i>	<i>25</i>
L'ACIDE ARACHIDONIQUE ET LE SYSTÈME RESPIRATOIRE.....	29
<i>Synthèse de l'acide arachidonique .....</i>	<i>29</i>
<i>Métabolisme de l'acide arachidonique .....</i>	<i>30</i>
PHARMACOLOGIE DU 20-HETE .....	33
<i>Synthèse du 20-HETE.....</i>	<i>33</i>
<i>Effet du 20-HETE sur les MLV non-pulmonaires .....</i>	<i>35</i>
<i>Effet du 20-HETE sur les MLV pulmonaires.....</i>	<i>39</i>
<i>Effet du 20-HETE sur les MLVR .....</i>	<i>40</i>
CONTEXTE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DE L'ÉTUDE .....	41
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>43</b>
MESURES DE TENSION ISOMÉTRIQUE .....	43
<i>Préparation des fragments de bronche et de trachée de cobaye.....</i>	<i>43</i>
<i>Mesures des tensions musculaires isométriques .....</i>	<i>43</i>
<i>Analyses statistiques.....</i>	<i>46</i>
TECHNIQUE DE MICROÉLECTRODES .....	46
<i>Préparation des trachées de lapin et de chien .....</i>	<i>46</i>
<i>Mesure des potentiels transmembranaires.....</i>	<i>47</i>
<i>Analyse des résultats et statistiques .....</i>	<i>48</i>
CULTURE DES CELLULES PRIMAIRES DE MUSCLES LISSES DES VOIES RESPIRATOIRES.....	51
<i>Prélèvement et culture des cellules du MLVR (en condition stérile sous la hotte) ....</i>	<i>51</i>
TECHNIQUE D'IMAGERIE CELLULAIRE .....	52
<i>Description de la technique et du montage expérimental .....</i>	<i>52</i>
<i>Protocole expérimental et pharmacologie .....</i>	<i>53</i>
<i>Analyse et prise d'images.....</i>	<i>53</i>
TECHNIQUE DE PURIFICATION DES ARNm DES CELLULES DE MLVR .....	54
<i>Extraction de l'ARN total .....</i>	<i>54</i>
<i>Transcription inverse.....</i>	<i>56</i>
<i>Amplification des ADNc .....</i>	<i>57</i>
RECONSTITUTION DES CANAUX CL <sup>-</sup> DANS DES BICOUCHES LIPIDIQUES PLANES .....	58
<i>Préparation des fractions microsomales de trachées de bœufs .....</i>	<i>58</i>
<i>Méthode de reconstitution membranaire.....</i>	<i>59</i>

<i>Analyse des courants chlores</i> .....	64
<b>RÉSULTAT</b> .....	<b>65</b>
EFFET INOTROPE POSITIF DU 20-HETE SUR LES MLVR.....	65
<i>Le 20-HETE contracte les MLVR de cobaye</i> .....	65
<i>Le 20-HETE agit également sur des cellules isolées de MLVR en culture primaire</i> .	68
<i>Implication du Ca<sup>2+</sup> intra et extracellulaire dans l'effet inotrope positif du 20-HETE</i> .....	70
<i>Implication de canaux calciques dans la contraction induite le 20-HETE</i> .....	72
<b>L'EFFET CONTRACTURANT DU 20-HETE IMPLIQUE UNE ACTIVITÉ DES COX</b> .....	<b>75</b>
<i>Effet du 20-HETE sur le potentiel transmembranaire des MLVR de lapin</i> .....	77
<i>Effet de l'OAG sur le potentiel transmembranaire</i> .....	81
<i>Effet du 20-HETE sur les canaux ioniques des MLVR bovin</i> .....	84
<i>Le 20-HETE active un courant macroscopique cationique et non-sélectif sur les cellules isolées de cobaye</i> .....	90
<i>Mise en évidence de l'expression de l'ADNc des TRPC dans les MLVR</i> .....	93
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>95</b>
EFFET DU 20-HETE SUR LA TENSION MÉCANIQUE .....	95
EFFETS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES DU 20-HETE .....	99
LE 20-HETE N'A PAS D'EFFET DIRECT SUR LES CANAUX IONIQUES.....	101
MODULATION DES COURANTS CATIONIQUES NON-SÉLECTIFS PAR LE 20-HETE .....	102
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>105</b>
<b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>106</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>108</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>109</b>

## Listes des tableaux et des figures

Figure 1- Schéma résumant l'anatomie de la trachée.....	13
Figure 2- Schéma de la cascade d'activation induite par les agonistes muscariniques via le $Ca^{2+}$ et amenant à la contraction du muscle lisse. ....	16
Figure 3- Schéma résumant la distribution des récepteurs cholinergiques dans le réseau conducteur parasympathique vers les MLVR. ....	18
Figure 4- Schéma d'une cascade d'activation induit par l'ACh induisant une contraction et une variation du potentiel transmembranaire des MLVR. ....	21
Figure 5- Schéma représentant le chevauchement fonctionnel entre les voies muscariniques et $\beta_2$ -adrénergiques dans le mécanisme de contraction des MLVR.....	23
Figure 6- Mécanisme de contraction des muscles lisses impliquant la voie des Rho-kinases qui est $Ca^{2+}$ -indépendant.....	24
Figure 7- Schéma représentant la localisation sous-membranaire du RS dans les MLVR. ....	27
Figure 8- Schéma montrant les diverses voies de synthèse de l'acide arachidonique à partir d'un phospholipide membranaire. ....	30
Figure 9- Schéma montrant le métabolisme de l'acide arachidonique dans les vaisseaux ainsi que des inhibiteurs pouvant être utilisés. ....	32
Tableau 1- Localisation des isoformes des CYP450 $\omega$ -hydroxylase et leur produit selon l'espèce et le tissu. ....	34
Figure 10- Mécanisme de contraction des MLV intégrant les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le mode d'action du 20-HETE.....	38
Figure 11- Photos de la cuve d'organe isolé et représentation du montage expérimental utilisé pour les mesures de tension isométrique. ....	45
Figure 12- Schéma (A) et photo (B) de la chambre expérimentale utilisée pour la technique de microélectrode.....	50
Figure 13- Structures chimiques en 2 dimensions des trois phospholipides utilisés pour la technique des bicouches lipidiques planes. ....	61
Figure 14- Schéma du montage expérimentale utilisé lors de la technique des bicouches lipidiques planes. ....	63

Figure 15- Effet dose-dépendant du 20-HETE sur les muscles lisses des voies respiratoires de cobaye avec un épithélium intact.....	67
Figure 16- Exemple de l'effet du 20-HETE sur des cellules isolées de MLVR de chien..	69
Figure 17- La contraction des MLVR de cobaye induit par le 20-HETE implique des mouvements calciques dans la cellule.....	71
Figure 18- Effet de deux bloqueurs de conductances cationiques sur la tension mécanique des MLVR induite par le 20-HETE.....	74
Figure 19- Influence de l'indométhacine sur le tonus des MLVR de cobaye et sur la réponse des tissus au 20-HETE.....	76
Figure 20- Effet du 20-HETE sur le potentiel transmembranaire des MLVR de lapin. ....	79
Figure 21- Effet de l'OAG sur potentiel transmembranaire des MLVR de chien avec épithélium.....	83
Figure 22- Le 20-HETE n'a pas d'effet direct sur l'activité du canal Cl <sup>-</sup> natif reconstitués dans des bicouches lipidiques planes.....	87
Figure 23- Le 20-HETE n'a pas d'effet direct sur les canaux K <sub>Ca</sub> natifs reconstitués dans des bicouches lipidiques planes.....	89
Figure 24- Activation par le 20-HETE d'un courant entrant non-sélectif et expression des TRPC dans les MLVR de cobaye.....	92
Figure 25- Expression des ARNm de différents TRPC provenant des cellules isolées de MLVR de cobaye et de rat.....	94

## Liste des symboles et abréviations

$[Ca^{2+}]_i$	Concentration intracellulaire de $Ca^{2+}$ libre
17-ODYA	Acide 17-octadécanoïque
AA	Acide arachidonique
AC	Adénylate cyclase
ACh	Acétylcholine
ADNc	Acide déoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine-3',5'-monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BLP	Bicouches lipidiques planes
CaM	Calmoduline
CCh	Chlorure de carbamylcholine
ChTX	Charybdotoxine
COX	Cyclooxygénase
CYP450	Cytochrome P450
DAG	Diacylglycérol
DDMS	N-méthylsulfonyl-12,12-dibromododéc-11-énamide
DTT	DL-Dithiotréitol
EC <sub>50</sub>	Concentration efficace produisant 50% de l'effet
EET	Acide époxyeicosatriénoïque
EGTA	« Ethyleneglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid »

<b>EtBr</b>	Bromure d'éthidium
<b>FBS</b>	Sérum fœtal de bovin
<b>GDP</b>	Guanosine-5'-diphosphate
<b>GTP</b>	Guanosine-5'-triphosphate
<b>HEPES</b>	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
<b>HETE</b>	Acide hydroxyeicosatétraénoïque
<b>HpETE</b>	Acide Hydroperoxyeicosatétraénoïque
<b>IbTX</b>	Ibériotoxine
<b>InsP<sub>3</sub></b>	Inositol 1, 4, 5-triphosphate
<b>InsP<sub>3</sub>R</b>	Récepteur à l'inositol 1, 4, 5-triphosphate
<b>K<sub>Ca</sub></b>	Canal potassique activé par le Ca <sup>2+</sup> intracellulaire
<b>MAG</b>	2-monoacylglycérol
<b>MAPK</b>	« Mitogen-activated protein kinase »
<b>MEM</b>	« Minimum essential media »
<b>MLCK</b>	Kinase des chaînes légères de la myosine
<b>MLCP</b>	Phosphatase des chaînes légères de la myosine
<b>MLV</b>	Muscle lisse vasculaire
<b>MLVR</b>	Muscles lisses des voies respiratoires
<b>MPOC</b>	Maladie pulmonaire obstructive chronique
<b>nH</b>	Constante de Hill
<b>OAG</b>	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
<b>PAPH</b>	Acide phosphatidique phosphohydrolase
<b>PC</b>	Phosphatidylcholine



<b>PE</b>	Phosphatidyléthanolamine
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
<b>PKA</b>	Protéine kinase A
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PLC<sub>β</sub></b>	Phospholipase C <sub>β</sub>
<b>PLD</b>	Phospholipase D
<b>P<sub>o</sub></b>	Probabilité d'ouverture d'un canal ionique
<b>PS</b>	Phosphatidylsérine
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>RS</b>	Réticulum sarcoplasmique
<b>RT-PCR</b>	« Reverse transcriptase polymerase chain reaction »
<b>RyR</b>	Récepteur à la ryanodine
<b>SERCA</b>	Pompe du Réticulum Sarco[Endo]plasmique Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> - ATPase
<b>TEA</b>	Tétraéthylammonium
<b>TIU</b>	« Trypsin inhibitory unit »
<b>TRPC</b>	« Transient receptor potential canonical »

## Résumé

### **Martin Cloutier. Effets électrophysiologiques de l'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque sur les muscles lisses des voies respiratoires.**

L'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE) est un métabolite de l'acide arachidonique produit par les cytochrome P450  $\omega$ -hydroxylase. C'est un des eïcosanoïdes qui sont impliqués dans la modulation du tonus des cellules de muscle lisse des voies respiratoires (MLVR). Il a été rapporté que les réponses des muscles lisses au 20-HETE sont différentes selon l'espèce ou le type de tissu sur lequel il est appliqué. Le but de cette étude est de quantifier les effets du 20-HETE sur le tonus et sur les propriétés électrophysiologiques des MLVR de mammifère. Des expériences de mesures de tension isométriques, réalisées sur les MLVR de cobaye, ont montré que le 20-HETE induit un effet inotrope positif qui est dépendant de la concentration utilisée avec une valeur de  $EC_{50}$  de 1.5  $\mu$ M de 20-HETE et un coefficient de Hill de 0.77. De plus, l'effet inotrope du 20-HETE exogène persiste en absence d'épithélium. Par contre, il est aboli par un prétraitement à l'indométhacine qui est utilisée comme inhibiteur des cyclooxygénases. Les contractions induites par le 20-HETE dans des milieux modifiés en  $Ca^{2+}$  montre qu'il déclenche une phase transitoire due à une libération du  $Ca^{2+}$  intracellulaire suivit d'une phase tonique nécessitant une entrée de  $Ca^{2+}$  en présence de 2.5 mM de  $CaCl_2$  extracellulaire. De plus, le 20-HETE induit une dépolarisation significative du potentiel de membrane ( $V_m$ ) des cellules de MLVR de cobaye et de lapin. Ce dernier effet est indépendant de l'épithélium. De plus 30  $\mu$ M de 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) qui active directement des conductances cationiques non-sélectives, dépolarise de 6 mV les cellules de MLVR de chien. Le 20-HETE n'a pas d'effet direct sur les canaux  $K_{Ca}$  et  $Cl^-$

reconstitué dans les BLP mais il pourrait très bien modifier leur activité via des cascades intracellulaires comme cela a été rapporté pour les canaux  $K_{Ca}$  dans les muscles lisses vasculaires. Des mesures en « Patch Clamp » montre que le 20-HETE augmente un courant entrant cationique, non-sélectif entrant des cellules isolées de MLVR de cobaye. Les conductances impliquées dans le contrôle du  $V_m$  et de l'entrée du  $Ca^{2+}$  pourrait donc être des conductances cationiques non-sélectives, supportées par les canaux de type TRPC et éventuellement des canaux  $Ca^{2+}$  de type L. Ces résultats montrent que le 20-HETE module le tonus des MLVR par l'entremise d'effets électrophysiologiques. De plus l'expression des ARNm des TRPC3, 4, 5 et 6 dans les cellules isolées de MLVR de cobaye et de rat a été vérifiée ce qui supporte l'une de nos conclusions.

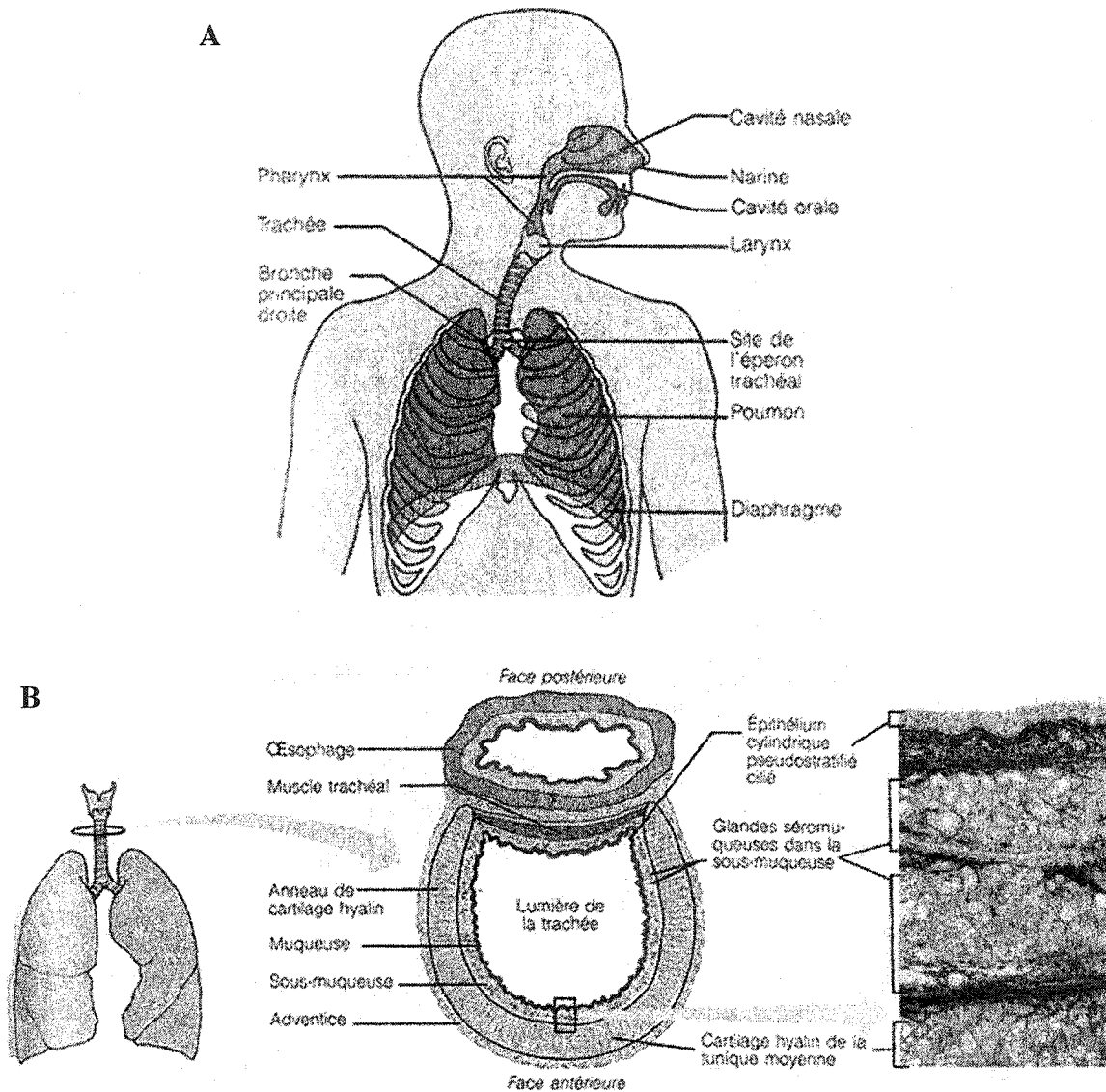
**Mots Clefs :** Asthme, Bronches, Contraction, Eicosanoïde, Électrophysiologie.

## **Introduction**

### **Rôle et description anatomique des voies respiratoires**

Les organes du système respiratoire sont le nez, le pharynx, le larynx, la trachée, les bronches et les poumons, qui contiennent des bronchioles qui se terminent par les sacs alvéolaires. D'un point de vue fonctionnel, le système respiratoire est constitué d'une zone de conduction et d'une zone où s'effectue la respiration externe. Cette dernière s'effectue dans les alvéoles où se produit les échanges gazeux ( $O_2$  et  $CO_2$ ). Les organes de la zone de conduction ont le rôle de filtrer, d'humidifier et de réchauffer l'air inspiré. Parvenu dans les poumons, l'air contient beaucoup moins d'agents irritants (poussière, bactérie, etc.) qu'à son entrée dans le système.

La trachée s'étend du larynx au médiastin (Fig. 1A). Elle se termine au milieu du thorax en donnant naissance aux deux bronches principales, ou bronches souches. La paroi de la trachée est composée de couches communes à de nombreux organes tubulaires (Fig. 1B) : une muqueuse qui est constituée de cellules épithéliales ciliées recouverte de mucus, une sous-muqueuse composée de glandes séromuqueuses qui sécrètent le mucus, une tunique moyenne qui est formé de cartilage hyalin, une adventice qui est une couche de tissus conjonctif qui recouvre la trachée. Le feuillet de muscles lisses situé dans la paroi postérieure de la trachée constitue la media. La contraction du muscle lisse trachéal, diminuant ainsi son diamètre, a pour rôle d'accroître la force de poussée de l'air expiré pour favoriser la sortie du mucus de la trachée pendant la toux. La trachée se subdivise en deux bronches (la gauche et la droite) à partir de l'éperon trachéal.



Marieb, 1993

**Figure 1- Schéma résumant l'anatomie de la trachée.**

**A :** Schéma de la trachée et des principaux organes par rapport aux structures environnantes. **B :** Schéma et coupe histologique montrant la composition cellulaire de la paroi de la trachée.

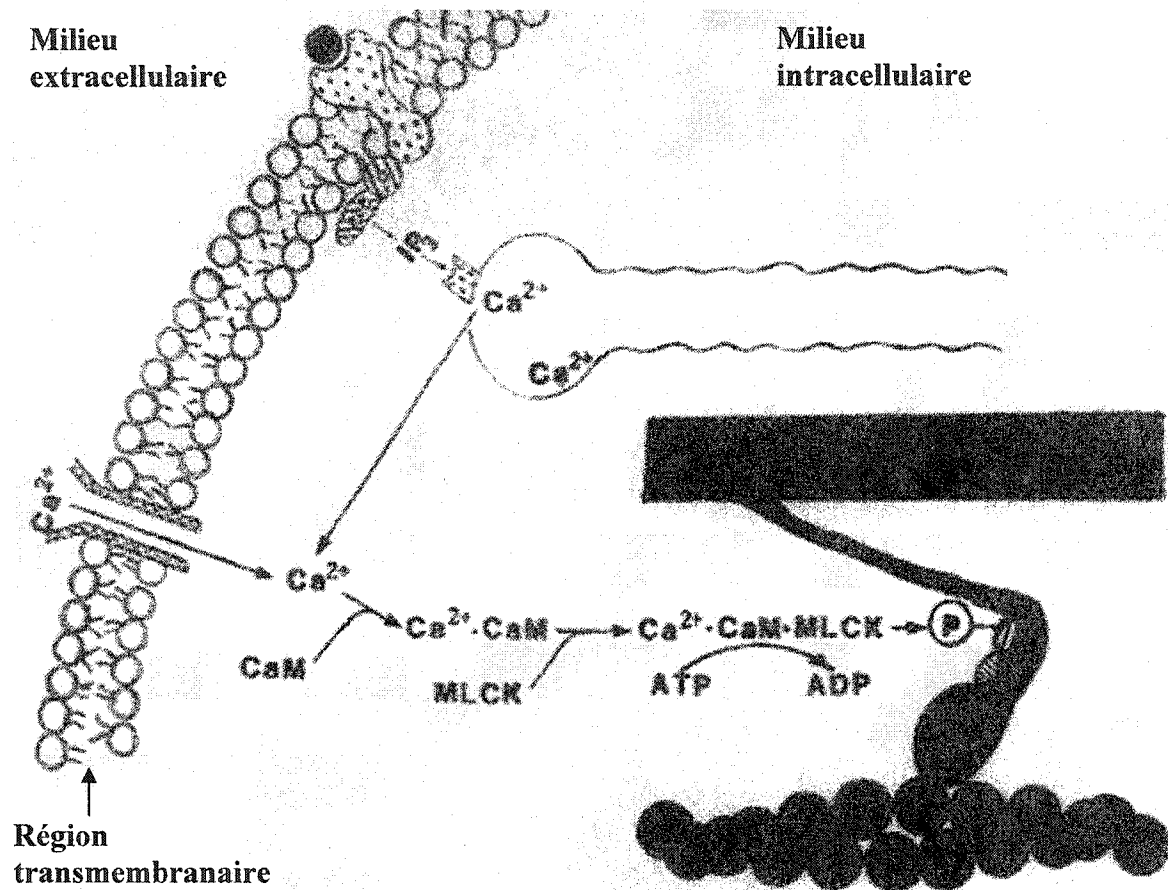
Les bronches, une fois entrées dans les poumons, se subdivisent en bronches secondaires, ensuite en bronches tertiaires et ainsi de suite. Il y a en tout 23 ordres de subdivisions de conduits aériens dans les poumons. La proportion de muscle lisse dans la paroi s'accroît à mesure que les conduits aériens diminuent en diamètre. Comme les bronchioles sont entièrement entourées de muscle lisse circulaire, elles offrent dans certaines conditions une résistance au passage de l'air. Ce muscle lisse est sensible à la stimulation cholinergique du système nerveux et aux substances inflammatoires, qui causent une vigoureuse contraction des bronchioles et une résistance marquée de l'écoulement des gaz. De fait, l'intensité de la bronchoconstriction qui accompagne une crise d'asthme aiguë peut faire cesser presque complètement la ventilation pulmonaire et ce quel que soit le gradient de pression. Inversement, la noradrénaline, un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques qui est libérée à la suite d'une stimulation sympathique ou administrée à des fins thérapeutiques, dilate les bronchioles et réduit la résistance. Les accumulations locales de mucus, les matières infectieuses et les tumeurs obstruant les conduits aériens constituent d'importantes sources d'obstruction des mouvements d'air lors des maladies respiratoires comme les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC). Ces obstructions augmentent considérablement les efforts de respirations qui parfois ne suffisent pas à rétablir une ventilation adéquate des alvéoles. Par ailleurs, l'hyperactivité bronchique reste un problème important qui justifie l'étude du couplage excitation-contraction dans les muscles lisses des voies respiratoires (MLVR). De plus, l'hypertrophie et l'hyperplasie de la media, dans les cas d'asthme chronique, justifient que l'on s'attarde à mieux étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la réactivité des MLVR.

## Contrôle de la tension mécanique des MLVR

Le couplage excitation-contraction des MLVR se fait selon deux modes: le couplage pharmacomécanique qui peut être modulé par un couplage électromécanique. Ces deux mécanismes ont pour effet d'augmenter la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans le cytosol amenant la cellule à se contracter suivant une cascade d'activation biochimique (Somlyo et Somlyo, 1994; Janssen, 2002). Éventuellement des mécanismes compensateurs (Feed-Back) permettent de contrôler la relaxation des MLVR. Au niveau intracellulaire et moléculaire, quatre atomes de  $\text{Ca}^{2+}$  vont se fixer à la calmoduline (CaM). Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM va se lier à la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK) ce qui la rend active. Ce nouveau complexe va utiliser l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) pour ajouter un groupement phosphate sur une chaîne légère de la myosine ce qui va ensuite augmenter les interactions entre les myosines phosphatées et les filaments d'actine pour provoquer la contraction des cellules de muscle lisse (Fig. 2).

Les changements de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) des MLVR peuvent être décomposés en deux parties: une partie transitoire rapide qui survient toujours suite à un stimulus pharmacologique puis une partie soutenue qui suit la première phase seulement si le stimulus est toujours présent (Pacaud et Bolton, 1991). Ces deux voies impliquent une augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  qui provient soit des réserves calciques intracellulaires pour la partie transitoire, soit du milieu extracellulaire pour la partie soutenue après que les réserves calciques aient été vidées (Pacaud et Bolton, 1991). Lorsque le stimulus est terminé, le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est repompé dans les réserves intracellulaires par la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (SERCA). Il est aussi extrudé de la cellule par des

pompes calciques ATP-dépendant et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , situés dans le sarcolemme (Janssen, 2002).



modifiée d'après Barany, 1996

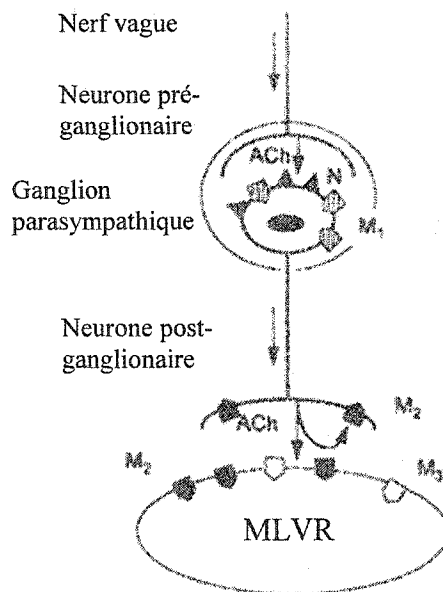
Figure 2- Schéma de la cascade d'activation induite par les agonistes muscariniques via le  $\text{Ca}^{2+}$  et amenant à la contraction du muscle lisse.

L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire provenant du milieu extracellulaire et des réserves internes induit une cascade d'activation amenant à la phosphorylation de la tête de myosine qui va ensuite tirer sur le filament d'actine pour contracter le muscle lisse.



### **Couplage pharmacomécanique**

Les différents types de couplage pharmacomécanique s'effectuent par l'intermédiaire de cascades de signalisation extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire qui peuvent influencer le tonus produit par les cellules musculaires, sans en affecter leur potentiel membranaire. Ce mécanisme est initié suite à la liaison d'un agent pharmacologique comme l'histamine et l'acétylcholine (ACh), à leur récepteur respectif. Le système nerveux parasympathique est le principal système qui contrôle la bronchoconstriction. Les innervations dominantes des voies respiratoires sont les fibres parasympathiques qui emprunte le nerf vague jusqu'aux ganglions parasympathiques. À partir de ces ganglions, de courtes fibres postsynaptiques se rendent au MLVR et aux glandes séromuqueuses (Fig. 3). L'ACh, qui est le principal neurotransmetteur du système nerveux parasympathique, est libéré dans les synapses ganglionnaires et active le récepteur nicotinique et le récepteur muscarinique  $M_1$  du neurone postganglionnaire. Cette activation produit un potentiel d'action qui se propage le long du neurone et se rend à la jonction neuromusculaire où il induit une autre libération d'ACh. Cet ACh va activer les récepteurs muscariniques  $M_2$  et  $M_3$  situés à la membrane postsynaptique des cellules de muscle lisse induisant ainsi une augmentation du tonus musculaire. Le récepteur  $M_2$  est aussi présent à la membrane présynaptique et il est aussi activé par l'ACh pour permettre la formation d'une boucle de rétroaction négative limitant la relâche subséquente de neurotransmetteur (Roux et al., 1998).



Roux et al., 1998

**Figure 3- Schéma résumant la distribution des récepteurs cholinergiques dans le réseau conducteur parasympathique vers les MLVR.**

L'influx nerveux arrive au MLVR par l'entremise de deux synapses où les neurones libèrent de l'ACh qui va activer séquentiellement des récepteurs nicotiques (N) et muscariniques ( $M_1$ ) sur les neurones ganglionnaires puis d'autres muscariniques ( $M_2$  et  $M_3$ ) sur la membrane plasmique des cellules de MLVR.

Les récepteurs nicotiniques appartiennent à la famille des récepteurs protéiques formant des canaux qui ont pour fonction, une fois activés, de s'ouvrir pour laisser passer des cations monovalents ( $Na^+$ ) et donc de ce fait, induire une dépolarisation qui conduit à la génération d'un potentiel d'action du neurone effecteur. Ces récepteurs sont localisés

sur tous les neurones postganglionaires qui sont situés dans les ganglions parasympathiques.

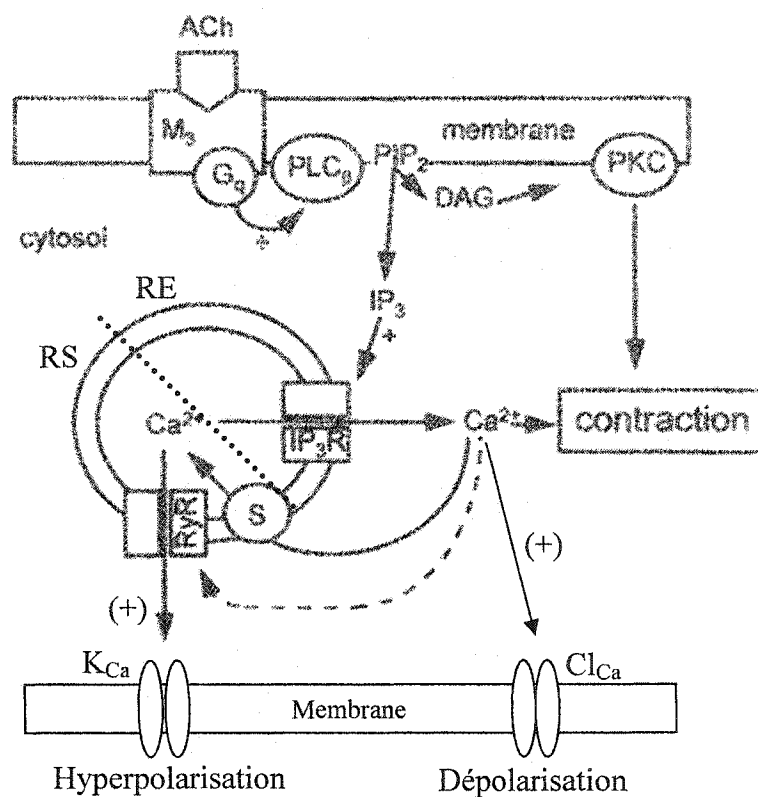
Les récepteurs muscariniques appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G qui une fois activées possèdent une activité inhibitrice ou excitatrice. Ces récepteurs se retrouvent dans le système respiratoire sur toutes les cellules effectrices stimulées par les neurones cholinergiques postganglionaires, c'est-à-dire sur les cellules épithéliales, les glandes séromuqueuses et les muscles lisses (Barnes, 1993). L'activation de ces récepteurs muscariniques par l'ACh conduit à une contraction des MLVR, une sécrétion de mucus et à la relaxation des vaisseaux sanguins.

Les récepteurs muscariniques sont codés par cinq gènes, nommés  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ ,  $m_4$  et  $m_5$ , qui contiennent aucun intron mais possèdent un grand degré d'homologie (Hulme et al., 1990). Les gènes  $m_1$  à  $m_4$  correspondent respectivement aux récepteurs endogènes  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  et  $M_4$ . Aucune protéine endogène produite normalement et qui correspondrait au gène  $m_5$  n'a été répertoriée malgré l'utilisation de son gène dans des lignées cellulaires (Roux et al., 1998). Dans les tissus des voies respiratoires, le récepteur  $M_1$  est principalement localisé le ganglion parasympathique ensuite dans les glandes séromuqueuses et dans la paroi alvéolaire; le récepteur  $M_2$  se retrouve à la jonction neuromusculaire des nerfs postganglioniques et dans les MLVR (Fig. 3); le récepteur  $M_3$  se retrouve dans les MLVR, dans les glandes séromuqueuses, dans les cellules épithéliales et dans les cellules endothéliales; le récepteur  $M_4$  se retrouve surtout chez le lapin dans les

MLVR, dans la paroi alvéolaire et possiblement dans les nerfs postganglioniques (Brann et al., 1993).

Le contrôle biochimique du mécanisme de la contraction est initié par la liaison de l'ACh avec le récepteur  $M_3$ . Cette liaison active une protéine  $G_{q/11}$  qui va à son tour induire l'activation de la phospholipase  $C_\beta$  ( $PLC_\beta$ ). La  $PLC_\beta$  va catalyser l'hydrolyse de la phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate ( $PIP_2$ ), situé dans la membrane sarcolemmale, en inositol 1, 4, 5-triphosphate ( $InsP_3$ ) et en diacylglycérole (DAG). L' $InsP_3$  diffuse dans le cytosol vers l'intérieur de la cellule et va ensuite se lier à son récepteur ( $InsP_3R$ ) situé dans la membrane des réserves de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. La localisation des  $InsP_3R$  dans les MLVR reste toujours un débat qu'en à savoir s'ils se trouvent dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et/ou dans celle du réticulum sarcoplasmique (RS) (Roux et al., 1998; Kotlikoff et Wang, 1998). La liaison de l' $InsP_3$  sur son récepteur canal va faire ouvrir ce dernier et va libérer rapidement une partie du  $Ca^{2+}$  contenu dans les réserves intracellulaires (Fig. 4). Suite à cette augmentation transitoire du  $[Ca^{2+}]_i$  libre, une partie de ce  $Ca^{2+}$  va se lier à la CaM pour induire la cascade d'activation amenant la contraction des MLVR tel que décrit précédemment. L'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  libre a d'autres effets : 1) activer le canal  $Cl^-$ - $Ca^{2+}$  dépendant qui va initier la dépolarisation cellulaire (Janssen, 1996); 2) activer le récepteur sensible à la ryanodine (RyR) qui va relâcher une plus grande quantité de  $Ca^{2+}$  libre contenu dans le RS qui va activer ultérieurement des canaux  $K^+$  activés par le  $Ca^{2+}$  libre sous membranaire ( $K_{Ca}$ ) (Barnes, 1998; McCann et Welsh, 1986) qui est impliqué dans l'hyperpolarisation membranaire

amenant la fermeture des canaux calciques voltages dépendants et ensuite à la relaxation des MLVR.



modifiée d'après Roux et al., 1998

**Figure 4- Schéma d'une cascade d'activation induit par l'ACh induisant une contraction et une variation du potentiel transmembranaire des MLVR.**

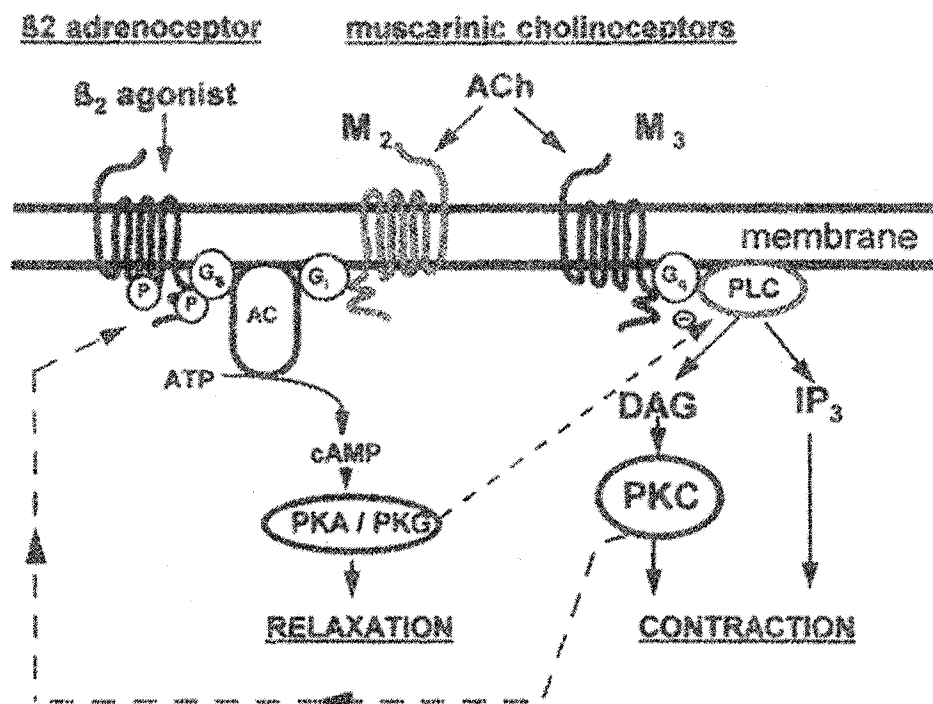
L'ACh induit une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  libre via l'activation des récepteurs intracellulaires  $InsP_3R$  et  $RyR$ . En plus d'induire la contraction des MLVR, l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  libre active le canal  $Cl_{Ca}$  et le canal  $K_{Ca}$  qui sont respectivement impliqués dans la dépolarisation et hyperpolarisation membranaire. Pompe SERCA (S).

Le DAG, le second produit de l'hydrolyse de la  $PIP_2$  par la  $PLC_\beta$ , reste dans la membrane plasmique où il active la protéine kinase C (PKC) qui va aussi participer à la régulation de la tension du MLVR par la phosphorylation de plusieurs protéine contractile (Roux et al., 1998). Par contre la PKC va phosphoryler le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique qui, avec la liaison de son ligand, est impliqué dans la relaxation des MLVR en induisant une augmentation de l'adénosine-3',5'-monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire à partir de l'ATP via l'activation de la protéine  $G_s$  et de l'adénylate cyclase (AC).

Lorsque l'ACh active le récepteur  $M_3$ , il active aussi le récepteur muscarinique  $M_2$  situé dans le sarcolemme des cellules des MLVR (Fig. 5). Le récepteur  $M_2$  active une protéine  $G_i$  qui a pour fonction inhiber l'AC et ainsi de diminuer la formation de l'AMPC à partir de l'ATP intracellulaire. Une augmentation de l'AMPC active la protéine kinase A (PKA) qui active la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP) (Pfitzer, 2001) et active le repompage du  $Ca^{2+}$  par la pompe SERCA des membranes intracellulaires du RE et du RS (Roux et al., 1998). La MLCP enlève le groupement phosphate de la chaîne légère de myosine qui se détache du filament d'actine induisant la relaxation des MLVR.

Des études récentes ont montré une autre voie pharmacomécanique qui induit la contraction des cellules de muscle lisse. C'est la voie des Rho-kinases (Fig.6). Les Rho-kinases sont également impliqués dans diverses réponses cellulaires comme l'activation de la transcription, la motilité, l'adhésion et le cycle cellulaire (Mackay et Hall, 1998).

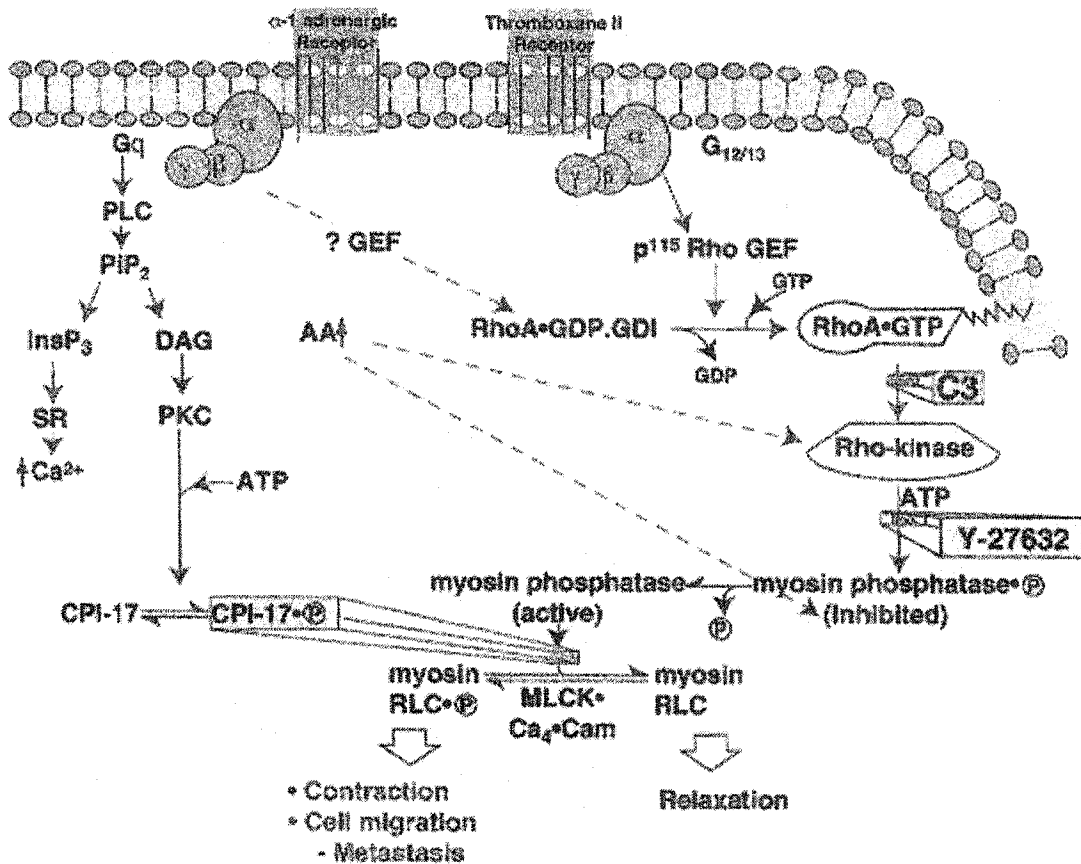
Dans le mécanisme de contraction des muscles lisses, cette voie est  $\text{Ca}^{2+}$ -indépendante car elle ne favorise ni la libération ni l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule.



Roux et al., 1998

Figure 5- Schéma représentant le chevauchement fonctionnel entre les voies muscariniques et  $\beta_2$ -adrénergiques dans le mécanisme de contraction des MLVR.

En plus d'activer le récepteur  $M_3$ , l'ACh active le récepteur  $M_2$  qui active la protéine  $G_i$  qui lui inhibe l'AC et ainsi la relaxation. Cette dernière est favorisée par l'activation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique qui active une protéine  $G_s$  qui lui active l'AC et la relaxation.



Somlyo et Somlyo, 2000

**Figure 6- Mécanisme de contraction des muscles lisses impliquant la voie des Rho-kinases qui est  $Ca^{2+}$ -indépendant.**

La phosphorylation de la myosin «regulatory light chain» (RLC) et ainsi la contraction des muscles lisses sont favorisé par inhibition de la MLCP. Cette inhibition ce produit selon trois voies : l'activation des Rho-kinases, l'augmentation de la concentration de l'acide arachidonique (AA) et le blocage de la MLCP active par le CPI-17 qui est activé par la PKC. Par contre, un blocage de l'activité des Rho-kinases par le C3 et le Y-27632 conduit à une activation de la MLCP qui va ensuite déphosphoryler la myosin RLC et donc relaxer le muscle lisse.

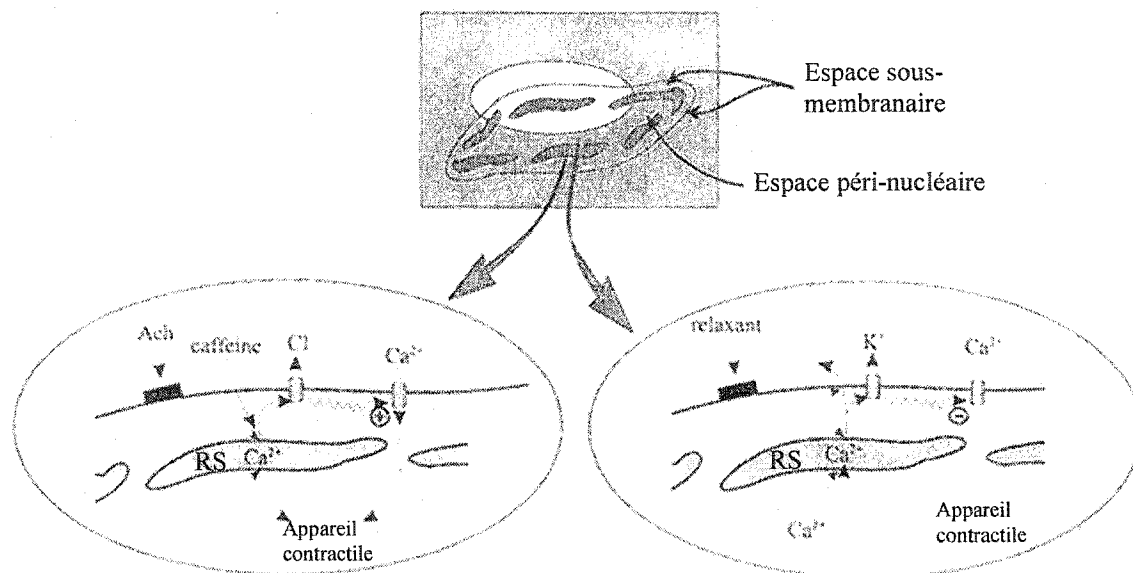


La voie des Rho-kinases débute par l'activation d'un récepteur par le U-46619 (un analogue aux tromboxanes) qui active la protéine  $G_{12,13}$ . Celui-ci active un facteur d'échange nucléotidique, nommé  $p^{115}$ Rho GEF, qui lui active la protéine RhoA-GDP en échangeant la guanosine-5'-diphosphate (GDP) pour de la guanosine-5'-triphosphate (GTP). Devenue RhoA-GTP, cette protéine active la Rho-kinase qui va ajouter un groupement phosphate à partir de l'ATP sur la MLCP. La phosphorylation de la MLCP rend celle-ci inactive en l'empêchant de déphosphoryler les têtes de myosine favorisant la contraction (Somlyo et Somlyo, 2000). Donc le tonus des MLVR est la résultante de la phosphorylation et de la déphosphorylation de la myosin.

### **Modulation électromécanique**

Le couplage électromécanique est initié lorsque la tension mécanique est induite par des changements du potentiel électrique aux bornes de la membrane cellulaire (Farley et Miles, 1977). La dépolarisation transmembranaire est induite par l'activation des courants  $Cl^-$  et des courants cationiques non sélectifs, transportés par le  $Na^+$  et le  $Ca^{2+}$ , tandis qu'il y a une suppression des courants  $K^+$  (Janssen, 1996) qui eux sont principalement impliqués dans la repolarisation ou l'hyperpolarisation membranaire et qui facilitent la relaxation de la cellule. Les études de patch-clamp ont démontrées que les courants calciques dépendants du voltage provenant de l'ouverture des canaux sensibles aux dihydropyridines sont activés pendant la dépolarisation membranaire (Fleischmann et al., 1996; Kotlikoff, 1988). Les paramètres qui régulent l'influx calcique ( $I_{Ca}$ ) vers l'intérieur de la cellule à partir d'un canal sont la  $P_o$  (la portion du temps que le canal passe dans un état ouvert), le courant unitaire ( $i$ ) et le nombre de canaux ( $N$ ) permettant

obtenir l'équation suivante :  $I_{Ca(v)} = P_{O(v)} \cdot i_{(v)} \cdot N$ . Dans les MLVR, le courant calcique dépendant du voltage provient majoritairement du canal calcique de type L (Long-Lasting). Ce canal, qui est sensible aux dihydropyridines, possède un seuil d'activation à partir du potentiel membranaire de  $-40$  mV et une longue période de temps d'inactivation (Janssen, 2002). Il a été démontré que les courants calciques entrant sont suffisants pour induire la contraction de la cellule de muscle lisse suite à l'application d'une concentration d'ion  $K^+$  élevée dans le milieu extracellulaire (Janssen et al., 1997) ou par utilisation de bloqueurs plus ou moins spécifiques des canaux potassiques comme la tétraéthylammonium (TEA), la charybdotoxine (ChTX) et la 4-aminopyridine (Corompt et al., 1998). De plus, une entrée de  $Ca^{2+}$  pourrait contribuer à activer le RyR qui est situé dans la membrane du RS. Le RyR est un canal activable par le  $Ca^{2+}$  qui amplifie la relâche du  $Ca^{2+}$  à partir des réserves intracellulaires. La localisation précise du RS fait l'objet de différents débats mais une étude, réalisée sur le MLVR de chien (Darby et al., 2000), montre qu'il formerait une structure située immédiatement sous le sarcolemme séparant ainsi le cytosol en deux espaces (Fig. 7); cette localisation avait déjà été proposée chez les muscles lisses vasculaires par le groupe de Van Breeman (Lee et al., 2002; Nixon et al., 1994). L'activation des RyR pourrait participer à la libération du  $Ca^{2+}$  contenu dans le RS contribuant ainsi à une augmentation transitoire du  $[Ca^{2+}]_i$  et donc à la contraction de la cellule. L'augmentation du  $Ca^{2+}$  libre à l'intérieur de la cellule active aussi les canaux  $K_{Ca}$  de la membrane plasmique (Amedee et al., 1990). L'activation des canaux  $K_{Ca}$  provoque une hyperpolarisation membranaire. Cette hyperpolarisation induit une désactivation des canaux  $Ca^{2+}$  ce qui tend à diminuer le courant calcique entrant dans la cellule ce qui a pour conséquence de faciliter la relaxation des MLVR.



modifiée d'après Janssen, 2002

**Figure 7- Schéma représentant la localisation sous-membranaire du RS dans les MLVR.**

Le RS constitue un compartiment calcique sous-membranaire dont l'activation (mobilisation du  $Ca^{2+}$  libre) peut moduler les conductances ioniques de la membrane sarcolemmale.

Cependant, les amplitudes des contractions générées par des dépolarisations membranaires représentent une fraction de celles induites par des agonistes physiologiques comme l'ACh, l'histamine, l'endothéline ou pharmacologique comme le chlorure de carbamylcholine (CCh) (Janssen, 2002). Il a été rapporté que l'utilisation des bloqueurs des canaux calciques avait peu d'effet sur des contractions induites par des agonistes muscariniques (Tao et al., 2000). De plus, l'utilisation des bloqueurs des canaux chlorures n'ont aucun effet sur le potentiel de repos et sur les contractions des MLVR induites par des agonistes muscariniques (Janssen et al., 1998). De plus, la plupart des conditions expérimentales montrant un effet inhibiteur des dihydropyridines sur la

réponse mécanique dans les MLVR n'étaient pas des conditions physiologique (les réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  avaient été vidées) ou bien les concentrations utilisées de ces bloqueurs étaient trop élevées (Bourreau et al., 1993; Shen et al., 2000). Même chose avec la nifédipine, qui est un autre bloqueur des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L, d'où l'utilisation de concentration de l'ordre du submicromolaire est suffisant pour bloquer ce canal (Honda et al., 1986). Ces résultats sont compatibles avec le fait que les études cliniques ont prouvé que l'utilisation des bloqueurs des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  est inefficace comme agent thérapeutique pour relaxer et dilater les bronches dans une maladie comme l'asthme (Barnes, 1985; Fish, 1984). De plus dans les MLVR, il y a ni canaux  $\text{Na}^+$  activés par le voltage ni potentiel d'action. Donc s'il y a entrée de cation monovalent ( $\text{Na}^+$ ) ou divalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ), elle doit se faire par d'autres voies.

Les anomalies sur la contraction et la prolifération des muscles lisses sont les principales causes de maladies parce que contrairement au muscle cardiaque, le muscle lisse mature peut se régénérer. Les découvertes récentes sur une multiplicité de mécanismes qui régulent la contraction suggèrent qu'un désordre de ceux-ci, n'impliquant pas nécessairement des canaux  $\text{Ca}^{2+}$ , cause une maladie. Un de ces mécanismes est celui qui implique l'acide arachidonique (AA) et ses métabolites. Par exemple, l'asthme et hypertension artérielle sont des manifestations de contractions involontaires des MLVR et des muscles lisses vasculaires (MLV) causées par un excès d'agonistes excitateurs (comme l'histamine impliqué dans les allergies) ou une intensification de la réponse du muscle lisse à un stimulus « normale » (Somlyo et Somlyo, 1994). De plus, l'inflammation asthmatique implique une grande quantité d'éosinophiles et d'autres

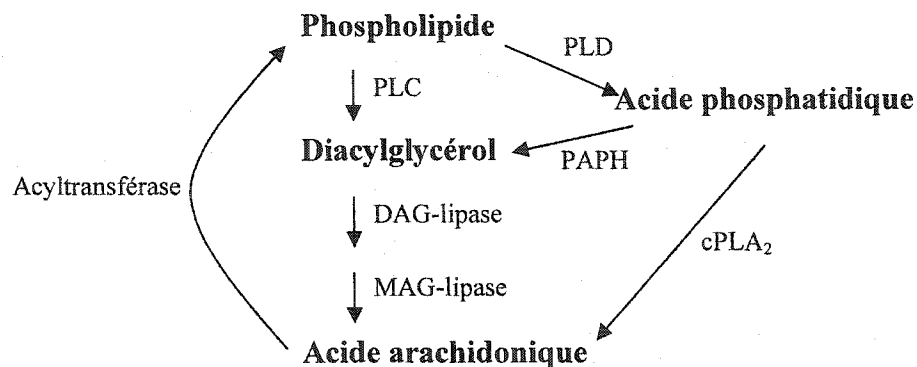
cellules inflammatoires qui envahissent la paroi des voies respiratoires qui va ensuite gonfler et augmenter la sécrétion de mucus pour ainsi obstruer le passage de l'air. Les leucotriènes, qui sont des composés biologiquement actifs produits à partir de l'AA, font partis des agents responsables qui induisent cette inflammation. Il a été rapporté qu'une inhibition de la synthèse des leucotriènes bloque partiellement ou entièrement la réponse constrictrice des MLVR induite par plusieurs agents causant l'asthme (Holgate et al., 1996).

## **L'acide arachidonique et le système respiratoire**

### **Synthèse de l'acide arachidonique**

L'AA est principalement estérifié en position *sn*-2 des phospholipides et fait donc partie intégrante de la structure de la membrane plasmique. C'est également un précurseur de plusieurs molécules bioactives. L'AA, entrant dans la composition de la phosphatidylcholine (PC), est libéré de la membrane de la liaison ester à la position *sn*-2 du phospholipide par une activité spécifique de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) cytosolique qui est dépendante du Ca<sup>2+</sup> et de la phosphorylation (Clark et al., 1991 et Lin et al., 1993 respectivement). Cet acide gras insaturé peut être également hydrolysé des phospholipides membranaires par la PLC<sub>β</sub>, la DAG-lipase et le 2-monoacylglycérol (MAG) lipase (Fig. 8) ou bien par l'entremise de la phospholipase D (PLD), de l'acide phosphatidique phosphohydrolase (PAPH) et de la DAG lipase / 2-MAG lipase (Dennis et al., 1991). La formation intracellulaire de l'AA représente un important second messager qui est directement responsable à la modulation d'enzymes intracellulaires clefs comme la PKC (Khan et al., 1995) et les MAP kinases (Rao et al., 1994). Par ailleurs sa conversion en un

nombre important de métabolites oxydés joue plusieurs rôles fondamentaux complexes dans la biologie cellulaire (Piomelli, 1993).



**Figure 8- Schéma montrant les diverses voies de synthèse de l'acide arachidonique à partir d'un phospholipide membranaire.**

Une fois que l'acide arachidonique est produit selon les trois voies de synthèse, il peut être réincorporé à un phospholipide membranaire par une enzyme acyltransférase.

### **Métabolisme de l'acide arachidonique**

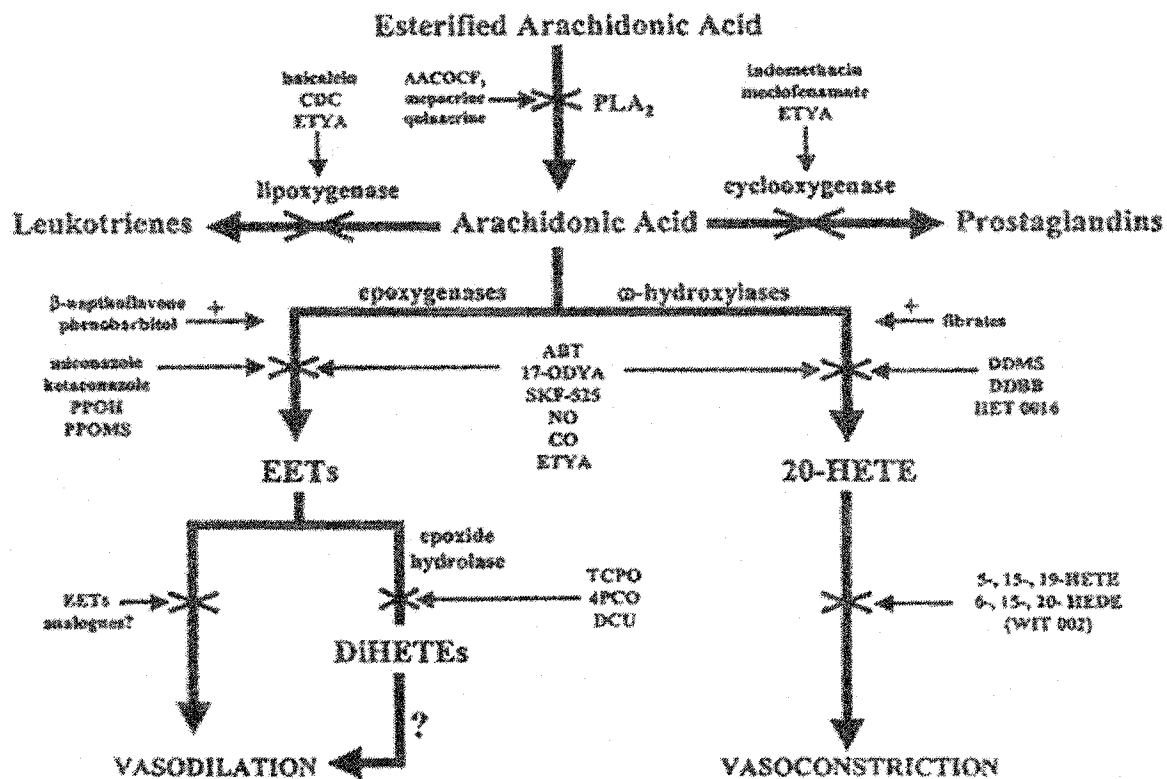
Une fois libéré dans le cytosol, l'AA peut être métabolisé selon trois voies métaboliques : 1) la voie des cyclooxygénases (COX 1 et 2) qui produisent les prostaglandines, les tromboxanes et les prostacyclines, 2) la voie des lipoxygénases qui produisent les leucotriènes, les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) et les acides hydroperoxyeicosatétraénoïques (HpETE) 3) la voie des cytochromes P450 (CYP450) époxygénases et hydroxylases qui produisent respectivement les acides époxyeicosatriénoïques (EET) et les 19- et 20-HETE. La cascade métabolique de l'AA est présentée à la figure 9. Les tromboxanes et certaines prostaglandines (PGF<sub>2α</sub>) sont des bronchoconstricteurs (Hyman et al., 1981) tandis que les prostacyclines et d'autres

prostaglandines (PGE<sub>2</sub>) sont des bronchodilatateurs qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Hardy et al., 1988; Mathe et Hedqvist, 1975). Les produits de la lipoxygénase sont des bronchoconstricteurs qui augmentent la sécrétion de mucus et la perméabilité vasculaire dans l'asthme (Adelroth et al., 1986). Les produits des voies métaboliques des COX et des lipoxygénases sont bien connus comme étant d'important modulateur du tonus bronchique et des réactions inflammatoires des MLVR.

Plusieurs métabolites des CYP450 sont maintenant connus pour jouer un rôle non négligeable dans la régulation fine de la résistance des voies aériennes et du tonus vasculaire dans les poumons et d'autres lits vasculaires comme les coronaires ou le rein (Roman 2002). Plusieurs études ont montrées que des fractions microsomales membranaires qui ont été préparées à partir de poumons de lapin, de rat, de cobaye, de chien et d'humain produisent des EETs et du 20-HETE lorsqu'elles sont incubées avec de l'AA (Yu et al., 2002). Des études quantitatives ayant nécessité des mesures par chromatographie sur colonne.

Les enzymes qui sont responsables de la production des EETs sont des CYP450 époxygénase nommées 1A, 2B, 2C, 2D et 2J qui se retrouvent dans différents tissus (Roman, 2002). Ils sont exprimés dans les cellules épithéliales ciliées et non-ciliées et dans les cellules endothéliales des capillaires des voies aériennes. Il a été démontré que dans le système respiratoire, les EETs induisent *in vitro* la relaxation des trachées et des bronches de cobaye précontractées au CCh (Dumoulin et al., 1998) et à l'histamine, ainsi

que celle des bronches humaines précontractées par l'histamine (Zeldin et al., 1996). Cette relaxation est principalement causé par l'activation des canaux  $K_{Ca}$  (Benoit et al.,



Roman, 2002

Figure 9- Schéma montrant le métabolisme de l'acide arachidonique dans les vaisseaux ainsi que des inhibiteurs pouvant être utilisés.

Ce métabolisme de l'acide arachidonique représenté ici est le même pour les MLVR mais les effets constricteurs du 20-HETE et dilatateurs des EETs peuvent varier selon les tissus et les espèces. Une molécule, le HET-0016, est l'inhibiteur le plus spécifique de la synthèse du 20-HETE connu jusqu'à présent. L'ETYA, acide eicosatétraénoïque, est un inhibiteur non sélectif des lipoxygénases, des cyclooxygénases et des cytochromes P450.



2001) et l'inhibition des canaux  $Cl^-$  (Salvail et al., 1998) induisant une hyperpolarisation membranaire amenant à la relaxation des MLVR. Dans la circulation pulmonaire, les EETs dilatent les MLV de chien précontractés par le U-46619 (Stephenson et al., 1996), un analogue des tromboxanes; ils sont aussi impliqués dans la régulation de la perméabilité vasculaire. Par contre, les quatre régioisomères des EETs contractent *in vitro* les artères pulmonaires de lapin (Zhu et al., 2000a).

## **Pharmacologie du 20-HETE**

### **Synthèse du 20-HETE**

Tel que résumé dans le Tableau 1, le 20-HETE est produit à partir de l'AA par les isoformes des CYP450-4A et/ou 4F selon l'espèce et le tissu dans lequel il est produit (Roman, 2002). Ces enzymes qui sont des  $\omega$ -hydroxylases ajoutent un groupement hydroxyle au dernier carbone ( $C_{20}$ ) de la molécule d'AA. Par ailleurs, il a été rapporté que les acides ribonucléiques messagers (ARNm) codant les transcrits protéiques des CYP450, qui produisent le 20-HETE, sont exprimés dans les reins, le foie, le cerveau et les poumons de rat; dans le foie et les reins de la souris; dans le foie, les poumons et les reins de lapin; dans les reins et le cerveau de chien (Roman, 2002), dans les poumons de cobaye (Yu et al., 2002) et dans le foie, les reins et les poumons de l'humain (Roman, 2002; Birks et al., 1997)

Une fois produit, le 20-HETE, peut être métabolisé par  $\beta$ -oxydation en de petites molécules biologiquement peu actives de 16 et 18 carbones et métabolisé par les COXs en molécules bioactives sur le tonus musculaire (Roman 2002). Alternativement les

molécules de 20-HETE libre peuvent être estérifiées aux phospholipides de la membrane plasmique à la position *sn*-2 pour y être entreposées (McGiff et Quilley, 1999). Ces molécules estérifiées sont ensuite relâchées dans la cellule en réponse à une stimulation d'un récepteur membranaire. La concentration intracellulaire de 20-HETE peut être augmentée à la fois par sa production à partir de l'AA mais également par sa libération de la membrane plasmique, contrairement aux prostaglandines qui elles ne sont pas entreposées mais toujours produites en réponse à un stimulus. L'incorporation des produits des CYP450s (EET et 20-HETE) dans la membrane plasmique a comme conséquences de

Isoform	Species	Product(s)	Tissues	Inducer
4A1	Rat	19-, 20-HETE	K, L, B	Fibrates(+), diabetes, fasting
4A2	Rat	19-, 20-HETE, EETs	K, L, V, B, LG	Fibrates, diabetes, fasting
4A3	Rat	19-, 20-HETE, EETs	K, L, V, B, LG	Fibrates, diabetes, fasting
4A8	Rat	20-HETE?	K, T, B	
4F1	Rat	?	L	
4F4	Rat	?	L, K, B	
4F5	Rat	?	L, K, B	
4F6	Rat	?	L, K, B	
4A11	Human	19-, 20-HETE	L, K	
4F2	Human	20-HETE	L, K	
4F3	Human	Hydroxy-LTB <sub>4</sub>	PMNs	
4F11	Human		L, K	
4A10	Mouse	19-, 20-HETE	L, K	Fibrates(+)
4A12	Mouse	19-, 20-HETE	L, K	Fibrates (female only)
4A14	Mouse	12-Hydroxy-laurate	L, K	Fibrates(+)
4F14	Mouse	Leukotrienes	L, K	
4F15	Mouse	?	L, B, K	Fibrates, LPS
4F16	Mouse	?	L, B, K	LPS
4B1	Mouse	Hydroxy fatty acids		
2J9	Mouse	19-HETE	B	
4A4	Rabbit	20-HETE, PGE-OH	LG, L, K	Pregnancy, steroids
4A5	Rabbit	12-Hydroxy-laurate	L	
4A6	Rabbit	20-HETE	L, K	Fibrates(+)
4A7	Rabbit	20-HETE	L	Fibrates
2E1	Human			
	Rat	19-HETE	L, K	Ethanol
	Rabbit			

K, kidney; L, liver; V, vasculature; B, brain; LG, lung; P, pancreas; GI, gastrointestinal tract; S, skin; PMN, polymorphonuclear leukocytes; HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; EET, epoxyeicosatrienoic acid; LPS, lipopolysaccharide; LT, leukotriene.

Roman, 2002

**Tableau 1- Localisation des isoformes des CYP450  $\omega$ -hydroxylase et leur produit selon l'espèce et le tissu.**

modifier la perméabilité membranaire et l'activité des enzymes liés à cette membrane (McGiff et Quilley, 1999). L'efficacité des inhibiteurs des CYP450s peut être mal interprétée parce qu'ils peuvent empêcher la production du 20-HETE à partir de l'AA mais il n'empêchera pas la libération de ce métabolite des phospholipides membranaires. Par exemple, dans un rein de lapin isolé et perfusé en présence de  $1\mu\text{M}$  de l'acide 17-octadécanoïque (17-ODYA), un inhibiteur non sélectif des CYP450s qui empêche la production basal de 20-HETE, l'angiotensine II, via la  $\text{PLA}_2$ , libère le 20-HETE entreposé dans les phospholipides à partir d'un seuil non détectable jusqu'à  $0.93\text{ ng/min}$  dans l'urine et à partir de  $0.06$  jusqu'à  $0.24\text{ ng/min}$  dans les veines rénales (Carrol et al., 1997).

La quantité de 20-HETE, des autres HETEs et des EETs liés aux lipides membranaires représente un réservoir significatif dans les tissus où ils ont été quantifiés. Dans un rein de lapin, la quantité d'HETEs (16-, 17-, 18-, 19- et 20-HETE) estérifiés est de  $34.40\text{ ng/g}$  de tissus dans le cortex et de  $22.76\text{ ng/g}$  de tissus dans la médulla (Carrol et al., 1997). Dans une culture de plaquette humaine, la quantité de 20-HETE libéré par la  $\text{PLA}_2$  est de  $9.7\text{ fmol}/10^6$  cellules. Cette quantité représente environ de 2000 fois moins que celle des EETs qui est de  $4.3\text{ pmol}/10^6$  cellules (Zhu et al., 1995).

### **Effet du 20-HETE sur les MLV non-pulmonaires**

Le 20-HETE a pour effet de contracter les artérioles rénales (Ma et al., 1993), cérébrales (Gebremedhin et al., 2000), mésentériques (Wang et al., 2001) et celles des muscles squelettiques (Kunert et al., 2001). La contraction de ces artères amène une élévation de la pression transmurale et une autorégulation du débit sanguin dans les artères rénales et cérébraux chez le rat *in vivo* (Roman, 2002). Les concentrations de 20-

HETE utilisées dans ces expériences étaient relativement élevées (1-10  $\mu\text{M}$ ) parce que la concentration endogène de 20-HETE dans les petits vaisseaux est d'environ de 100 nM (Roman, 2002). Si la production endogène de 20-HETE est inhibée, il faudra moins de 20-HETE pour obtenir le même effet. De plus chez le rat, le 20-HETE contracte peu ou pas du tout les grosses artères comme l'aorte (Muthalif et al., 1998 et 2000). Cette absence d'effet sur le tonus vasculaire est surprenante car il induit un effet mitogénique semblable sur des cellules isolées des MLV d'aorte et de petits vaisseaux de rat. Ceci pourrait s'expliquer par une différence dans l'expression des types de canaux  $\text{K}^+$  ou dans la cascade de signalisation intracellulaire entre les gros et les petits vaisseaux (Roman, 2002).

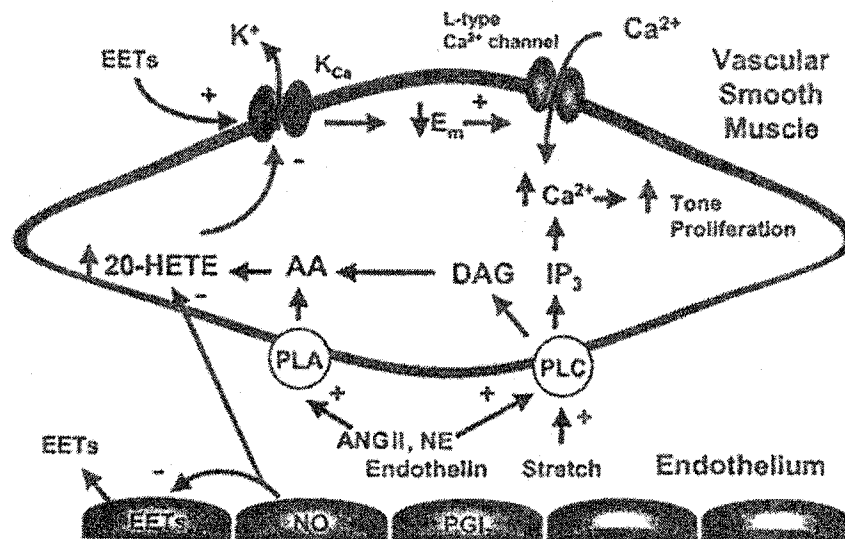
En plus de contracter le muscle lisse vasculaire, il a été rapporté que 1  $\mu\text{M}$  de 20-HETE dépolarise de 10 mV le potentiel transmembranaire des artères rénales de chien associé avec une augmentation de la concentration du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Ma et al., 1993). L'activité vasoconstrictrice du 20-HETE implique un blocage des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$ . Cet effet peut être mimé par l'addition de la TEA ou de l'ibérototoxine (IbTX) alors que le 20-HETE n'a aucun effet sur le tonus vasculaire après administration des bloqueurs des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  (Imig et al., 1996). Des expériences de patch clamp en configuration « Cell-attached » ont démontré que l'addition de 20-HETE exogène inhibe l'activité des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  tandis qu'ils ne le sont pas lorsque la membrane est excisée de la cellule d'artère cérébrale (Lange et al., 1997). Ceci montre bien que le 20-HETE inhibe les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  à travers une cascade d'activation intracellulaire qui est encore à déterminer.

Il a été rapporté que le 20-HETE active la PKC dans les MLV des artères cérébrales de chat (Lange et al., 1997), des tubules proximaux de rat (Nowicki et al., 1997) et des artères interlobulaires rénales de rat (Sun et al., 1999). L'effet inhibiteur du 20-HETE sur les canaux  $K_{Ca}$  qui est concomitant de la contraction des artères cérébrales de chat n'est pas observé en présence d'inhibiteurs de la PKC (Lange et al., 1997). Par contre dans les artères rénales de rat, les inhibiteurs de la PKC n'empêche pas l'effet bloquant du 20-HETE sur les canaux  $K_{Ca}$  (Sun et al., 1999). De plus, dans ces tissus, il a été rapporté que le 20-HETE active la cascade de signalisation des « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) et cette activation contribue au blocage des canaux  $K_{Ca}$  et à la contraction des MLV (Sun et al., 1999). Ce blocage des canaux  $K_{Ca}$  par le 20-HETE est inhibé par l'inhibition de la tyrosine kinase et non par inhibition de la MEK kinase (Sun et al., 1999). Par contre, ces observations n'expliquent pas complètement par quelle cascade de signalisation intracellulaire le 20-HETE peut bloquer le canal  $K_{Ca}$ . De plus, cet effet inotrope positif du 20-HETE pourrait aussi impliquer une modulation des canaux calciques membranaires.

L'implication du 20-HETE endogène dans la régulation du tonus myogénique des MLV non-pulmonaires a été proposé comme suit : l'étirement du vaisseau sanguin par l'augmentation de la pression sanguine, l'interaction avec plusieurs hormones vasoactives avec leur récepteur activent la  $PLC_{\beta}$  qui augmente la synthèse de l' $InsP_3$  et stimule la relâche du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Cette augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  active la  $PLA_2$   $Ca^{2+}$ -dépendant et la DAG-lipase pour libérer l'AA qui est convertie en 20-HETE par les CYP450 qui lui peut inhiber le canal  $K_{Ca}$  par une cascade intracellulaire (Fig. 10). Cette

cascade intracellulaire, activé par le 20-HETE, passe par la PKC et la tyrosine kinase. Cette activation est dépendante de l'espèce et/ou du tissu étudié. Le blocage des canaux  $K_{Ca}$  empêche l'hyperpolarisation et tend à maintenir la cellule dépolarisée. Ceci va favoriser l'entrée du  $Ca^{2+}$  à l'intérieur de la cellule et donc contribuer à maintenir le tonus myogénique (Roman, 2002).

La production du 20-HETE est grandement dépendante de l' $O_2$  dans les artérioles rénales et cérébrales, les microsomes rénaux, le glomérule isolé et dans les artères pulmonaires (Harder et al., 1996; Zhu et al., 2000b). De plus, le NO qui est libéré de



Roman, 2002

**Figure 10- Mécanisme de contraction des MLV intégrant les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le mode d'action du 20-HETE.**

Le 20-HETE, produit de l'acide arachidonique, inhibe indirectement les canaux  $K_{Ca}$  par l'entremise de la PKC et des MAPKs prolongeant ainsi la contraction. De plus le NO qui est produit dans l'endothélium diminue la concentration du 20-HETE favorisant l'ouverture du canal  $K_{Ca}$  et ainsi la relaxation.

l'endothélium entre dans le muscle lisse et le CO, produit par l'enzyme heme-oxygénase, diminue la production endogène du 20-HETE. Cette diminution favorise la vasodilatation des petits vaisseaux sanguins (Roman 2002).

Aucune équipe n'a encore identifié de récepteur au 20-HETE ou bien démontré que sa production modifie celle des seconds messagers comme le DAG, l'InsP<sub>3</sub>, l'AMPc ou la guanosine-3',5'-monophosphate cyclique (Roman, 2002). Des inhibiteurs de production du 20-HETE endogène ont été identifiés : le N-méthylsulfonyl-12,12-dibromododéc-11-énamide (DDMS), le 17-ODYA qui sont des inhibiteurs non-spécifiques des CYP450s et le HET0016 qui est un inhibiteur spécifique au CYP450  $\omega$ -hydroxylase.

#### **Effet du 20-HETE sur les MLV pulmonaires**

Jusqu'à présent, la majorité des effets du 20-HETE dans la circulation sanguine pulmonaire sont à l'opposée de ceux observés dans les lits vasculaires périphériques. Le 20-HETE dilate les artères pulmonaires de lapin, de bovin et de l'humain précontractées avec le U-46619 ou de la norépinéphrine (Zhu et al., 2000b; Yu et al., 2002; Birks et al., 1997 respectivement). Chez le lapin, la conversion de l'AA en 20-HETE est bloquée par le DDMS et le 17-ODYA. La diminution de la production de 20-HETE induit la contraction des artères pulmonaires. Cette réponse au 20-HETE est dépendante d'un endothélium intacte et de la COX. Ceci suggère que le 20-HETE est métabolisé par la COX en une molécule vasodilatatrice ou bien il stimule la relâche d'un métabolite vasodilatateur de la COX provenant de l'endothélium (Zhu et al., 2000b; Birks et al.,

1997). Chez le bovin, l'effet vasoconstricteur du 20-HETE est bloqué par le L-NAME, un inhibiteur de la NO-synthase, ou par la destruction de l'endothélium. Le 20-HETE augmente le  $[Ca^{2+}]_i$  et la production du NO dans l'endothélium (Yu et al., 2002). De plus, l'auteur de cet article mentionne que l'effet relaxant du 20-HETE sur l'artère pulmonaire bovine, suivant une précontraction avec le U-46619, est toujours présent mais faible en présence d'indométhacine que lorsque l'activité des COX est intacte. Cependant, un seul article montre que cet eicosanoïde contracte les artères pulmonaires de rat. Le 20-HETE les contracte à partir du tonus de base et il n'induit aucune activité vasodilatatrice même suite à une précontraction avec la phényléphrine (Yaghi et al., 2001). Ces effets du 20-HETE sur les artères pulmonaires varient selon les espèces.

#### **Effet du 20-HETE sur les MLVR**

L'effet du 20-HETE sur les MLVR varie en fonction de l'espèce. Il induit une relaxation des bronches de lapin précontracté à l'histamine ou le KCl (Jacobs et al., 1999) et les bronches humaines précontractées avec l'histamine (Zhu et al., 2000b). L'effet relaxant du 20-HETE est bloqué par l'indométhacine ou suite à la destruction fonctionnelle de l'épithélium. Ces études proposent que le 20-HETE serait métabolisé par les COX en un bronchodilatateur ou qu'il stimule la libération d'un métabolite des COX à partir de l'AA situé dans l'épithélium (Roman 2002). Par contre, il a été rapporté que le 20-HETE contracte les bronches de cobaye (Zeldin et al., 1995). Tous ces résultats suggèrent que les effets du 20-HETE sur le tonus des MLVR varient en fonction de l'espèce et reflètent probablement une différence dans le type de métabolite produit par les COX.



## Contexte et objectifs spécifiques de l'étude

L'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE) est un métabolite de l'acide arachidonique produit par l'entremise des cytochromes P450. Le 20-HETE est impliqué dans la modulation du tonus des muscles lisses vasculaires (MLV) et des voies respiratoires (MLVR) (Roman, 2002). Les réponses des muscles lisses au 20-HETE semblent être différentes selon l'espèce voir même le type de tissu où il est généré ou sur lequel il est appliqué. Dans les MLV, il a été rapporté que le 20-HETE induit la contraction principalement en bloquant le canal  $K_{Ca}$  par l'intermédiaire de la PKC et/ou des MAPKs (Lange et al., 1997; Sun et al., 1999). Les effets inotropes du 20-HETE ont surtout été étudiés au niveau des muscles lisses vasculaires des artères coronaires, des microvaisseaux du rein et des muscles squelettiques. Par contre, dans les MLVR, il a été rapporté que le 20-HETE induit une relaxation des muscles lisses des bronches humaines (Zhu et al., 2000b) et de lapin (Jacobs et al., 1999) mais une contraction sur ceux de cobaye (Zeldin et al., 1995). La relaxation induite par le 20-HETE sur les MLVR de lapin est dépendante de l'épithélium et d'une activité intacte des COX (Jacobs et al., 1999). Cette antithèse apparente de la réponse inotropique des MLVR pourrait être due aux profils différentiels des enzymes qui produisent ou métabolisent le 20-HETE. De plus, aucune étude plus approfondie sur les MLVR n'a été réalisée sur une possible modulation des canaux ioniques membranaires et sur l'effet inotrope positif induit par le 20-HETE. Son mode d'action sur ce tissu reste donc à être élucidé. Notre hypothèse de travail consistera à vérifier si les modulations de la tension mécanique des MLVR, induites par le 20-HETE, sont dues à des changements des propriétés électrophysiologiques.

Le but de cette étude est donc d'établir le mode d'action du 20-HETE sur les MLVR de cobaye en utilisant des mesures électrophysiologiques complémentaires ce qui nous ont conduit à définir les objectifs spécifiques suivants :

- 1- Étudier et quantifier les effets du 20-HETE sur le tonus et sur des cellules isolées des MLVR de mammifères par l'entremise de différents inhibiteurs en utilisant les techniques de mesure de tension isométrique et d'imagerie cellulaire.
- 2- Évaluer les effets du 20-HETE sur le potentiel membranaire des cellules de MLVR avec l'aide de la technique de la microélectrode.
- 3- Vérifier si le 20-HETE modifie directement les propriétés électrophysiologiques des canaux connus en utilisant les techniques de reconstitution membranaire des BPL et à l'aide de mesures réalisées en patch-clamp.

## **Matériels et Méthodes**

### **Mesures de tension isométrique**

#### **Préparation des fragments de bronche et de trachée de cobaye**

Les cobayes de Hartley albinos (250-300 g), mâle ou femelle, ont été anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (75 mg/kg) injecté intrapéritonéalement et puis exsanguinés par section de l'aorte dorsale. La trachée et le système cœur-poumon ont été prélevés et nettoyés dans la solution de Krebs préalablement barboter au carbogène (O<sub>2</sub> 95% et CO<sub>2</sub> 5%) à la température de la pièce. La solution de Krebs est composée de (en mM) : 118.1 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub> et 11.1 glucose et le pH est à 7.4 suite au barbotage avec le carbogène. Les bronches externes et la trachée sont prélevés et coupés en spirales (Cadieux et al., 1990). Les tissus sont ensuite placés dans les bains à organe isolé dans la solution de Krebs barbotée et préchauffée à 37 °C. Les tissus sont soumis à une tension initiale de base de 1 g visualisée à l'aide d'un transducteur de force de Grass modèle FT.03E (Astro-Med Inc.). Avant chaque protocole expérimental impliquant l'ajout d'agents pharmacologiques, les tissus sont stabilisés dans les bains pendant 1 heure, avec 4 lavages au 15 min tous en solution Krebs normal (Savaria et al., 1992).

#### **Mesures des tensions musculaires isométriques**

Une extrémité des tissus est attachée à un support fixe tandis que l'autre au transducteur de force de Grass modèle FT.03-E (Astro-Med Inc.). Ce modèle a été développé pour mesurer les changements de tension musculaire isométrique (le muscle

reste à une longueur constante) suite à l'addition de divers agents pharmacologiques. Les variations de tension sont transformées en variation de voltage par le transducteur et ces signaux sont ensuite amplifiés par un amplificateur de Grass DC modèle 7P1J (Astro-Med Inc.) puis tracés sur papier par un polygraphe de Grass modèle 7E (Astro-Med Inc). Les éléments du montage expérimental sont représentés sur la figure 11. Ces variations de tensions musculaires sont alors converties en gramme (g) (Cadieux et al., 1990). Toute les premières expériences réalisées sur les bronches et les trachées consistent à induire une contraction « test » par une addition de 0.1  $\mu\text{M}$  de CCh pour s'assurer de la bonne réactivité des tissus. Lorsque l'amplitude de contraction est devenue stable (en prenant la forme d'un plateau), les tissus sont lavés 4 fois pour éliminer le CCh. Après stabilisation des tissus au tonus de base (1 g), le 20-HETE est injecté dans les bains et la tension mécanique développée est enregistré en continue. Les tissus sont ensuite lavés ou sont ajoutées de divers substances pharmacologiques pour visualiser leur effet sur la contraction induite par le 20-HETE. Les amplitudes de contractions induites par le 20-HETE sont calculées en pourcentage (%) par rapport à celle qu'induit 0.1  $\mu\text{M}$  CCh à partir du même tissu (valeurs pairées) avec l'aide de l'équation 1. L'amplitude de contraction induite par 0.1  $\mu\text{M}$  CCh a été choisi comme valeur de référence parce qu'il correspond à 30% de la tension maximale que peut induire le CCh sur les MLVR de cobaye (Benchekroun et al., 1992).

Éq.1 :

$$\% T_m = \frac{T \Delta[20-HETE] \times 100}{T [0.1 \mu\text{M} CCh]}$$

où  $T_m$  est la tension mécanique normalisée,  $T \Delta[20-HETE]$  est la tension mécanique induite par différentes concentrations de 20-HETE et  $T [0.1 \mu\text{M} CCh]$  est la tension mécanique induite par 0.1  $\mu\text{M}$  CCh.

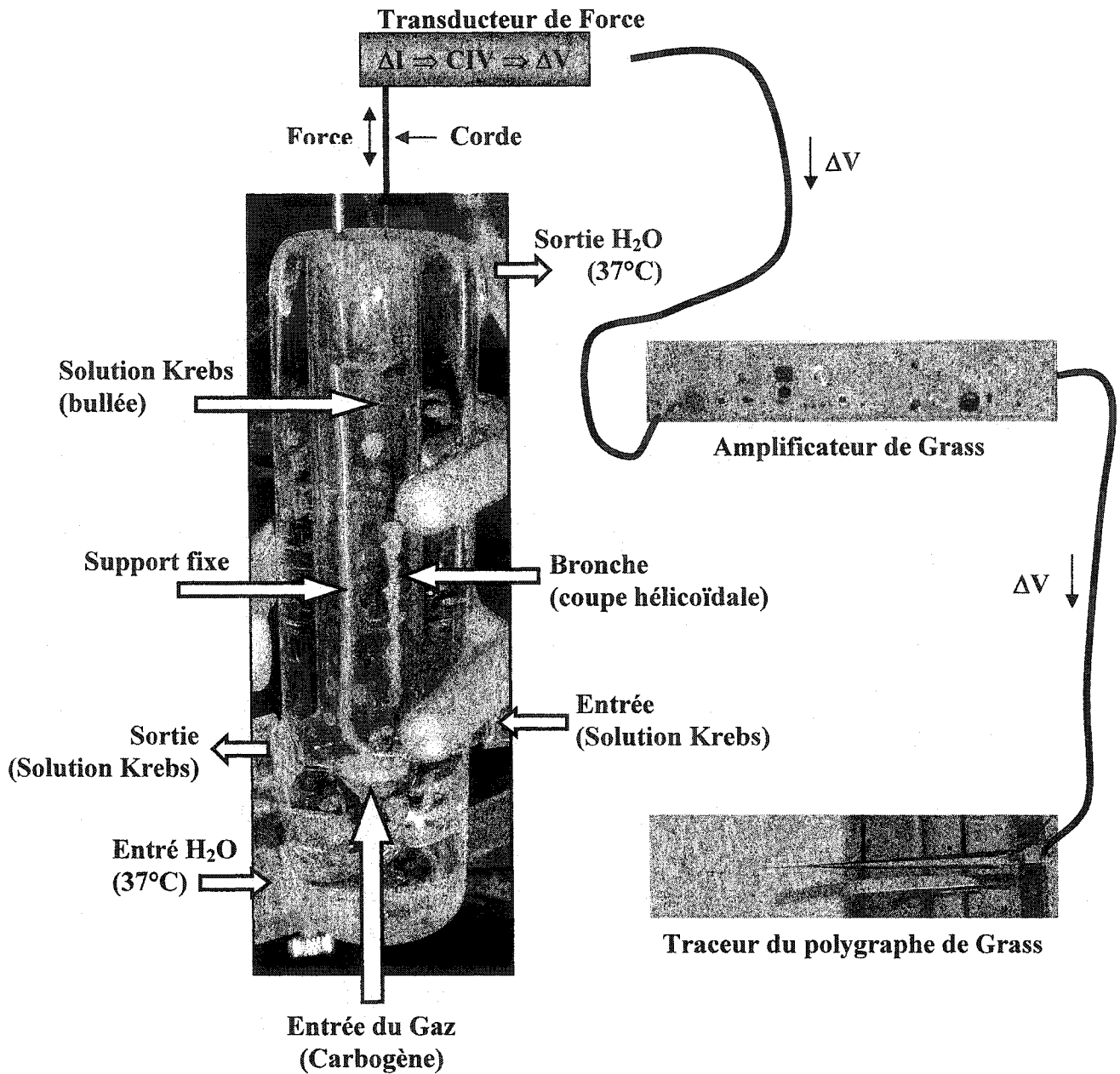


Figure 11- Photos de la cuve d'organe isolé et représentation du montage expérimental utilisé pour les mesures de tension isométrique.

Le courant ( $\Delta I$ ), qui est généré à partir des variations de tension musculaire lisse de la trachée ou de la bronche, est reçu par le transducteur de force et convertie en voltage ( $\Delta V$ ) par le convertisseur (CIV) courant-voltage. Le  $\Delta V$  est ensuite amplifié par un

amplificateur de Grass et finalement convertie en amplitude de contraction (en cm) par le traceur du polygraphe de Grass.

### **Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en terme de valeurs moyennes  $\pm$  la SEM. La courbe dose-réponse, représentée dans les résultats, a été obtenue à partir de l'équation suivante :

Éq. 2 : 
$$C = C_{max}(X^{nH}) / (EC_{50}^{nH} + X^{nH})$$

où C et  $C_{max}$  sont les amplitudes de contraction, X est la concentration de 20-HETE utilisée,  $EC_{50}$  est la concentration de 20-HETE pour laquelle on obtient 50% de l'effet maximal et nH est le coefficient de Hill. La variance statistique est évaluée à l'aide du test t de Student pairé ou non-pairé, selon les cas, en utilisant le logiciel de SigmaPlot 8.0 (SPSS Science). Une valeur de  $P < 0.05$  est considérée comme significative.

## **Technique de microélectrodes**

### **Préparation des trachées de lapin et de chien**

Des lapins albinos (1.5 et 2.5 kg) ou des chiens bâtards mâle ou femelle ont été anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (35 mg/kg). La trachée est prélevée rapidement et placée dans une solution de Tyrode barbotée avec du carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>) à température de la pièce (environ 20°C). La solution de Tyrode contient (en mM) : 136 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.35 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12.5 NaHCO<sub>3</sub> et 11 glucose à un pH de 7.4 suite au barbotage de la solution au carbogène. La trachée a été préparée et coupée tel que décrit par Benoît et al. (2001). Lorsque l'expérience l'exigeait,

les cellules épithéliales ont été enlevées à l'aide d'un applicateur de coton en le roulant légèrement dans le sens de la longueur sur la surface luminale de la trachée. Les fragments de trachée (5 x 12 mm) sont ensuite placés dans la chambre de perfusion d'une capacité de 3 ml d'un système de trois compartiments (Fig. 12) dont la température (37°C) et le niveau de solution sont très rigoureusement contrôlés tel que décrit par Salvail et al. (1998). Ce montage, qui a été dessiné et réalisé par l'équipe du laboratoire du Dr Éric Rousseau (Le Bilarium), possède un système de perfusion à six voies avec un robinet permettant le choix de la solution et des concentrations d'agents pharmacologiques. Le débit est contrôlé à 2 ml/min avec la solution de Tyrode standard. La trachée, avec la couche de muscle lisse placée vers le haut, est soumise à une période de stabilisation de 20 min en Tyrode et d'une seconde de même durée, en présence de 5  $\mu$ M de wortmannin ajouté au Tyrode, de façon à prévenir les contractions de muscle lisse spontanées lors des empacements. Les perfusions subséquentes sont effectuées avec de la solution de Tyrode seul ou additionnée d'agents pharmacologiques sans wortmannin. Les tissus utilisés plus tard dans la journée sont conservés sur glace dans la solution de Tyrode, barbotée au carbogène. Récemment nous avons aussi réalisé des expériences de microélectrode sur des trachées de cobaye. L'animal a été sacrifié et la trachée préparé selon le même protocole décrit plus haut. Par contre, la solution physiologique utilisée est la solution de Krebs (voir composition p. 43).

### **Mesure des potentiels transmembranaires**

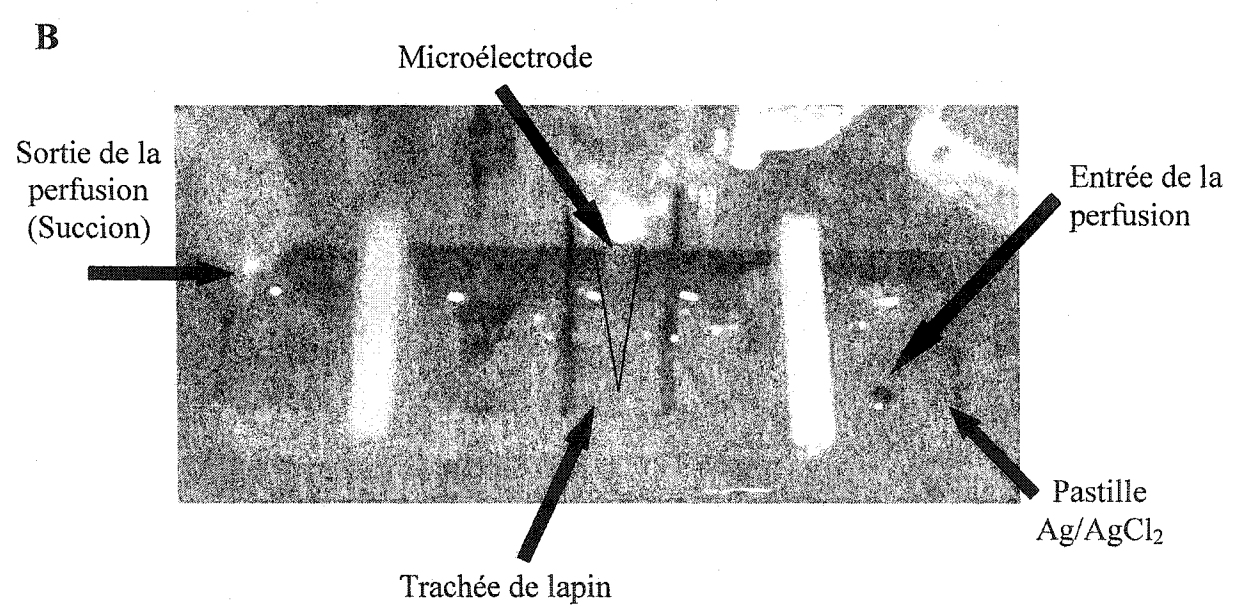
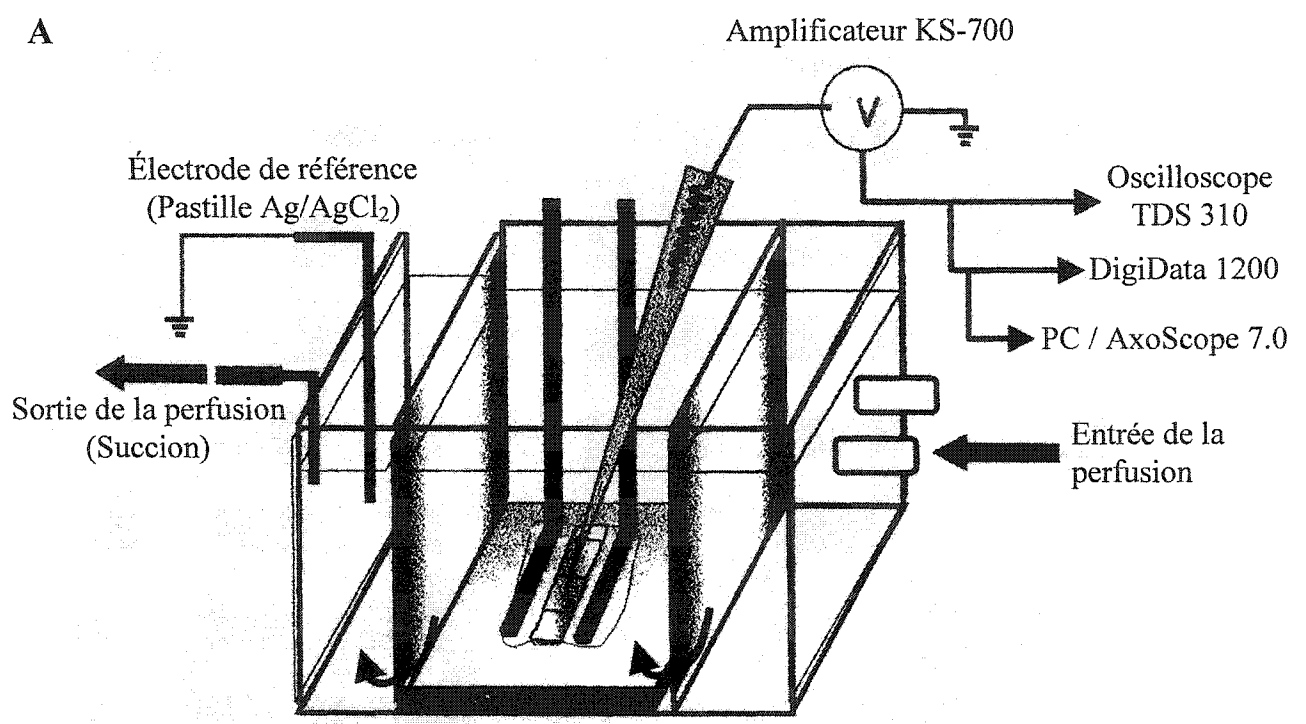
Les potentiels transmembranaires sont mesurés suite à l'empacement des cellules du muscle lisse des voies respiratoires (à partir de la face luminale) à l'aide d'une microélectrode de verre intracellulaire et conventionnelle en borosilicate (modèle

1B150F-3; World Precision Instruments). Les microélectrodes sont remplies d'une solution de 3 M de KCl. Leur résistance électrique se situe entre 30 et 50 M $\Omega$ . La microélectrode est reliée via une pastille d'Ag/AgCl<sub>2</sub> à un amplificateur qui est monté sur un micromanipulateur modèle No13004 (Narishige). Une autre pastille d'Ag/AgCl<sub>2</sub> est placée dans le premier compartiment de la chambre expérimentale et sert d'électrode de référence connectée à la terre (Fig. 12). Les potentiels membranaires sont mesurés à l'aide d'un amplificateur modèle KS-700 (World Precision Instruments) et ensuite constamment surveillés avec l'aide d'un oscilloscope modèle TDS 310 (Tektronix). Les données sont enregistrées à la fois dans un DAT (Digital Audio Tape) modèle DAS-75 (Dagan Corp.) et sur le disque dur à l'aide d'une interface DigiData modèle 1200 et du programme Axoscope 7.0 (Axon Instruments Inc.). Les enregistrements sont digitalisés sur le DAT et/ou sur le disque dur (0.05 kHz) serviront aux analyses subséquentes.

### **Analyse des résultats et statistiques**

Les résultats ont été exprimés en terme de valeurs moyennes  $\pm$  SEM. Pour l'analyse statistique, le test t de Student a été utilisé de façon pairé ou non-pairé selon les conditions expérimentales. Une valeur de  $P < 0.05$  est considérée comme significative. N est le nombre d'empalements. Les histogrammes et les courbes ont été réalisés à l'aide du programme SigmaPlot 8.0 (SPSS Science).





**Figure 12- Schéma (A) et photo (B) de la chambre expérimentale utilisée pour la technique de microélectrode.**

La trachée est fixée au fond de la chambre expérimentale et perfusé par une solution physiologique chauffé à 37°C. Le potentiel transmembranaire, mesuré à partir d'une microélectrode en borosilicate empalé dans le muscle lisse, est amplifié par un amplificateur KS-700, visualisé sur un oscilloscope TDS 300 et enregistré par le DigiData 1200. Le signal brute, provenant directement de la microélectrode ou de l'enregistrement sur DigiDate, est ensuite filtré, digitalisé et enregistré par un ordinateur PC comprenant le programme AxoScope 7.0 pour fin d'analyse ultérieure.

## **Culture des cellules primaires de muscles lisses des voies respiratoires**

### **Prélèvement et culture des cellules du MLVR (en condition stérile sous la hotte)**

Les trachées, prélevées sur des cobayes, ont été lavées et nettoyées des tissus adjacents dans une boîte de Pétri, contenant de la solution de Krebs à 4°C (sur glace). Ensuite, elles sont coupées longitudinalement du côté opposé au muscle lisse. La trachée, en position ouverte, est fixée par des épingles à dissections sur un papier Whatman stérile qui est placé sur un gel de silicone (Sylgard 184; Dow Corning Corp.) coulé dans une boîte de Pétri, déposé sur la glace. L'épithélium est enlevé mécaniquement avec l'aide d'un coton-tige stérile, pour celle de cobaye et de rat, en effectuant des mouvements de rotation perpendiculairement à l'axe de la trachée. Le muscle lisse est ensuite disséqué, déposé dans une solution de « Minimum essential media » (MEM) contenant 1.6 mM d'EGTA pour diminuer la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire libre à 200  $\mu\text{M}$ . Le tissu émincé avec des ciseaux fins et centrifugé à 80 g pendant 1 min. Le surnageant est enlevé et le culot (MLVR) est resuspendu dans la solution MEM (200  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  libre) contenant des enzymes de digestion : 640 U/ml de collagenase type 4, 3 U/ml d'élastase type 4 et 20  $\mu\text{g/ml}$  ADNase type 1 (tous provenant de Sigma-Aldrich). Les tissus sont digérés pendant 1 heure dans l'incubateur à cellule, entrecoupée de trois périodes d'agitation au 20 min. La suspension cellulaire est ensuite filtrée avec l'aide d'un tamis cellulaire de Nylon de 100  $\mu\text{m}$ . Le filtrat est ensuite lavé avec du MEM (900  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ), centrifugé à 80 g pendant 10 min et ensuite le culot (cellules MLVR) est resuspendu dans 1 ml d'Opti-MEM additionné de 2 % de sérum de veau fœtal (FBS) et de 1 % d'antibiotique (Pénicilline – Streptomycine). Les cellules sont incubées dans une ou deux boîtes de Pétri, modèle BD

Falcon (BD Biosciences) de 35 x 10 mm, pendant 10 min. Les cellules des MLVR non adhérentes sont replacées en suspension avant d'êtreensemencées à raison de  $10^3$  cellules par boîte de Pétri et incubées pendant 30 min pour les laisser se fixer et ensuite le volume est complété à 2 ml avec de l'Opti-MEM. Les milieux de cultures sont changés 24 heures après la mise en culture et ensuite tous les trois jours. Les cellules peuvent supporter jusqu'à sept passages lorsqu'elles sont à confluences. Tous les milieux de culture, FBS et antibiotique proviennent de Gibco Invitrogen Corp. et des contrôles de stérilité sont effectués systématiquement en parallèle à chaque culture.

## **Technique d'imagerie cellulaire**

### **Description de la technique et du montage expérimental**

Cette technique consiste à visualiser les cellules isolées des muscles lisses des voies respiratoires de cobaye (ou d'un autre animal) et à analyser leur aptitude à se raccourcir (contracter) ou à se rallonger (relaxer) suite à l'application de divers agents pharmacologiques. Une boîte de Pétri, contenant une culture primaire de cellules de MLVR (voir plus haut la mise en culture), est placée sur une plaque chauffante maintenue à 37°C à l'aide d'un contrôleur de température modèle WPI-14471 (World Precision Instruments) sur un microscope inversé. Les cellules sont d'abord visualisées en contraste de phase dans la lumière visible avec l'aide du microscope inversé modèle Eclipse TE300 (Nikon) avec lequel il est également possible de mesurer la fluorescence émise par différentes sondes. Parallèlement les cellules sont visualisées sur l'écran d'un ordinateur avec l'aide du logiciel MetaMorph 4.5 (Universal Imaging Corp.) par l'intermédiaire d'une caméra digitale monochromatique modèle Photometrics CoolSnap fx (Roper

Scientific) qui est couplée au trajet optique du microscope. Le logiciel de contrôle de l'acquisition permet également d'ajuster le focus de l'image des cellules avec l'aide d'une manette de type « joystick » reliée au microscope par l'intermédiaire d'un contrôleur d'instrumentation modèle W/Mbus P (Cell Robotics International Inc.).

### **Protocole expérimental et pharmacologie**

Les cellules utilisées sont lavées avec 1 ml de solution de Krebs, de même composition que décrit plus haut, additionnée de 5 mM d'HEPES, chauffé à 37°C, filtré (stérile) et ajustée à pH 7.4. Le milieu de culture est remplacé par 1 ou 2 ml de solution de Krebs selon le protocole. Avec l'aide de l'objectif à faible grossissement les cellules isolées et ensemencées sont repérées, tout en prenant bien soin d'enlever le fond (bruit de fond) en soustrayant une image hors focus aux images des cellules prises au focus. Les images sont prises toutes les cinq secondes et elles sont enregistrées dans un même fichier pour faire en sorte de reconstituer des films qui permettront de voir les cellules bouger plus rapidement qu'en temps réel. L'agent pharmacologique est ensuite injecté dans la boîte de Pétri à une concentration finale calculée en fonction du volume de solution de Krebs contenue dans la boîte (généralement 2 ml). L'agent est injecté à proximité du champ de l'objectif du microscope pour ne pas faire bouger la boîte de Pétri et changer de focus les cellules ainsi observées.

### **Analyse et prise d'images**

Les images sont prises au 5 secondes et enregistrées en « 16 bit » par le logiciel MetaMorph 4.5. Puis elles sont sauvegardées en « 8 bit » pour diminuer de moitié la taille des fichiers. Elles sont ensuite visionnées avec l'aide du programme « Image J » version

1.29 qui est disponible gratuitement sur Internet. Les différentes images sont assemblées en un pseudo-film susceptible d'être visualisées par séquence permettant de détecter les changements lents de la forme et de la longueur (tonus) des cellules mise en culture et stimulées pharmacologiquement. Des images sont ensuite sélectionnées et affiché sous forme de figure. Le raccourcissement (contraction) des cellules isolées est mesuré à partir du point d'origine de l'extension cellulaire jusqu'à l'endroit où il est située après un temps donné d'incubation avec l'agent pharmacologique.

## **Technique de purification des ARNm des cellules de MLVR**

### **Extraction de l'ARN total**

Les cellules de MLVR ont été isolées et cultivées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre tel que décrit plus haut. Le protocole utilisé pour extraire l'ARN total est disponible gratuitement sur le site Web de la compagnie Ambion Inc sous le nom « RNAqueous<sup>TM</sup>-4PCR » au numéro de catalogue : #1914. La table de travail et tout le matériel nécessaire pour réaliser l'extraction de ARN total ont été traités pour travailler sans ARNase. Les cellules, à environ 80% de confluence dans la boîte de Pétri, ont été lavées avec une solution tampon « phosphate buffer saline » (PBS) composée de (en mM) : 136.9 NaCl, 2.7 KCl, 10.0 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O et 1.8 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à pH 7.4. Les cellules sont ensuite lysées avec 500 µl de tampon de lyse (Ambion Inc.). Le lysat est déposé dans un eppendorf stérile. 500 µl d'une solution de 64 % d'EtOH (Ambion Inc.) a été ajoutée à chaque aliquote de cellules lysées et ensuite mélangées par inversion. Le lysat est ensuite filtré à travers une cartouche de filtre « RNAqueous » (Ambion Inc.) par centrifugation à 10 000 g pendant 30 s servant à retenir l'ARN du reste de la suspension. Le filtre est

ensuite lavé trois fois (1x 700 µl de solution de lavage #1 et 2x 500 µl de solution de lavage 2/3, toutes fournies par Ambion Inc.) en jetant le filtrat à chaque étapes parce que l'ARN est toujours retenue dans le filtre. L'ARN est alors élué dans un autre eppendorf stérile avec 2x 50 µl de tampon d'éluion (Ambion Inc.) préchauffé à 95°C. Les lavages et les éluions ont tous été faits par centrifugation à 10 000 g pendant 30 s. L'ARN total est ensuite traité à la DNase par l'addition de 10 µl de tampon à la DNase 10X, préchauffé à 37°C, et de 1 µl de DNase type 1 (tous d'Ambion Inc.); le tout est incubé à 37°C pendant 30 min. Ce traitement est arrêté suite à l'addition de 10 µl d'agent inactivateur de DNase (Ambion Inc.) et d'une incubation de 2 min à la température de la pièce suivi d'une centrifugation à 10 000 g pendant 1 min. Le surnageant, d'ARN total, est ensuite concentrer par précipitation avec l'addition de 10 µl d'acétate d'ammonium 5 M et de 2 µl d'acrylamide linéaire (tous d'Ambion Inc). Après avoir mélanger brièvement, 250 µl d'EtOH 100 % (Ambion Inc.) est ajouté. Le mélange est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 15 min puis le culot est resuspendu dans 15 µl de solution d'éluion (Ambion Inc.) préchauffé à 65°C et ensuite incubé pendant 5 min à 65°C pour favoriser et faciliter la solubilisation.

La concentration d'ARN extrait est ensuite déterminée par lecture d'absorbance avec l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm ( $A_{260}$ ) selon l'équation suivante où 1  $A_{260}$  est équivalent à 40 µg d'ARN/ml:

$$\text{Éq. 3 :} \quad [ARN \text{ total}] = A_{260} \times \text{facteur de dilution} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

Un rapport des absorbances  $A_{260}$  sur  $A_{280}$  est ensuite déterminé pour nous donner un indice sur la pureté de l'ARN extrait et ce rapport doit se situer entre 1.8 et 2.1. Par contre s'il est au-delà de ces limites, les expériences subséquentes peuvent aussi bien fonctionner. Pour s'assurer de la bonne qualité de l'ARN extrait, 1  $\mu$ l de cet ARN total qui est additionné de 1  $\mu$ l de tampon Loading Dye 6X (Promega) et 4  $\mu$ l  $H_2O$ , est migré sur un gel d'agarose de 2% pendant 15 min à 100 V. En plus de donné une charge négative nette, le tampon Loading Dye sert à visualisé le front de migration. La solution utilisée pour l'électrophorèse, dans lequel baigne le gel d'agarose, est le tampon Tris-Acetate-EDTA (TAE), composé de 40 mM Tris, 1mM  $Na_2EDTA$  et de 0.11% d'acide acétique, additionné de 0.1  $\mu$ g/ml de bromure d'éthidium (EtBr). Après l'électrophorèse, le gel est ensuite numérisé avec l'aide d'un « MultiImage Light Cabinet » (Alpha Innotech Corporation). Le résultat final doit montré deux bandes représentant d'ARN ribosomale 28S et 18S.

### **Transcription inverse**

La technique de transcription inverse, RT pour « reverse transcriptase », a pour but de transcrire tous les ARNm en leur acide déoxyribonucléique complémentaire (ADNc). 5  $\mu$ g d'ARN, 1  $\mu$ l d'oligo d(T) (Amersham-Pharmacia Biotech) et 7  $\mu$ l  $H_2O$  ont été mélangés et chauffé pendant 10 min à 70°C pour permettre la ligation des oligos d(T) à la queue de poly A des ARNm. 2  $\mu$ l de DTT 0.1 M, 1  $\mu$ l de dNTP 10 mM (mélange de nucléotides), 1  $\mu$ l de l'enzyme M-MLV (l'enzyme qui va produire la transcription inverse), 4  $\mu$ l de tampon First 5X (tampon de l'enzyme) et 0.62  $\mu$ l de RNasine (qui inhibe les RNases), ont été ajoutés et ensuite ce mélange est chauffé à 42°C pendant 60 min pour



activer l'enzyme à la transcription et ensuite chauffé à 70°C pendant 10 min pour désactiver l'enzyme. Les réactifs et les tampon proviennent tous de Promega.

### **Amplification des ADNc**

Cette technique, appelé « polymerase chain reaction » (PCR), est utilisée pour amplifier en chaîne la quantité d'un brin d'ADNc spécifique que l'on veut utiliser. À 4 µl de produit RT on ajoute 1 µl de dNTP 10 mM, 1 µl d'une amorce sens (10 µM) et 1 µl d'une autre antisens (10 µM) qui vont ce lier à l'ADNc que l'on veut amplifier, 5 µl de tampon 10X de la Taq polymérase, 0.33 µl de l'enzyme Taq polymérase qui va initier l'élongation des nouveaux brin d'ADNc à partir des amorces et le tout est complété avec 37.67 µl d'H<sub>2</sub>O. Les tampons et les réactifs utilisés proviennent tous de Promega. Les amorces utilisées sont spécifiques pour les séquences des « transient receptor potential canonical » (TRPC) 1, 3, 4 et 5 qui proviennent d'une publication (Garcia et Schilling, 1997) et de TRPC6 qui provient des séquences à partir de GeneBank. Les séquences des amorces utilisées sont :

mTRPC 1: sens: 5'CAAGATTTTGGGAAATTTCTGG'3

antisens: 5'TTTATCCTCATGATTTGCTAT'3

hTRPC 3: sens: 5'TGACTTCCGTTGTGCTCAAATTAG'3

antisens: 5'CCTTCTGAAGCCTTCTCCTTCTGC'3

mTRPC 4: sens: 5'TCTGCAGATATCTCTGGGAAGGATGC'3

antisens: 5'AAGCTTTGTTCGAGCAAATTTCCATTC'3

mTRPC 5: sens: 5'ATCTACTGCCTAGTACTACTGGCT'3

antisens: 5'CAGCATGATCGGCAATGAGCTG'3

rTRPC 6: sens: 5'AACAAAAGCATGACTCCTTCAG'3  
antisens: 5'AAGGAGCACACCAGTATATGAGA'3

Les amplifications ont été réalisées à partir d'un système d'amplification modèle 2400 (Perkin Elmer) pendant 34 cycles dont chacun a une durée de 30 s à 94°C (pour dénaturer les brins d'ADN), de 60 s à 58°C (pour permettre la liaison des amorces au brin d'ADN) et de 2 min à 72°C (pour permettre l'extension des nouveaux brins d'ADN par la polymérase Taq). Pour la visualisation, 10 µl du produit de PCR, mélangé avec 5 µl de tampon Loading Dye 6X (Promega), a été déposé sur un gel d'agarose 2% contenant 0.1 µg/ml d'EtBr dans un tampon TAE 1X. Après l'électrophorèse d'une durée de 45 min à 90 V avec un appareil nommé « Sub-Cell GT » (Bio-Rad), le gel a été numérisé avec l'aide d'un « MultiImage Light Cabinet » (Alpha Innotech Corporation) permettant de visualiser des bandes représentant les brins d'ADNc amplifiés par PCR et séparés sur gel selon leur poids moléculaire. C'est à partir de l'EtBr qui est fixé à l'ADNc que l'on peut voir les bandes.

## **Reconstitution des canaux Cl<sup>-</sup> dans des bicouches lipidiques planes**

### **Préparation des fractions microsomales de trachées de bœufs**

Les trachées de bœuf proviennent d'un abattoir local (Montpak, St-Germain-de-Grantham, QC). Elles sont prélevées rapidement et transportées vers le laboratoire dans une solution froide (4°C) de McEven contenant (en mM) : 130 NaCl, 5.4 KCl, 2.2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> et 10 HEPES, pH 7.4 (avec NaOH). Ensuite, les trachées sont disséquées à 4°C afin de 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 mécaniquement (Savaria et al., 1992) de manière à exposer le muscle lisse qui est toujours gardé humide avec de la solution de McEven. Le muscle lisse est ensuite disséqué du cartilage et coupé en morceaux qui sont mis dans une solution d'homogénéisation isosmotique composé de (en mM) : 300 sucrose, 20 K-PIPES, 4 K-EGTA à un pH de 7.0 (avec KOH). Un cocktail d'inhibiteurs de protéases contenant : 2 mM DTT, 50  $\mu$ M Pefabloc, 1.0  $\mu$ M Leupeptine, 0.24 TIU d'Aprotine /100 ml est ajouté à la solution d'homogénéisation. Les morceaux de trachée sont ensuite homogénéisés avec l'aide d'un polytron modèle Ultra-Turrax T25-S1 (IKA-Labortechnik) à 4°C pour 4 périodes : 2 x 30 s à 8000 rpm et ensuite 2 x 30 s à 13 500 rpm. L'homogénat est ensuite centrifugé à 6500 g pendant 20 min à 4°C dans un rotor type 35 (Beckman). Le surnageant est ensuite filtré sur 2 couches de gaze biomédicale puis recentrifugé à 85 000 g pendant 60 min à 4°C en utilisant un rotor modèle Ti-42.1 (Beckman). Le culot, obtenu suite à cette deuxième centrifugation, est resuspendu avec l'aide d'un Potter dans une solution de cryopréservation contenant (en mM) : 300 sucrose, 5 K-PIPES, pH 7.0 (KOH). La fraction microsomale brute, ainsi obtenue, est aliquotée dans des microtubes de type Eppendorf. Ces tubes sont congelés dans de l'azote liquide et entreposés à -80°C. La concentration protéique de la fraction microsomale brute est déterminée avec l'aide de la méthode de Lowry en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Lowry et al., 1951).

### **Méthode de reconstitution membranaire**

Cette technique consiste à faire fusionner des microvésicules ou à insérer directement des protéines canaux purifiées dans des bicouches lipidiques planes (Miller et Racker, 1976). Cette technique permet à la fois de contrôler la composition des solutions

contenues dans les chambres expérimentales, la composition lipidique de la bicouche et d'avoir accès aux deux côtés des canaux reconstitués. Les deux chambres expérimentales, nommées *cis* et *trans*, correspondent respectivement au côté extracellulaire et au côté intracellulaire des canaux provenant de la membrane de plasmidique. Les deux chambres sont séparées par un septum perforé d'un orifice ayant un diamètre de 250  $\mu\text{m}$ . Pour former les bicouches lipidiques planes un mélange de phospholipides est utilisé. Il est composé de : phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylcholine (PC) (Fig. 13) dans un rapport de 3 : 2 : 1, dilué dans du n-décane à raison de 25 mg/ml. Un même mélange de lipides dilué dans le chloroforme sert à prétraiter la paroi de l'orifice dans lequel sera peinte la membrane artificielle. Ce prétraitement permet d'augmenter la stabilité des bicouches lipidiques planes (BLP) dans le temps, ce qui facilite la fusion des microvésicules dans les membranes artificielles.

Les deux chambres expérimentales *cis* et *trans* contiennent la solution suivante (en mM) : 50 CsCl, 20 HEPES, 0.01  $\text{Ca}^{2+}$  libre (109  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  + 100  $\mu\text{M}$  tris-EGTA) pH 7.4 (Tris ou HCl) à température de la pièce ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). La membrane est peinte dans le trou avec le mélange de lipides, dilué dans le n-décane, avec l'aide d'une tige de téflon. Lorsque la membrane artificielle est formée, un gradient osmotique et électrochimique est créé entre les deux chambres par un ajout d'un aliquote de CsCl dans la chambre *cis* (+200 mM), ce qui a pour but de favoriser la fusion des microvésicules contenant des canaux (250 mM *cis* et 50 mM *trans* de CsCl). Les BLP utilisées ont une capacitance comprise entre 150 et 300 pF.

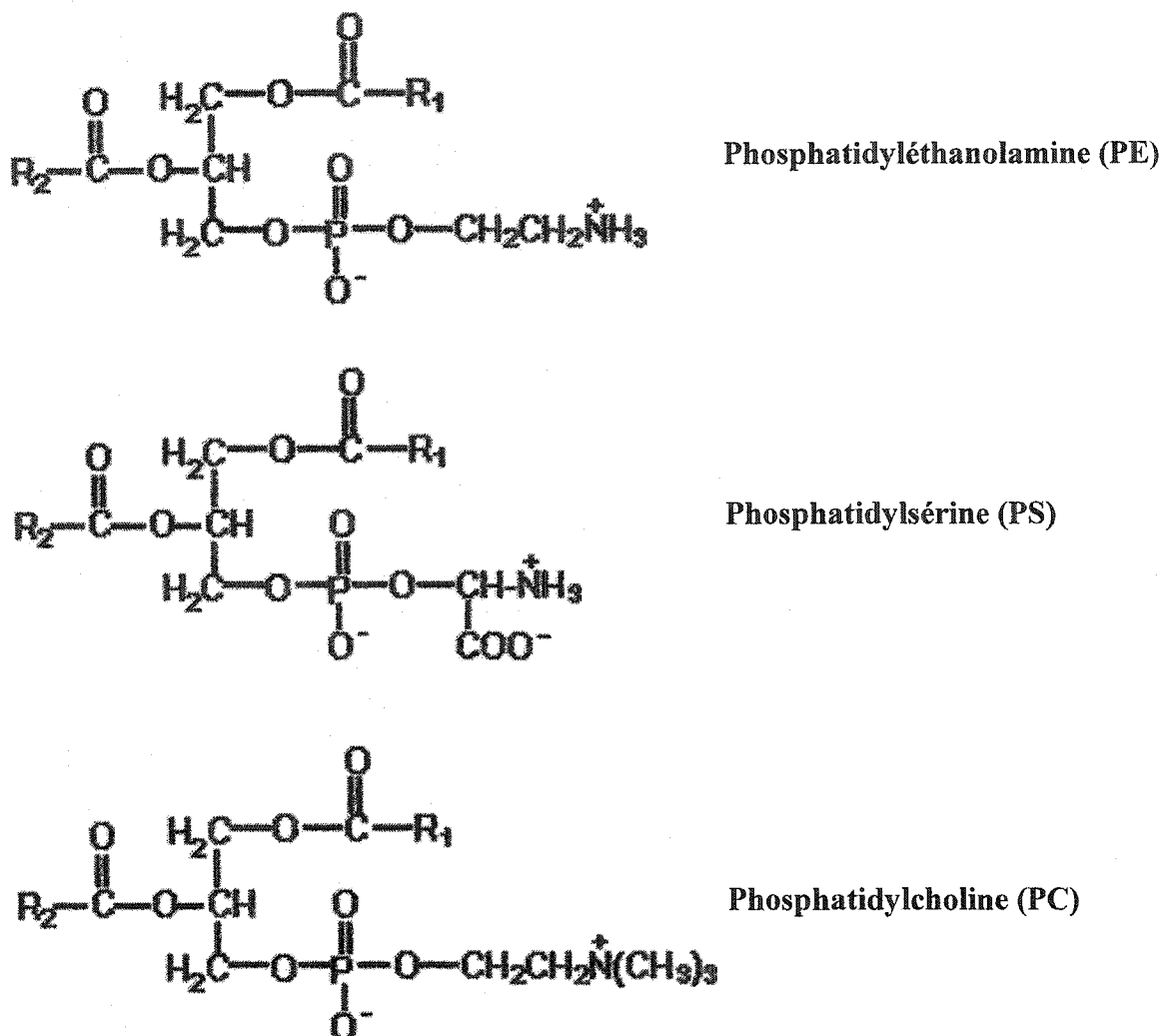
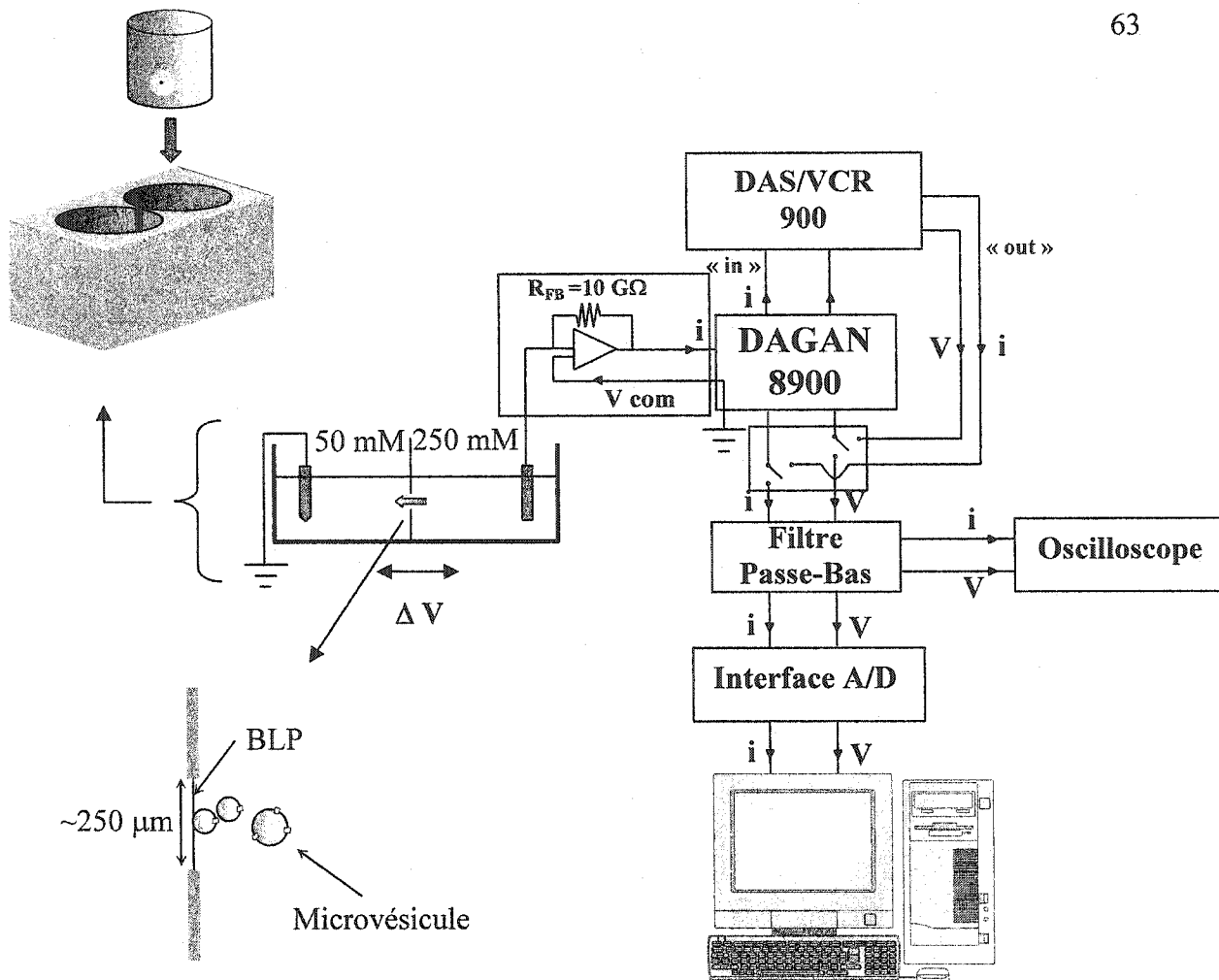


Figure 13- Structures chimiques en 2 dimensions des trois phospholipides utilisés pour la technique des bicouches lipidiques planes.

Le PE et le PC sont des molécules switterioniques tandis que le PS possède une charge nette négative. Les lettres R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représente les chaînes aliphatiques d'acide gras des phospholipides. L'acide gras à la position R<sub>1</sub> est généralement saturé comme par exemple l'acide palmitique, stéarique et oléique tandis que celui à la position R<sub>2</sub> est généralement insaturé comme par exemple l'acide arachidonique, oléique et linoléique.

L'injection des microvésicules s'effectue dans la chambre *cis* le plus près possible de l'orifice lorsque la capacitance membranaire est stabilisée. La chambre expérimentale est reliée à la terre virtuelle (chambre *trans*) et la chambre *cis* est reliée à la tête du préamplificateur modèle 8930 (Dagan Corp.) par des microélectrodes d'Ag/AgCl<sub>2</sub>. Le préamplificateur est connecté à un amplificateur de Patch Clamp modèle 8900 (Dagan) qui sert à appliquer un voltage constant aux bornes de la membrane artificielle. Le préamplificateur contient un amplificateur opérationnel et un convertisseur courant-voltage. Un courant est généré aux bornes de la membrane artificielle lorsqu'une microvésicule contenant un ou plusieurs canaux ioniques fusionne dans la membrane et qu'ensuite il y a ouverture d'au moins un de ces canaux. Le circuit électronique réinjecte alors un courant égal mais de signe opposé au courant qui traverse la membrane artificielle dans la résistance de contre-réaction ( $R_{FB}$ ) pour neutraliser la chute de voltage qui pourrait s'opérer aux bornes d'entrée du préamplificateur. C'est ce courant de signe opposé, proportionnel au courant passant à travers le canal, qui est mesuré par l'amplificateur Dagan 8900. À sa sortie, le signal est amplifié 100 fois et filtré par un filtre passe-bas de type Bessel intégré à l'amplificateur Dagan 8900 avec une fréquence de coupure de 10 kHz. Les signaux électriques bruts sont enregistrés sur bande magnétique avec l'aide d'un magnétoscope modèle DAS/VCR 900 (Unitrade) branché à la sortie du Dagan 8900. Les enregistrements seront utilisés ultérieurement pour fin d'analyses. Les courants produits lors de l'ouverture des canaux sont également visualisés sur un oscilloscope modèle DSS 5020A (Kikusui) après avoir été filtrés à 1 kHz par un filtre passe-bas de type Bessel LPF-100 8-poles (Warner Instruments Corp.). Les signaux électriques sont digitalisés à l'aide d'une interface analogue/digitale Digidata 1320 B



**Figure 14-** Schéma du montage expérimentale utilisé lors de la technique des bicouches lipidiques planes.

(Axon Instruments Inc.) et du logiciel AxoScope 8.1 (Axon Instruments Inc.). La figure 14 décrit le montage expérimental comprenant les deux chambres et les divers composants électroniques. Les signaux digitalisés vont permettre d'analyser les caractéristiques des courants pour réaliser les courbes courant-voltage ( $i/V$ ) et déterminer la probabilité d'ouverture ( $P_o$ ) des canaux.

### Analyse des courants chlores

Les courbes  $i/V$  sont obtenues en reportant sur un graphique la valeur du courant unitaire (pA) en fonction du voltage (mV) appliqué à la membrane dans différentes conditions expérimentales. La valeur de la pente de la relation  $I/V$  correspond à la conductance unitaire ( $\gamma$ ) du canal.

La  $P_o$  est définie comme étant la fraction du temps qu'un canal passe dans son état ouvert par rapport à la durée totale de l'enregistrement. La  $P_o$  est calculé avec l'aide d'un programme informatique nommé « SCA » pour « Single Channel Analysis » développé par le Dr Mark T. Nelson de l'Université du Vermont. Ce programme construit un histogramme d'amplitude pour lequel les points digitalisés pendant l'enregistrement sont classés en fonction de l'amplitude du courant. L'histogramme d'amplitude, pour un canal fluctuant entre un état fermé et un état ouvert, a la forme d'une double Gaussienne dont une pour le canal en configuration fermée et l'autre pour celle ouverte. En calculant l'aire sous ces Gaussiennes, il est possible de calculer la  $P_o$  selon l'équation 4 :

Éq. 4 :

$$P_o = \frac{A_o}{A_o + A_c}$$

où «  $P_o$  » est la probabilité d'ouverture, «  $A_o$  » est l'aire sous la courbe représentant le nombre de point digitalisé où le canal est position ouvert et «  $A_c$  » est celle où le canal en position fermé.

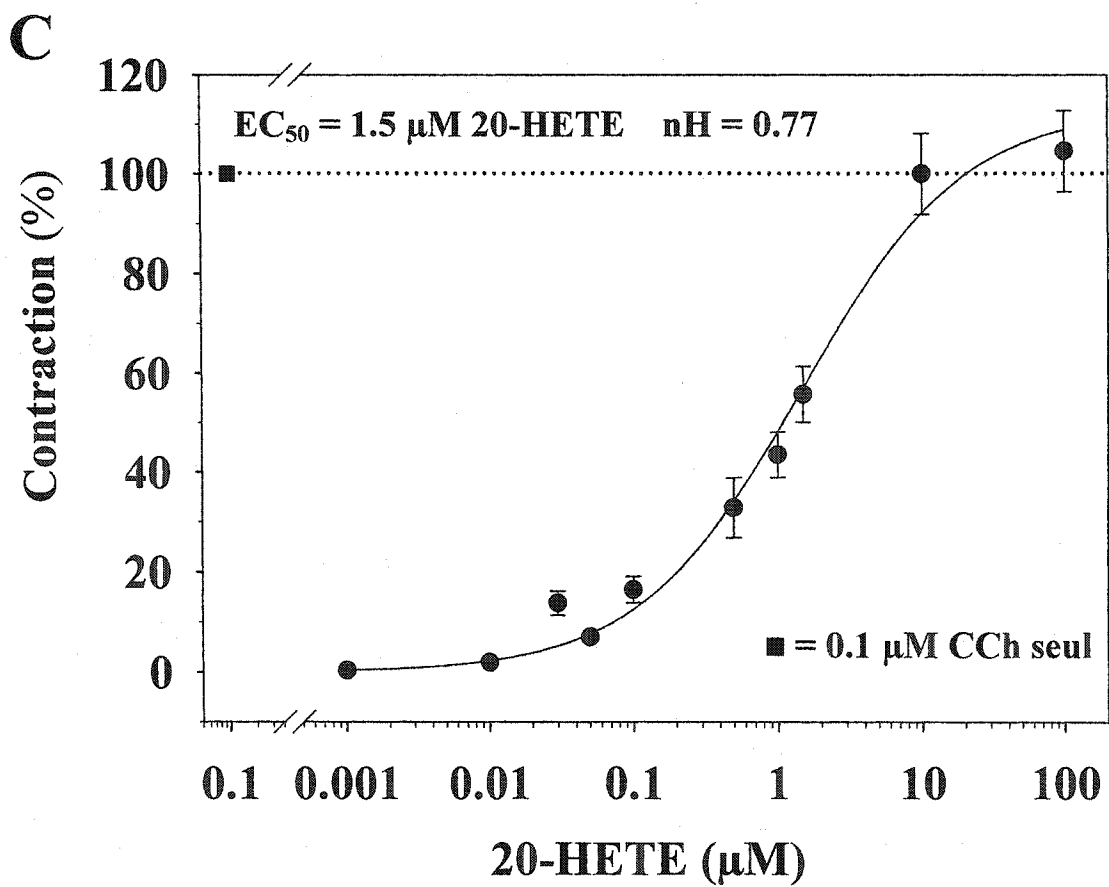
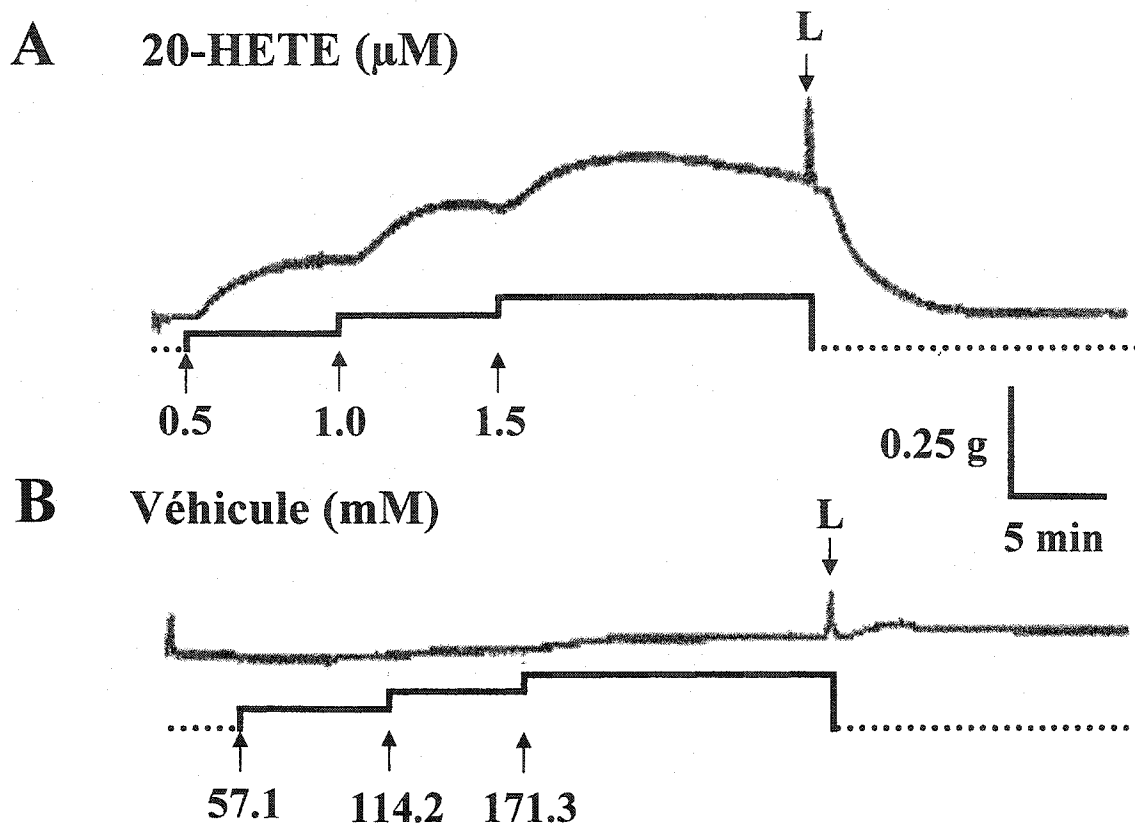


## Résultat

### Effet inotrope positif du 20-HETE sur les MLVR

#### Le 20-HETE contracte les MLVR de cobaye

Des expériences de mesure de tension isométriques ont été effectuées pour déterminer si le 20-HETE exogène induit des effets inotropes sur les MLVR des trachées et des bronches de cobaye. En premier lieu, 0.1  $\mu\text{M}$  de CCh a été appliqué sur des préparations soumises à un tonus de base de 1 g pour obtenir une amplitude de contraction qui va servir de référence lors de la quantification des effets du 20-HETE sur ces mêmes tissus. Suite au lavage du CCh et au retour à un tonus de base stable, différentes concentrations de 20-HETE ont été appliquées aux tissus. Sur les MLVR de cobaye, le 20-HETE induit un effet inotrope positif qui est cumulatif et dépendant de la concentration (Fig. 15A). De plus cet amplitude de contraction, qui est aussi indépendant de l'épithélium (ce résultat n'est pas montré), se stabilise pour prendre la forme d'un plateau pour ensuite diminuer graduellement suite à la dégradation possible du 20-HETE ou à l'inactivation de ses récepteurs potentiels. L'effet inotrope positif, qui est toujours réversible à 100% sur les MLVR, est propre au 20-HETE car l'addition d'une même quantité de son véhicule (l'EtOH 100%) n'a aucun effet sur le tonus de base (Fig 15B). Une courbe dose-réponse a été obtenue suite à l'ajout de concentrations cumulatives de 20-HETE (Fig. 15C). Les valeurs expérimentales moyennes ont été obtenues avec l'aide de l'équation 2 (voir Matériels et Méthodes p.46). À partir de celle-ci, une  $EC_{50}$  de 1.5  $\mu\text{M}$  pour le 20-HETE et coefficient de Hill (nH) de 0.77 ont été déterminés. Cette courbe indique que le 20-HETE induit un effet inotrope positif qui est détectable à partir de 0.1  $\mu\text{M}$  et qui est maximale aux environs de 100  $\mu\text{M}$  de 20-HETE (n = 3-8).



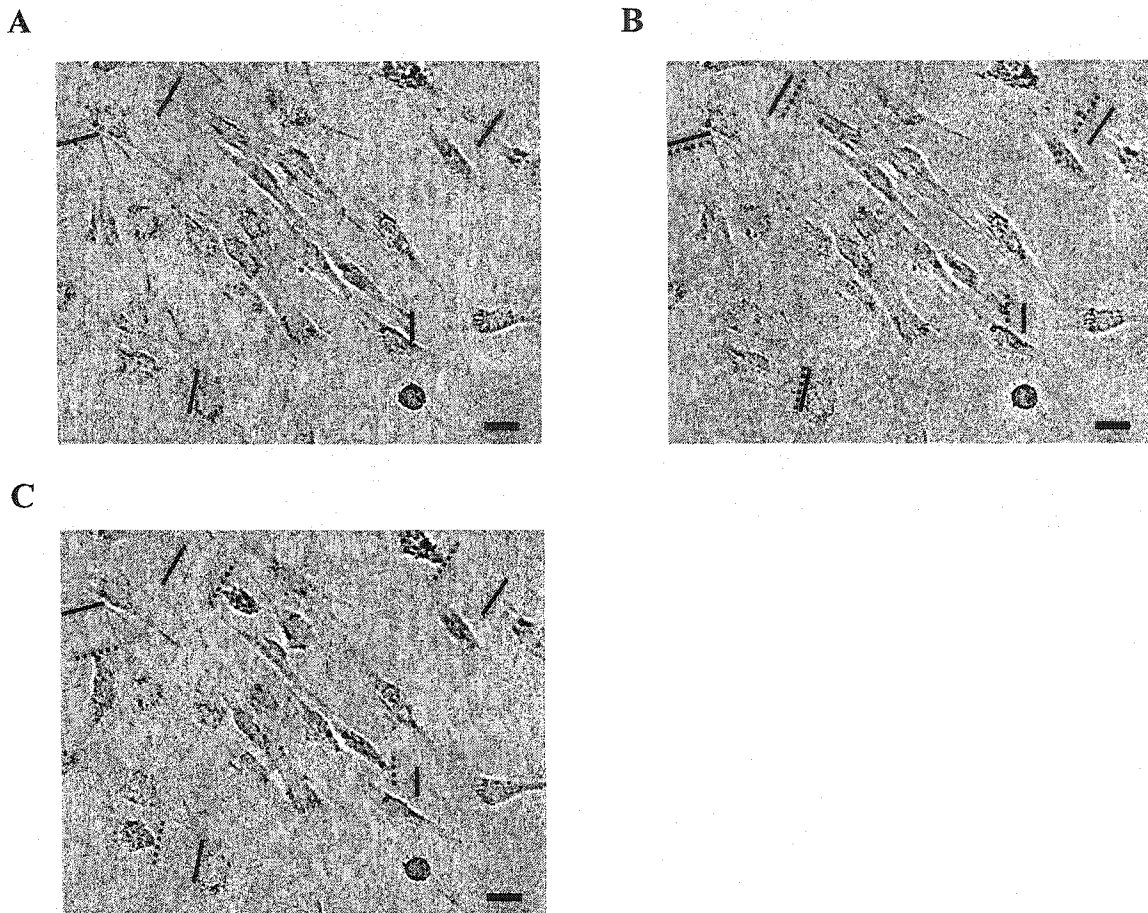
**Figure 15- Effet dose-dépendant du 20-HETE sur les muscles lisses des voies respiratoires de cobaye avec un épithélium intact.**

**A** : Tracé représentatif montrant l'effet inotrope positif et cumulatif du 20-HETE. Des concentrations cumulatives de 0.5, 1.0 et 1.5  $\mu\text{M}$  de 20-HETE ont été utilisées et appliquées séquentiellement. Le tonus basal est de 1 g. **B** : Tracé représentatif montrant que les mêmes quantités de véhicule (EtOH) que celles utilisées lors de l'ajout du 20-HETE (utilisées en **A**) n'ont aucun effet sur le tonus de base. **C** : Courbe dose-réponse représentant l'amplitude de contraction induit par le 20-HETE en pourcentage de celle obtenue en présence de 0.1  $\mu\text{M}$  de CCh, sur le même tissu, en fonction des concentrations de 20-HETE utilisées. Une  $\text{EC}_{50}$  de 1.5  $\mu\text{M}$  pour le 20-HETE et un coefficient de Hill (nH) de 0.77 ont été déterminés à partir de la courbe avec l'aide de l'équation 2 (voir Matériels et Méthodes). Ces données sont des valeurs moyennes  $\pm$  S.E.M. obtenues à partir de 3 à 8 expériences. Les flèches indiquent le moment de l'ajout du 20-HETE et de son véhicule, puis le moment du lavage (L) des tissus.

### **Le 20-HETE agit également sur des cellules isolées de MLVR en culture primaire**

Il a été rapporté que l'activité relaxante du 20-HETE était dépendante de l'épithélium chez le MLVR de lapin (Jacobs et al., 1999). Comme le 20-HETE induit la contraction des MLVR de cobaye lors de mesures de tension isométrique, nous avons vérifié si le 20-HETE pouvait induire aussi un raccourcissement (contraction) des cellules isolées de MLVR qui ont été mise en culture primaire. Ces cellules ne subiront pas l'influence de la circulation sanguine ni celle de l'épithélium. Avec l'aide de la technique d'imagerie cellulaire, des images ont été prises à toutes les cinq secondes à l'aide de la caméra digitale installée sur le microscope inversé. Ses images permettent la visualisation des changements de forme, des déplacements et des raccourcissements des cellules en fonction du temps ou de l'addition d'agent pharmacologique.

La figure 16 montre trois images prises lors d'une expérience réalisée en absence et en présence de 1.5  $\mu$ M de 20-HETE sur des cellules isolées de MLVR de chien. En condition contrôle (Fig. 16A), les cellules baignent dans une solution physiologique et elles ont majoritairement une forme allongée de part et d'autre du corps cellulaire. Après l'ajout de 1.5  $\mu$ M de 20-HETE dans la solution de Krebs, les cellules ont commencé à se raccourcir en ramenant leurs extrémités vers le corps cellulaire (Fig. 16B). Le raccourcissement des cellules est plus prononcé après 10 min 40 s (640 s) d'incubation avec 1.5  $\mu$ M de 20-HETE (Fig. 16C). En plus de raccourcir les cellules isolées de MLVR de chien, le 20-HETE induit le même effet sur des cellules de rat et de cobaye. Par contre, le peu d'expérience faite avec cette technique rend difficile la quantification des effets du 20-HETE sur ces cellules. De plus, le raccourcissement observé semble être dépendant de



**Figure 16- Exemple de l'effet du 20-HETE sur des cellules isolées de MLVR de chien.**

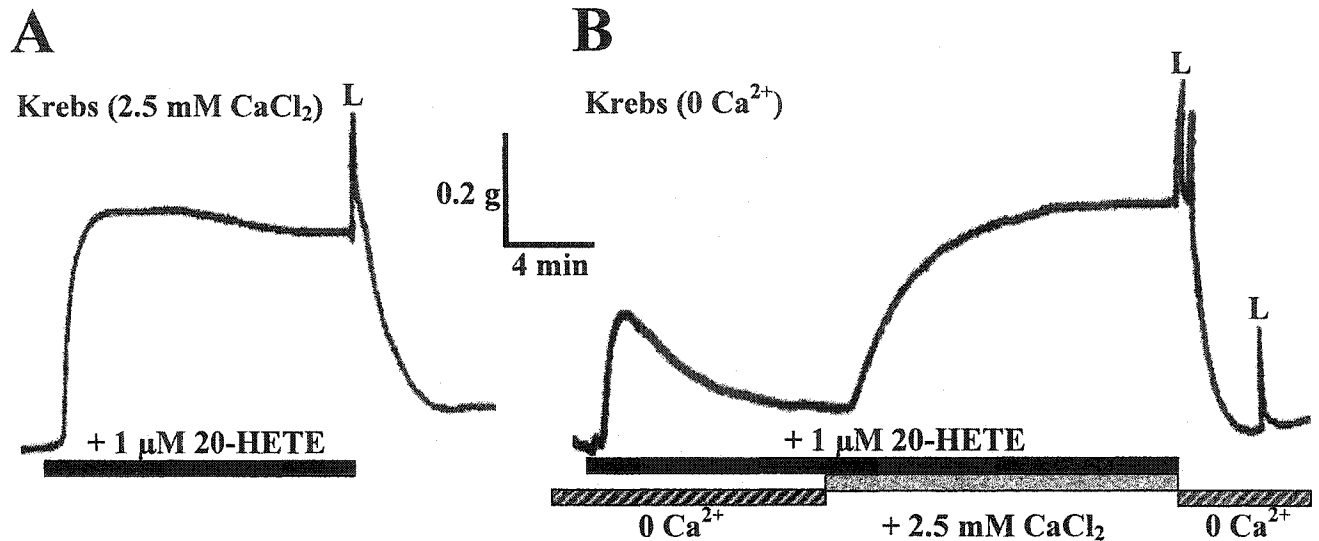
Les images digitalisées montrent des cellules isolées de MLVR de chien mise en culture primaire en condition contrôle dans la solution physiologique à 37°C (A), puis à 65 s (B) et à 640 s (C) après l'ajout de 1.5  $\mu\text{M}$  de 20-HETE. Ces images ont été obtenues dans le visible à l'aide d'une caméra couplée au microscope inversé. Le facteur de grossissement est de 400X. Les lignes pleines désignent la position de l'extrémité des cellules en condition contrôle, alors que les lignes pointillées désignent l'extrémité de la même cellule, à un temps donnée, après l'ajout de 1.5  $\mu\text{M}$  de 20-HETE dans le milieu. Trait de graduation : 25  $\mu\text{m}$ .

la liaison de celles-ci à la boîte de Pétri et/ou aux autres cellules. De plus l'ajout seul du solvant (EtOH 100%), qui sert de véhicule pour le 20-HETE, n'a pas d'effet contracturant (raccourcissement) bien qu'à un rapport de 1% dans une solution physiologique, il pourrait induire un effet osmotique généralement associé à un changement de volume cellulaire. D'autres expériences de même type ont été réalisées sur des cellules isolés de MLVR de rat et de cobaye et un ajout du 20-HETE exogène a également induit un raccourcissement de ces cellules.

Le petit nombre d'expériences réalisées à l'aide de cette technique est insuffisant pour permettre une quantification des mesures de la distance de raccourcissement des cellules par rapport à leur point d'origine. Néanmoins, la figure 16 donne un exemple de cette état de fait (ligne en pointillé vs ligne pleine).

### **Implication du $\text{Ca}^{2+}$ intra et extracellulaire dans l'effet inotrope positif du 20-HETE**

Les substances qui ont des effets contractiles sur les MLVR comme l'Ach et l'histamine induisent leurs effets via leur liaison à leurs récepteurs respectifs. L'activation de certain récepteurs à sept domaines transmembranaires (ie : M3) induisent une augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provenant des réserves intracellulaires et/ou du milieu extracellulaire (Roux et al., 1998). Afin de vérifier si le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire est impliqué dans le contrôle de la contraction induit par le 20-HETE, des expériences ont été réalisées en substituant à la solution de Krebs normal une solution modifiée ne contenant pas de  $\text{Ca}^{2+}$ . En condition normale, soit en présence de 2.5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la solution de Krebs (Fig. 17A), 1  $\mu\text{M}$  de 20-HETE induit une contraction comprenant une phase de montée



**Figure 17- La contraction des MLVR de cobaye induit par le 20-HETE implique des mouvements calciques dans la cellule.**

**A :** Tracé représentatif d'une contraction induite par 1 μM de 20-HETE sur le MLVR de cobaye avec épithélium et en solution de Krebs normale (2.5 mM CaCl<sub>2</sub>). **B :** Tracé représentatif montrant l'effet transitoire de 1 μM de 20-HETE dans une solution de Krebs modifiée contenant 0 mM de CaCl<sub>2</sub>, suivi d'une augmentation de la tension après l'ajout de 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> dans le bain à organe isolé. Les deux tracés (A et B) sont des expériences réalisées sur le même tissu. Tous ces effets sont réversibles après le lavage (L) avec de la solution de Krebs normale (A) ou modifiée (B).

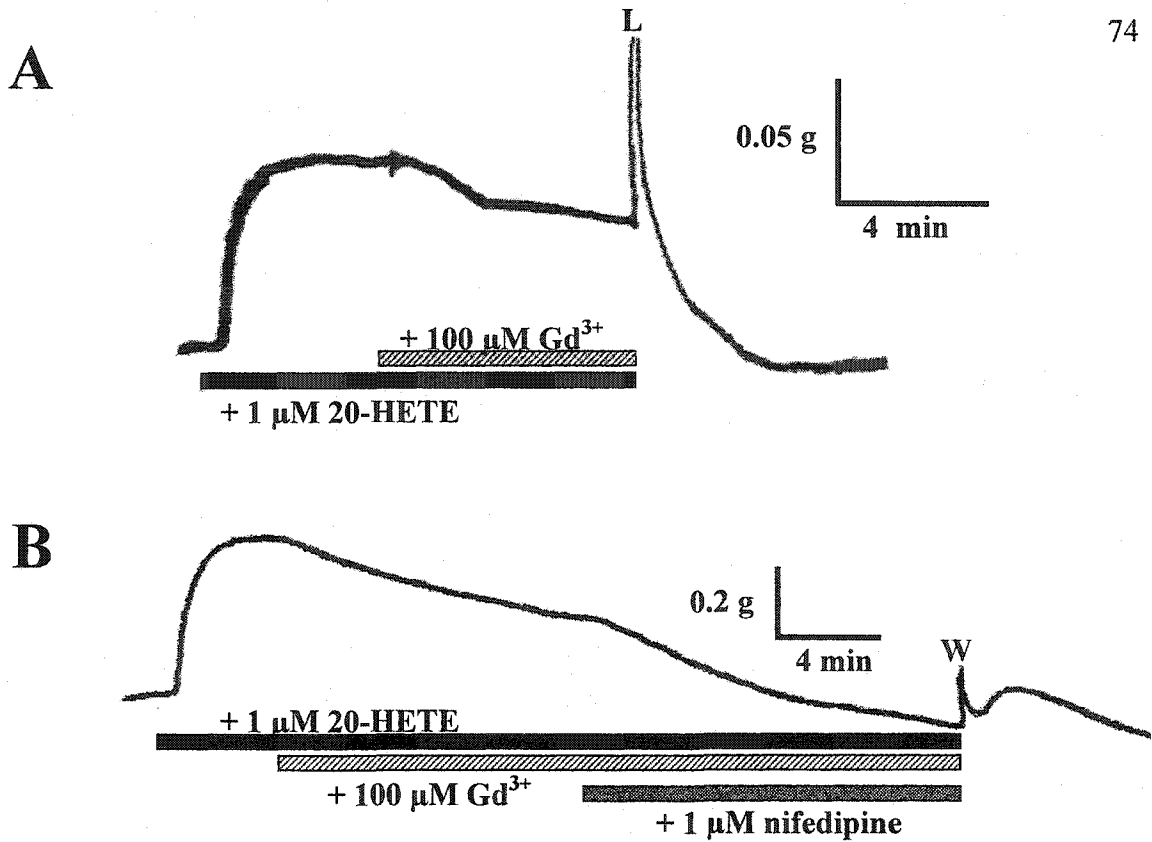
rapide menant à un plateau qui diminue ensuite peu à peu. La contraction est réversible après un lavage avec de la solution de Krebs sans eicosanoïde. Lorsqu'il n'y a pas de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la solution de Krebs modifiée : 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 17B), l'application de 1  $\mu\text{M}$  de 20-HETE sur le tonus de base induit un effet inotrope positif qui est transitoire. Cette contraction comprend une phase de montée rapide de faible amplitude, contrairement à celle en condition normale, et celle-ci diminue rapidement jusqu'à un niveau stable qui a une amplitude un peu plus élevée que celui du tonus de base. Toujours en présence de 20-HETE, l'addition de 2.5 mM de  $\text{CaCl}_2$  dans la solution de Krebs induit une augmentation de l'amplitude de contraction jusqu'à l'obtention d'un plateau qui se maintient. Cette dernière expérience tend à prouver que l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  au milieu extracellulaire, lors de la stimulation pharmacologique au 20-HETE, permet de retrouver la composante tonique de la contraction. Cette contraction est réversible et revient au tonus de base suite au lavage du tissu avec de la solution de Krebs modifiée (0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) et sans 20-HETE.

### **Implication de canaux calciques dans la contraction induite le 20-HETE**

Il existe plusieurs moyens par lequel le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire peut entrer dans la cellule lors d'une contraction des muscles lisses : les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage de type L, les échangeurs  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  et les conductances cationiques non-sélectifs. Il a été rapporté que les canaux calciques de type L ne sont presque pas impliqués dans la phase tonique d'une contraction muscarinique des MLVR (Tao et al., 2000). De plus les échangeurs  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  sont surtout impliqués dans l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire vers le milieu extracellulaire suite à une contraction (Bokemeyer et al., 1994). Alors nous avons vérifié si le  $\text{Ca}^{2+}$  pouvait entrer dans les cellules par des conductances cationiques non-sélectives comme il a été rapporté dans la contraction des MLV des artères cérébrales



de rat, activée par l'augmentation de la pression (Welsh et al., 2002). Notre première approche expérimentale a consisté à utiliser du  $Gd^{3+}$  pour bloquer les conductance cationique non-capacitatifs (Moneer et Taylor, 2002) qui pourrait être induite par 1  $\mu M$  de 20-HETE. 100  $\mu M$  de  $GdCl_3$  à été ajouté au milieu lors de la phase tonique (plateau) de la réponse contractile aux tissus (Fig. 18A). L'effet du  $Gd^{3+}$  sur cette contraction soutenue est une relaxation partielle des MLVR de cobaye jusqu'à la l'obtention d'un état stable (plateau). Suite au lavage des tissus avec de la solution de Krebs normale, le tissu se relaxe complètement jusqu'à l'obtention d'une tension de base qui est systématiquement inférieure à celle de référence. Cette dernière observation tend à prouver que le  $Gd^{3+}$  est susceptible de bloquer des conductances impliquées dans le maintient du tonus musculaire des MLVR. Pour connaître par quel mécanisme le calcium entre dans la cellule lorsque les canaux impliqués dans l'entrée non-capacitative de  $Ca^{2+}$  sont bloqués, la nifédipine a été utilisé en association avec le  $Gd^{3+}$  pour tester l'implication des canaux  $Ca^{2+}$  de type L qui sont dépendant du voltage et sensible aux dihydropyridines. 1  $\mu M$  de nifédipine à été ajouté dans les bains à organe isolé lors de la formation du plateau obtenu après les ajouts successif de 1  $\mu M$  de 20-HETE et de 100  $\mu M$  de  $Gd^{3+}$  (Fig. 18B). La nifédipine a eu pour effet d'induire la relaxation du reste de la tension mécanique induite par le 20-HETE à un tonus de base qui est, encore une fois, plus bas que celle de référence. De plus, 1  $\mu M$  de nifédipine seul relaxe de  $69.6 \pm 7.8\%$  ( $n = 12$ ) la tension mécanique induite par 1  $\mu M$  de 20-HETE et une addition successive de 100  $\mu M$  de  $Gd^{3+}$  relaxe de  $19.7 \pm 2.1\%$  ( $n = 3$ ) le reste de la tension (ce résultat n'est pas montré). Ces résultats montrent que les conductances cationiques non sélectives et les canaux  $Ca^{2+}$  de type L sont impliqués dans la phase tonique de l'effet contracturant induit par le 20-HETE sur les MLVR de cobaye.



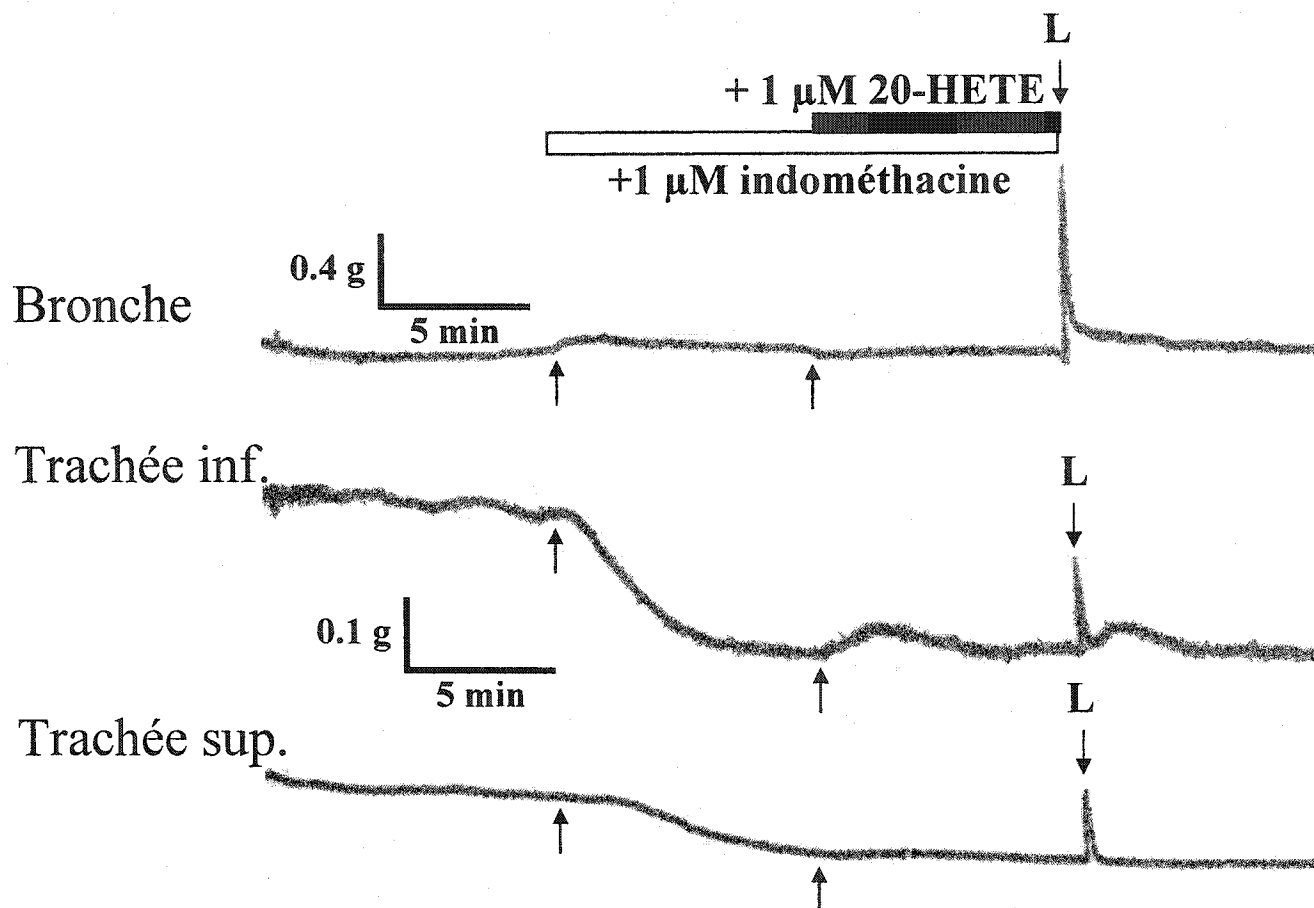
**Figure 18- Effet de deux bloqueurs de conductances cationiques sur la tension mécanique des MLVR induite par le 20-HETE.**

**A :** Effet inotrope positif de 1  $\mu\text{M}$  de 20-HETE sur le MLVR de cobaye. 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{GdCl}_3$  est ajouté lors de la phase tonique de la contraction induite par le 20-HETE. Le  $\text{Gd}^{3+}$  provoque une relaxation partielle de la tension mécanique ( $n = 3$ ). Cette tension mécanique résiduelle est complètement abolie après le lavage (L) avec de la solution de Krebs normale sans agent pharmacologique. **B :** Effet cumulatif du  $\text{Gd}^{3+}$  et de la nifédipine suite à une stimulation pharmacologique avec 1  $\mu\text{M}$  de 20-HETE. Le  $\text{GdCl}_3$  relaxe partiellement ( $\approx 50\%$ ) la tension mécanique jusqu'à la formation d'un plateau. À ce plateau 1  $\mu\text{M}$  de nifédipine est injecté dans le bain, ce qui provoque la relaxation de la tension mécanique résiduelle. Le tissu est ensuite lavé (L) avec de la solution de Krebs normale ( $n = 2$ ). Ces expériences ont été réalisées sur des tissus avec un épithélium intact.

### **L'effet contracturant du 20-HETE implique une activité des COX**

Une publication antérieure a montré que l'effet relaxant du 20-HETE sur les MLVR de lapin se produisait lorsque l'activité des COX était intacte (Jacobs et al., 1999). Nous avons donc vérifié si les effets inotropes positifs du 20-HETE sur les MLVR de cobaye étaient sensibles à l'indométhacine, inhibiteur non spécifique des COX. Nous avons donc testé l'effet de l'indométhacine sur la réponse des tissus au 20-HETE. La figure 19 montre que suite à un prétraitement avec 1  $\mu\text{M}$  d'indométhacine aux MLVR ayant un épithélium intact, le tonus de base des deux morceaux de trachées a diminué mais pas celle de la bronche. À un tonus de base redevenu stable (après environ 8 minutes d'incubation), 1  $\mu\text{M}$  de 20-HETE a été ajouté dans les bains à organe isolé. Le 20-HETE n'a très peu d'effet sur le tonus de base des MLVR. Ce résultat montre bien que l'effet inotrope positif du 20-HETE est dépendant des COX.

De plus, suite au lavage des tissus avec de la solution de Krebs (sans agent pharmacologique), le tonus de base des deux morceaux de trachée n'est pas retourné au niveau de référence (Fig. 19); il est resté au même niveau d'amplitude qu'à celui obtenu en présence d'indométhacine. Il est possible que l'indométhacine soit resté dans les cellules du MLVR pour aller inhiber les COX avec une grande affinité. De fait les effets de cet inhibiteur seraient difficilement réversibles. De plus cette observation reproductible suggère qu'une production endogène de prostaglandine existe dans ces tissus montés dans des bains à organe isolé.

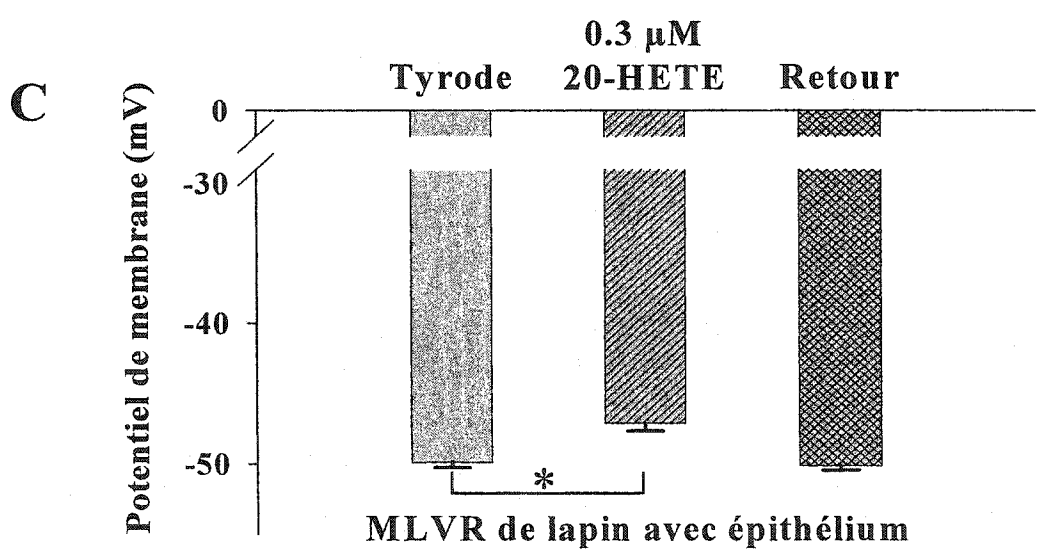
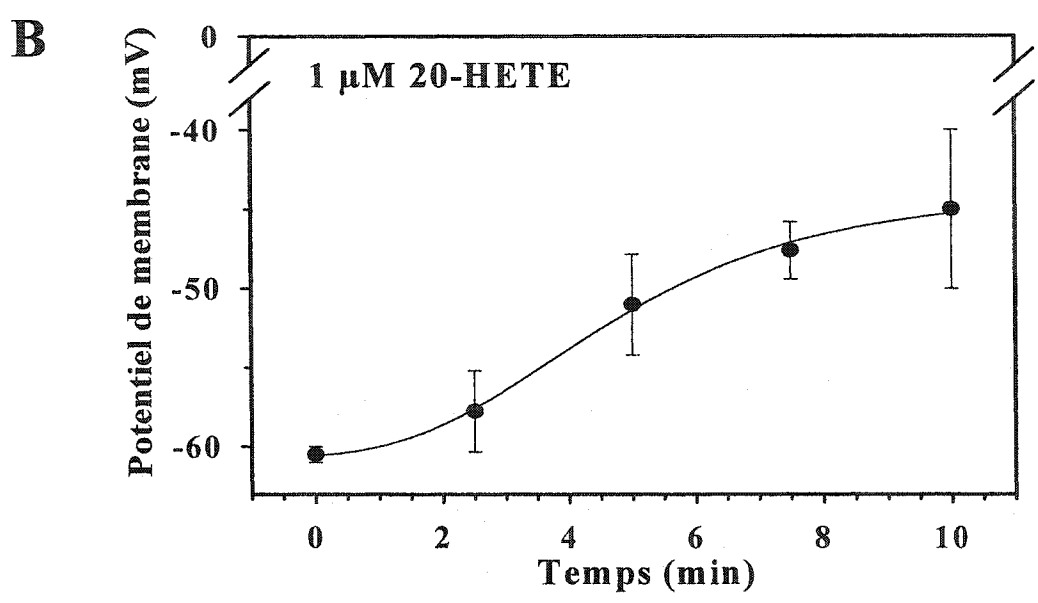
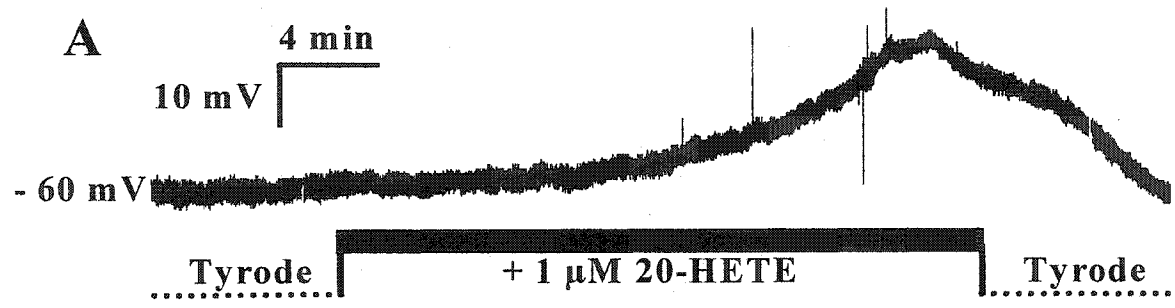


**Figure 19- Influence de l'indométhacine sur le tonus des MLVR de cobaye et sur la réponse des tissus au 20-HETE.**

Les tissus, en présence d'un épithélium intacte, ont été prétraités avec  $1 \mu\text{M}$  d'indométhacine. Après l'obtention d'un tonus de base stable (environ 8 min),  $1 \mu\text{M}$  de 20-HETE a été ajouté dans les chambres expérimentales. En présence d'indométhacine, le 20-HETE n'a pratiquement pas eu d'effet sur le tonus de base. Les tissus ont ensuite été lavées (L) avec de la solution de Krebs normale (sans agent pharmacologique).

### **Effet du 20-HETE sur le potentiel transmembranaire des MLVR de lapin**

Lorsqu'un agoniste muscarinique, comme l'ACh, induit la contraction du muscle lisse trachéal canin, il a été rapporté qu'une dépolarisation transmembranaire accompagne cet effet inotrope (Farley et Miles, 1977; Stephens, 1970). Jusqu'à présent, aucun article n'a fait l'objet d'études visant à montrer que l'effet inotrope positif du 20-HETE pouvait être concomitant avec un changement de potentiel transmembranaire des cellules de muscle lisse des voies respiratoires. Deux études ont montré que le 20-HETE dépolarise le potentiel transmembranaire des MLV d'artères rénales et basilaire de chien (Ma et al., 1993; Obara et al., 2002). Nous avons vérifié si l'application du 20-HETE exogène peut modifier le potentiel transmembranaire des cellules de MLVR avec l'utilisation de la technique de microélectrode. Les expériences ont été réalisées sur des trachées de lapin (et de cobaye) perfusées avec de la solution physiologique à 37°C et à un pH de 7.4 suite à un barbotage avec du carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>). La figure 20A montre un enregistrement d'un tracé en continu du potentiel transmembranaire mesuré à partir d'une cellule de MLVR de lapin avec un épithélium intact. La microélectrode, qui reste empalée dans une cellule de muscle lisse, permet de mesurer le potentiel transmembranaire continuellement. Cette expérience a été obtenue avec un débit de perfusion bas (0.5 ml/min) pour faciliter le maintien de l'empalement et ainsi les enregistrements. Après avoir obtenu un potentiel transmembranaire stable à -60 mV, 1 µM de 20-HETE a été perfusé et une dépolarisation de la cellule de MLVR a été obtenue. Cet effet se produit en fonction du temps et une dépolarisation maximale de 18 mV a été enregistré après 22 minutes du début de la perfusion du 20-HETE. Lorsque la dépolarisation maximale a été obtenue, un lavage a été réalisé par la perfusion de la



**Figure 20- Effet du 20-HETE sur le potentiel transmembranaire des MLVR de lapin.**

**A :** Enregistrement en continu du potentiel transmembranaire des MLVR de lapin avec un épithélium intact. 1  $\mu$ M de 20-HETE induit une dépolarisation en fonction du temps. Cet effet est réversible suite au lavage du tissu par la solution physiologique. Pour maintenir l'empalement, le débit de perfusion est de 0.5 ml/min. **B :** Compilation des mesures de potentiels transmembranaires des MLVR de lapin avec épithélium par la technique de multi-empalements. Ces mesures (n = 9 empalements) ont été prises à différents temps de perfusion de 1  $\mu$ M de 20-HETE (0, 2.5, 5, 7.5 et 10 min). Le débit de perfusion est dans ces expériences est de 1 ml/min. **C :** Quantification des variations de mesures de potentiel transmembranaire sur des MLVR de lapin, dépourvus de leur épithélium. Dans ces conditions, le potentiel de repos des cellules des MLVR est de  $-50 \pm 0.6$  mV (n = 23 empalements). L'ajout de 0.3  $\mu$ M de 20-HETE dépolarise de  $3.4 \pm 0.5$  mV (n = 60 empalements) le potentiel transmembranaire moyen. Le retour au potentiel de référence est obtenu après le lavage des tissu avec la solution de Tyrode normale (sans 20-HETE). Les résultats représentent la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M. \* Signifie que la valeur du potentiel transmembranaire dépolarisé par le 20-HETE est significativement différente que celle en condition contrôle avec un  $P < 0.05$ .

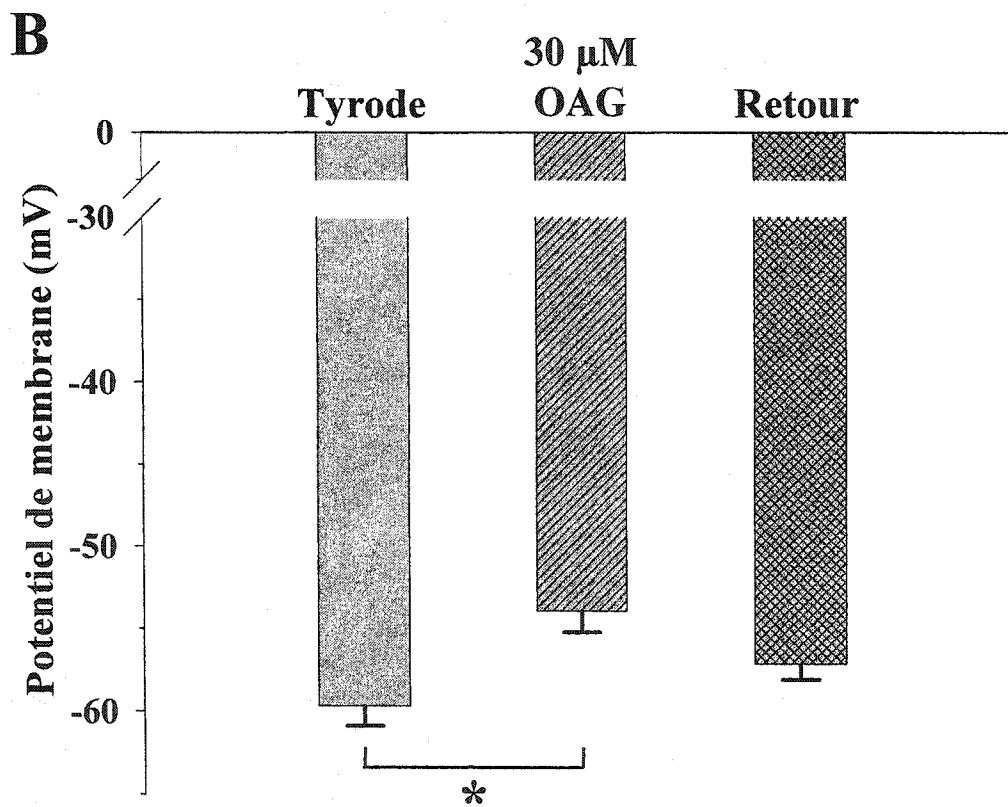
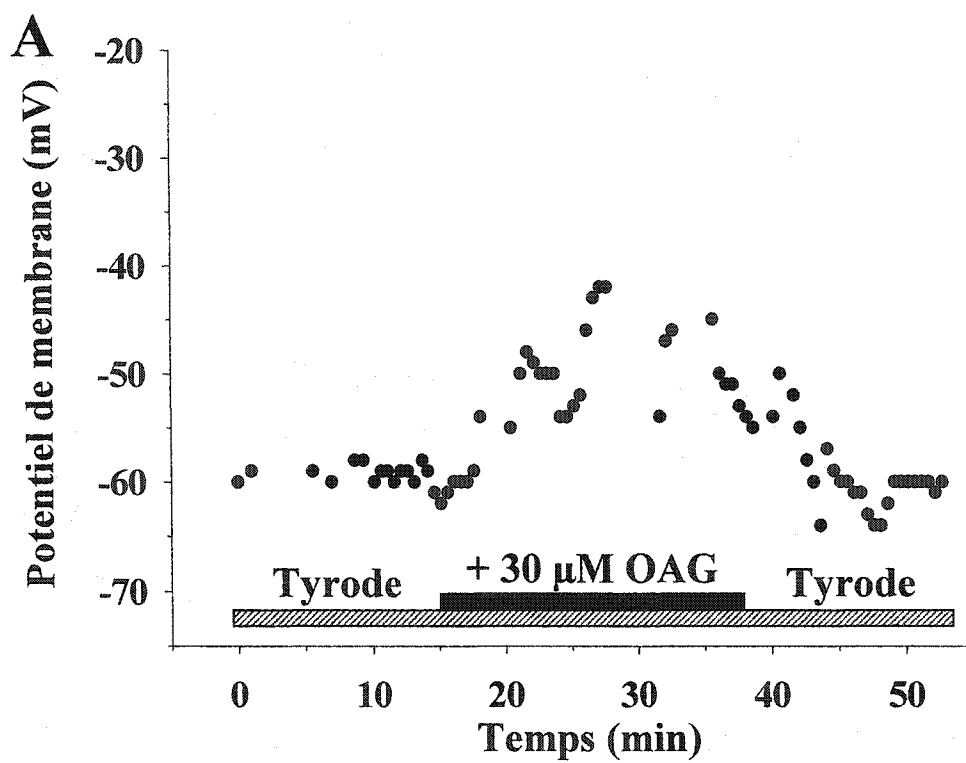
solution de Tyrode seule (sans 20-HETE) et le potentiel transmembranaire est revenu au niveau de référence (Fig. 20A). Une différence se perçoit entre nos résultats de l'effet dépolarisant du 20-HETE et de ceux de l'effet relaxant, qui est possiblement hyperpolarisant, sur les MLVR de lapin publiés par Jacobs et al. (1999). Nous n'avons aucune explication pour expliquer cette différence. De plus en ces mêmes conditions expérimentales, 3  $\mu\text{M}$  de 20-HETE induit aussi une dépolarisation membranaire de  $13.4 \pm 1.4$  mV qui est 100% réversible sur des cellules de MLVR de cobaye (ce résultat n'est pas montré). Comme il est difficile de maintenir la microélectrode en place (empalé) pendant une longue période de temps, la méthode de multi-empalements a été utilisée. Cette méthode consiste à prendre des mesures de potentiel transmembranaire à partir de plusieurs cellules adjacentes lors d'une même expérience et en fonction des différentes conditions expérimentales. La figure 20B rapporte les résultats des mesures de potentiel transmembranaire obtenus avec l'aide de la technique de multi-empalements sur le MLVR de lapin avec un épithélium intact. Ce type d'expérience a été réalisé avec un débit de perfusion de 1 ml/min. Les potentiels transmembranaires ont été mesurés à différentes intervalles de temps (0, 2.5, 5, 7.5, et 10 min) après le début de la perfusion avec le 20-HETE. La perfusion de 1  $\mu\text{M}$  de 20-HETE dépolarise les cellules de MLVR de lapin de  $3.2 \pm 2.6$  mV après 2.5 min,  $9.5 \pm 3.2$  mV après 5 min,  $12.9 \pm 1.8$  mV après 7.5 min et de  $15.0 \pm 5.0$  mV après 10 min ( $n = 9$  empalements). La figure 20B montre que la dépolarisation maximale induite par le 20-HETE est mesurée à 10 min après le début de la perfusion; ce qui est compatible avec les 22 min mesurés à un taux de perfusion deux fois plus lent (Fig. 20A). Le potentiel transmembranaire a aussi été mesuré sur les MLVR de lapin sans épithélium pour vérifier si les cellules épithéliales contribuent ou non à l'effet



du 20-HETE. En absence d'épithélium (Fig. 20C), le potentiel transmembranaire au repos est de  $-50 \pm 0.6$  mV ( $n = 23$  empacements). Sur ces tissus,  $0.3 \mu\text{M}$  de 20-HETE dépolarise de  $3.4 \pm 0.5$  mV ( $n = 60$  empacements). Cette dépolarisation induite par le 20-HETE est réversible après la perfusion avec la solution de Tyrode seule (Fig. 20C).

### **Effet de l'OAG sur le potentiel transmembranaire**

Les mesures de tension isométrique ont montré que suite à l'effet relaxant du  $\text{Gd}^{3+}$ , les conductances cationiques non-sélectives sont impliquées dans la phase tonique (plateau) de la contraction induite par le 20-HETE. Nous avons vérifié si l'activation de ces conductances par le 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) peut aussi induire une dépolarisation transmembranaire. L'OAG est un analogue stable du DAG qui est perméable à la travers la membrane plasmique des cellules. Il est un activateur de la PKC (Baron et al., 2002) et il est également utilisé pour activer les conductances cationiques non-sélectives supportées par les canaux de type « Transient Receptor Protein Channel » (TRPC) 3/6/7 des cellules de Jurkat et des lymphocytes T humain (Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999). La technique de multi-empacements a également été utilisée pour tester les effets de l'OAG sur le potentiel transmembranaire des MLVR de chien. Les figures 21A et B montrent que  $30 \mu\text{M}$  d'OAG dépolarise le potentiel transmembranaire moyen des MLVR de chien avec un épithélium intact. La figure 21A montre les résultats bruts d'une expérience montrant l'effet de l'OAG sur les MLVR de chien en fonction du temps. Suite à l'effet dépolarisant de l'OAG, la perfusion d'une solution de Tyrode seule permet un retour du potentiel de membrane au potentiel de référence. Lorsque l'ensemble des résultats a été compilé (Fig. 21B),  $30 \mu\text{M}$  d'OAG dépolarise de  $5.74 \pm 0.79$  mV les



**Figure 21- Effet de l'OAG sur potentiel transmembranaire des MLVR de chien avec épithélium.**

**A :** Résultat d'une expérience, à l'aide de la technique de multi-empalements, montrant l'effet de la perfusion du 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) sur le potentiel transmembranaire des MLVR de chien en fonction du temps. 30  $\mu$ M d'OAG induit une dépolarisation membranaire. Après le lavage du tissu avec la solution de Tyrode, le potentiel de membrane tend à revenir vers le potentiel de référence. **B :** Quantification de l'effet de l'OAG sur le potentiel transmembranaire des MLVR de chien avec épithélium. 30  $\mu$ M d'OAG dépolarise de  $5.74 \pm 0.79$  mV (n = 14 empalements) le potentiel de référence des MLVR. L'effet de l'OAG sur les MLVR de chien n'est pas 100% réversible lorsque le potentiel transmembranaire est quantifié (n = 15 empalements) après le lavage des tissus avec la solution de Tyrode (sans OAG). Les résultats représentent la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M. \* Signifie que la valeur du potentiel transmembranaire est significativement différente (P < 0.05).

MLVR (n = 14 empacements). Par contre, le lavage de l'OAG par la perfusion d'une solution de Tyrode seule, n'a permis qu'un retour partiel du potentiel transmembranaire qui est non significatif avec la valeur de référence. Il est possible, comme l'indométhacine et le  $GD^{3+}$ , que l'OAG soit difficilement lavable et reste dans les cellules de MLVR tout en les maintenant dépolarisées.

### **Effet du 20-HETE sur les canaux ioniques des MLVR bovin**

Les expériences précédentes ont montré que le 20-HETE induit une dépolarisation et un effet inotrope positif sur les MLVR impliquant des conductance cationique non-sélectives et des canaux calciques de type L. Pour ce qui est des autres canaux ioniques, il est possible que cet effet dépolarisant implique une diminution des conductances potassiques et une augmentation des conductances calciques et chlores (Janssen, 2002). Il a été rapporté par notre laboratoire que les EETs, en plus de relaxer et d'hyperpolariser les MLVR (Benoît et al., 2001), diminue l'activité du canal  $Cl^-$  des MLVR de bovins (Salvail et al., 1998; Salvail et al., 2002). Les effets du 20-HETE ont été testés sur l'activité du canal  $Cl^-$  pour savoir s'il pouvait éventuellement modifier l'activité de ce canal. Ces expériences ont été réalisées avec l'aide de la technique des BLP. La figure 22A montre des enregistrements séquentielles de l'activité d'un canal  $Cl^-$  en condition contrôle, puis suite à l'ajout cumulatif de 1 et 3  $\mu M$  de 20-HETE dans le compartiment *cis*. Ces résultats ont été obtenus à  $-60$  mV et en condition asymétrique de 50 mM *trans* / 250 mM *cis* de CsCl. Les additions cumulatives de 20-HETE ne modifie pas l'amplitude de courant unitaire. De plus, le 20-HETE ne semble pas avoir d'effet sur la conductance du canal  $Cl^-$  (Fig. 22B), c'est-à-dire sur pente de la relation du courant ( $i$ ) en fonction du voltage ( $V$ ),

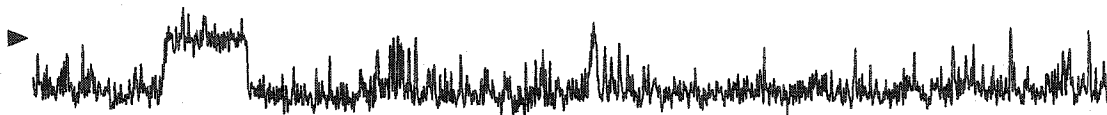
ni sur sa probabilité d'ouverture ( $P_o$ ) qui est de  $0.93 \pm 0.03$  ( $n = 3$ ) en contrôle,  $0.91 \pm 0.01$  ( $n = 3$ ) en présence de  $1 \mu\text{M}$  20-HETE *cis* et de  $0.92 \pm 0.02$  ( $n = 3$ ) avec  $3 \mu\text{M}$  20-HETE *cis* (Fig. 22C).

De plus, il a été rapporté que l'activité contracturante du 20-HETE sur les muscles lisses vasculaires implique une inhibition des canaux potassiques de type  $K_{Ca}$ . Les canaux  $K_{Ca}$  seraient bloqués indirectement par le 20-HETE par l'entremise de la PKC (Lange et al., 1997; Nowicki et al., 1997) et / ou des MAPK (Sun et al., 1999). D'autres expériences, du même type que celles décrites plus haut, ont été réalisées sur des canaux  $K_{Ca}$  des MLVR bovin pour vérifier si leur activité est modifiée directement par le 20-HETE. Comme pour les résultats obtenus sur les canaux  $Cl^-$ , les additions cumulatives de  $1.5$  et  $3 \mu\text{M}$  de 20-HETE ne modifient pas la conductance (Fig 23B) et ni la  $P_o$  (Fig. 23C) du canal  $K_{Ca}$  des MLVR de l'espèce bovine.

Ces résultats « négatifs » (Fig. 22 et 23) signifient que l'effet contracturant et dépolarisant induit par le 20-HETE ne sont pas dû à un effet direct sur l'activité des canaux  $Cl^-$  et des canaux  $K_{Ca}$  des MLVR. Si le 20-HETE devait moduler ces conductances, le mécanisme passerait par l'activation de cascades de signalisation intracellulaire qui modifierait l'activité de ces canaux ioniques.

A

Canal Cl<sup>-</sup> natif  
50/250 mM CsCl trans/cis -60 mV



+ 1 μM 20-HETE cis

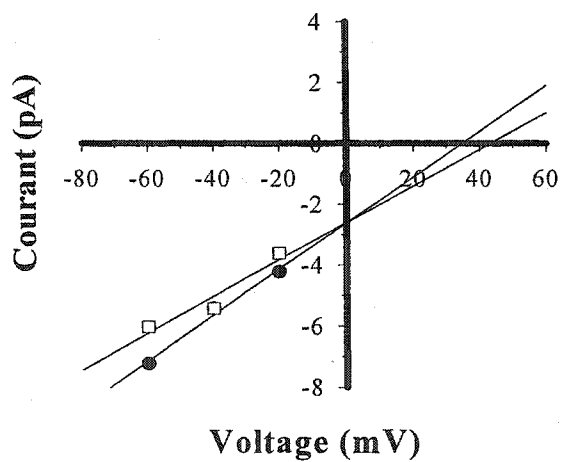


+ 3 μM 20-HETE cis

10 pA  
150 ms



B



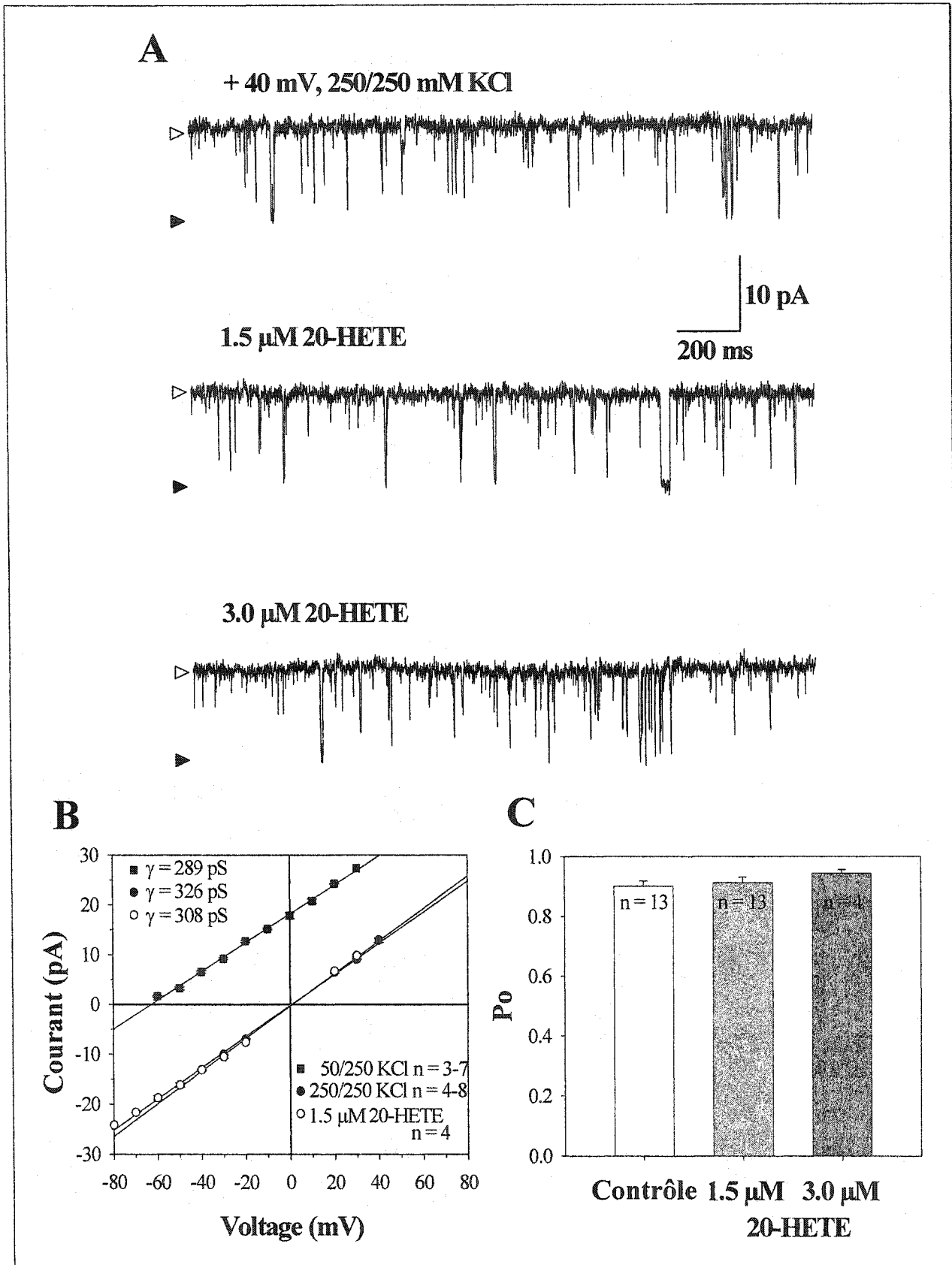
- Contrôle :  $\gamma = 77$  pS
- + 3 μM 20-HETE cis:  $\gamma = 66$  pS

C

	Po
Contrôle	$0.93 \pm 0.03$
1 μM 20-HETE	$0.91 \pm 0.01$
3 μM 20-HETE	$0.92 \pm 0.02$

**Figure 22- Le 20-HETE n'a pas d'effet direct sur l'activité du canal Cl<sup>-</sup> natif reconstitués dans des bicouches lipidiques planes.**

**A :** Enregistrements séquentiels de l'activité du canal Cl<sup>-</sup>, provenant des MLVR bovin, en condition contrôle et suite aux additions cumulatives de 1 et de 3  $\mu$ M de 20-HETE. Ces tracés ont été enregistrés à -60 mV et en condition asymétrique de 50 mM *trans* / 250 mM *cis* de CsCl. **B :** Courbes courant-voltage (*i/V*) en contrôle et en présence de 3  $\mu$ M de 20-HETE en condition asymétrique à partir de l'expérience décrite en A. **C :** Tableau comparatif des probabilités d'ouverture ( $P_o$ ) du canal Cl<sup>-</sup> natif reconstitué dans les bicouches lipidiques planes en condition contrôle et après 10 min de l'ajout de 1 et 3  $\mu$ M de 20-HETE respectivement ( $n = 3$ ). Les résultats représentent la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M.



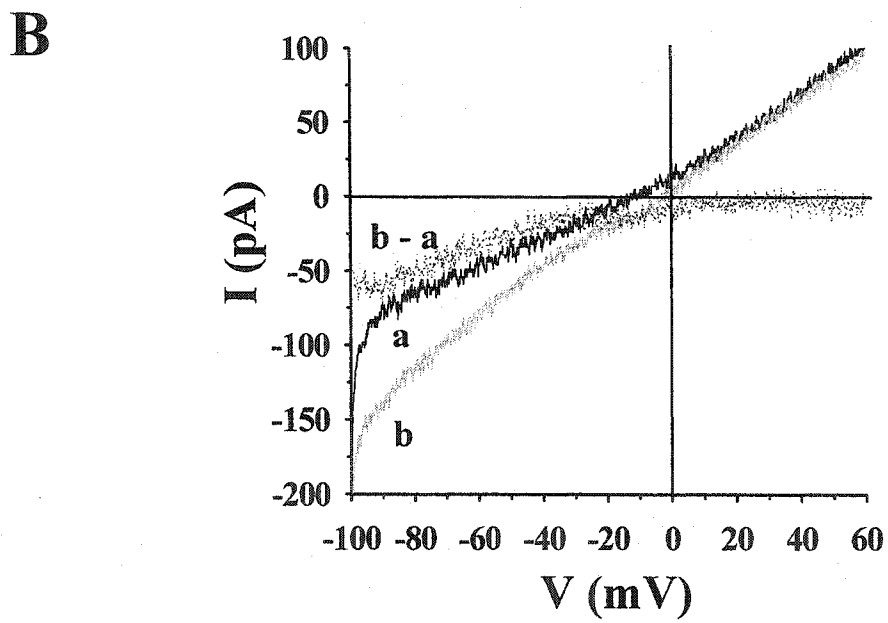
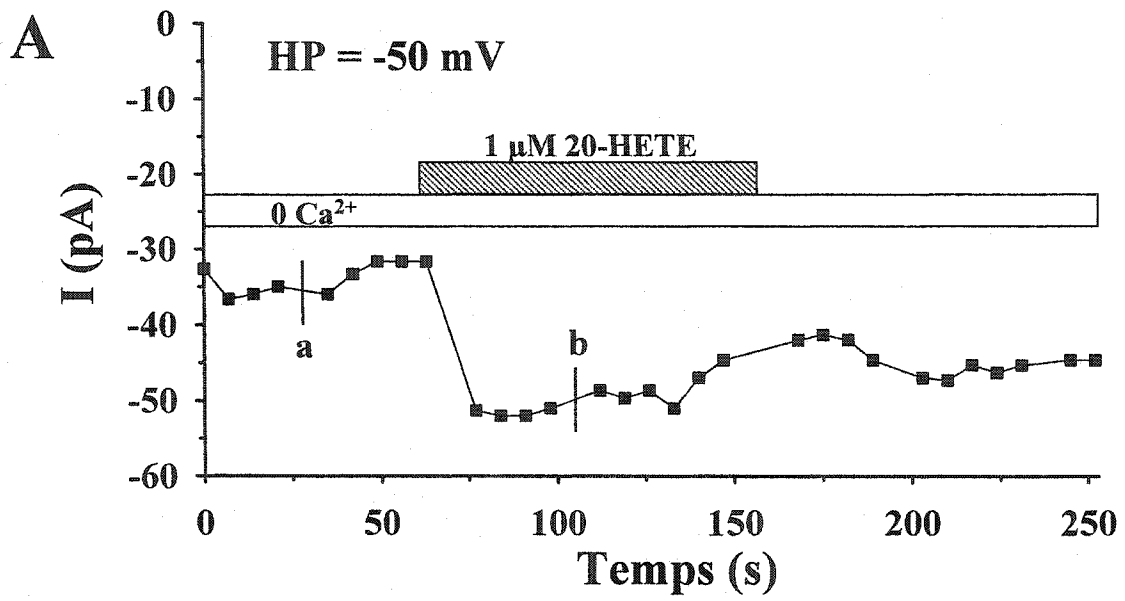


**Figure 23- Le 20-HETE n'a pas d'effet direct sur les canaux  $K_{Ca}$  natifs reconstitués dans des bicouches lipidiques planes.**

**A :** Enregistrements séquentiels de l'activité du canal  $K_{Ca}$ , provenant des MLVR bovin, en condition contrôle et suite aux additions cumulatives de 1.5 et de 3  $\mu$ M de 20-HETE. Ces tracés ont été enregistrés à +40 mV et en condition asymétrique de 50 mM *trans* / 250 mM *cis* de KCl et en présence de 10  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$  libre. **B :** Courbes courant-voltage (i/V) en condition asymétrique (50 / 250 mM KCl) et symétrique (250 / 250 mM KCl). En condition symétrique, 1.5  $\mu$ M de 20-HETE ne modifie pas la conductance du canal  $K_{Ca}$  (n = 4). **C :** Valeurs des probabilités d'ouverture ( $P_o$ ) du canal  $K_{Ca}$  en condition contrôle et en présence de 1.5 et 3  $\mu$ M de 20-HETE. Le 20-HETE ne modifie pas la  $P_o$  des canaux  $K_{Ca}$ . Ces expériences ont été réalisées par Mme Sonia Proteau et M Frédéric Mercier. Les résultats représentent la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M.

### **Le 20-HETE active un courant macroscopique cationique et non-sélectif sur les cellules isolées de cobaye**

Les expériences précédentes ont montré, par l'effet relaxant du  $Gd^{3+}$  et dépolarisant de l'OAG, que l'effet du 20-HETE sur les MLVR pourrait impliquer des conductances cationiques non-sélectifs. A l'aide de la technique de patch-clamp, nous avons testé si le 20-HETE pouvait activer un courant ionique macroscopique apparenté à ce type de conductance. Les expériences ont été réalisées sur des cellules isolées de MLVR de cobaye mises en culture primaire et en configuration « Whole Cell ». Cette configuration nous permet de mesurer des courants macroscopiques qui proviennent de l'ouverture de plusieurs canaux sur toute la surface de la cellule. Les conditions expérimentales utilisées (voir légende de la Fig. 24) nous permettent de mesurer des courants générés par les protéines formant des canaux de type TRPC. La figure 24A montre les résultats obtenus dans la configuration « Whole Cell ». En condition contrôle et à un potentiel de maintien de  $-50$  mV, il existe un courant entrant de  $-32$  pA. Ce courant est fortement augmenté par l'ajout de  $1$   $\mu$ M de 20-HETE. Le courant net, activé par le 20-HETE ( $b - a$ ), est visualisé avec l'aide d'une soustraction des courants obtenus pendant les rampes de voltage (de  $-100$  à  $+60$  mV) effectuées pendant la perfusion avec  $1$   $\mu$ M de 20-HETE ( $I_b$ ) moins celle en contrôle ( $I_a$ ) (voir Fig. 24 A et B) :  $I_{b-a} (20-HETE) = I_b (total) - I_a (contrôle)$ . Ce courant net, activé par le 20-HETE, ressemble à celui généré par l'activation de canaux de type TRPC et possède un potentiel d'inversion proche de  $0$  mV; ce qui atteste de sa non-sélectivité en condition biophysiques asymétriques.

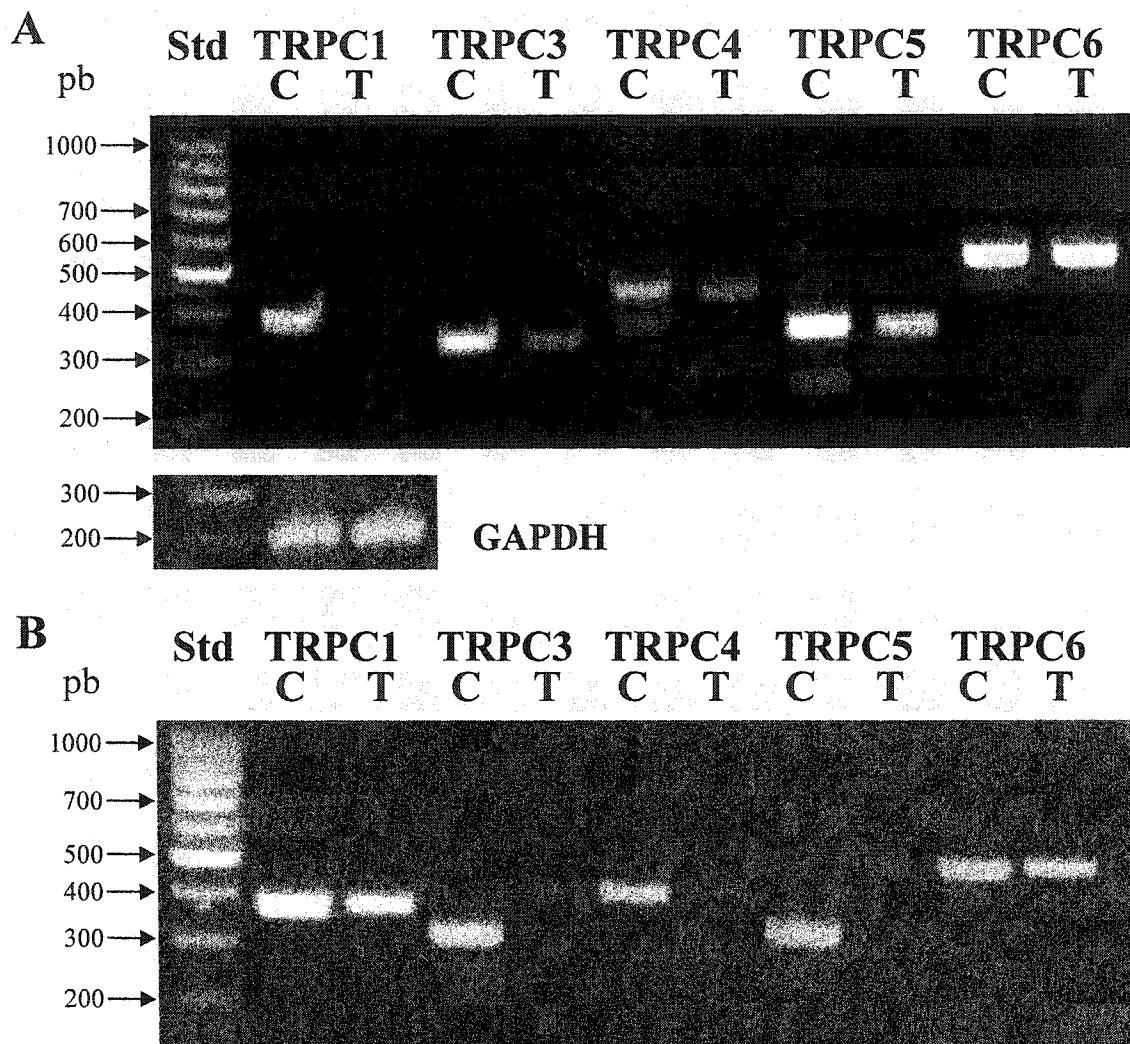


**Figure 24- Activation par le 20-HETE d'un courant entrant non-sélectif et expression des TRPC dans les MLVR de cobaye.**

**A** : Enregistrement d'un courant macroscopique de fond entrant par la technique de patch-clamp en configuration « Whole Cell ». En condition contrôle (-50 mV et sans agent pharmacologique) le courant est de l'ordre de -30 pA. Après l'ajout de 1  $\mu$ M de 20-HETE dans la solution de perfusion sur une cellule de MLVR de cobaye, le courant macroscopique augmente à -51 pA. **B** : Des rampes de voltage, de -100 à +60 mV, ont été réalisées en condition contrôle (a) et en présence de 1  $\mu$ M de 20-HETE ajouté dans la solution de perfusion (b) à partir de l'enregistrement de la figure A. La solution intracellulaire utilisée est composée de (en mM) : 140 CsAsp, 1 CaCl<sub>2</sub>, 11 EGTA, 2 MgCl<sub>2</sub>, 18 NaCl, 10 HEPES, 0.3 ATP et 0.03 GTP, pH 7.2 (concentration de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> libre calculé est de 100 nM). La solution dans laquelle baigne les cellules est composée de (en mM) : 140 NaCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 15 HEPES, 10 glucose, pH 7.4. La solution de perfusion, où une concentration final de 1  $\mu$ M de 20-HETE est additionné, est composée de (en mM) : 145 NaCl, 2.5 EGTA, 5 HEPES, pH 7.4. Le courant entrant net induit par 1  $\mu$ M de 20-HETE a été obtenu de la soustraction du courant b avec le courant a (b - a). Les expériences des figures **A** et **B** sont représentatifs de trois expériences différentes et ils ont tous été réalisées par le Dr Nuria Basora.

### **Mise en évidence de l'expression de l'ADNc des TRPC dans les MLVR.**

Les résultats de l'expérience précédente (Fig. 24) ont montré que le 20-HETE active un courant ionique macroscopique qui est cationique et non-sélectif qui pourrait être généré par des canaux de type TRPC. Une analyse par RT-PCR a été réalisée pour déterminer si des molécule d'ARNm correspondant aux protéines des TRPC sont exprimées dans les cellules de MLVR de cobaye. La figure 25A montre le résultat du RT-PCR obtenue par la migration des ADNc correspondant aux TRPC1, 3, 4, 5 et 6 sur un gel d'agarose 2% avec 0.1 µg/ml de EtBr. Le résultat montre que les ARNm des TRPC3, 4, 5 et 6 sont exprimés dans les cellules de MLVR de cobaye tandis que celui du TRPC1 ne l'est pas. De plus, une autre analyse du même type que celle de la figure 25A a aussi été faite sur la trachée de rat. La Figure 25B montre que les ARNm des TRPC 1, 3, 4, 5 et 6 sont exprimé dans les MLVR de rat. Ces résultats tendent à montrer que l'activation des conductances cationiques non-sélectives par le 20-HETE pourrait être supportée par l'activation de canaux de type TRPC 3, 4, 5 et/ou 6 dont le l'ARNm est exprimé dans ces cellules. Toutefois, d'autres expériences devront être réalisées pour démontrer que ces canaux sont impliqués dans la phase tonique de l'effet inotrope positif induit par le 20-HETE sur les MLVR de cobaye.



**Figure 25- Expression des ARNm de différents TRPC provenant des cellules isolées de MLVR de cobaye et de rat.**

**A :** Analyse par RT-PCR réalisée à partir de l'ARN total des cellules isolées du MLVR des trachées de cobaye (T) et de cerveau de rat (C) en guise de contrôle. Les ARNm des TRPC3, 4, 5 et 6 sont exprimés. **B :** Analyse par RT-PCR réalisée à partir de l'ARN total des cellules isolées du MLVR des trachées (T) et de cerveau de rat (C) en guise de contrôle. Les ARNm des TRPC1, 3, 4, 5 et 6 sont exprimés. Les ADNc des figures A et B ont migré sur des gels d'agarose de 2% contenant 0.1 µg/ml de bromure d'éthidium (EtBr). Les amorces utilisées sont spécifiques au TRPC1, 3, 4, 5 et 6 puis au GAPDH utilisé en contrôle. Paire de base (pb).

## Discussion

Nos résultats ont permis de démontrer que le 20-HETE a des effets inotropes positifs sur les MLVR de cobaye et qu'il induisait le raccourcissement des cellules isolées des muscles lisses de trachée de chien, de rat et de cobaye. De plus, cet effet impliquerait une contribution séquentielle du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et extracellulaire par des activations combinées de conductances cationiques non-sélectives et de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L. La présente étude vient donc approfondir les connaissances sur les mécanismes par lesquels le 20-HETE induit ces effets inotropes positifs sur les MLVR à partir de résultats obtenus lors de mesures mécaniques, électrophysiologiques et biochimiques.

### Effet du 20-HETE sur la tension mécanique

Les mesures de tension isométrique, entreprises sur le MLVR de cobaye ont permis de quantifier les effets du 20-HETE exogène sur la tension mécanique. Cet eïcosanoïde induit une contraction des MLVR de cobaye 100% réversible en présence comme en absence de cellules épithéliales. Ces observations confirment celles qui ont été rapportées par Zeldin et al (1995). De plus, l'amplitude de contraction est dépendant de la concentration du 20-HETE utilisée. Cet effet inotrope positif est indépendant de l'épithélium parce que le 20-HETE induit également un raccourcissement des cellules isolées du MLVR de chien (Fig. 16), de rat et de cobaye mises en culture primaire. Par contre sur les MLVR de lapin, l'effet relaxant du 20-HETE serait dépendant d'un tissu épithélial intact (Jacobs et al., 1999). Dans le champ de vision couvert par l'objectif, les cellules isolées de MLVR ne se sont pas toutes raccourcies par l'ajout du 20-HETE (Fig. 16). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que certaines de ces cellules seraient dans un état

physiologique différent et/ou par une expression différentielles de récepteurs membranaires de certaines cellules dû fait de leurs mises en culture.

Une valeur de  $EC_{50}$  a été déterminée à  $1.5 \mu\text{M}$  à partir de la courbe dose-réponse obtenue *in vitro* par l'ajout de 20-HETE exogène. Cependant ce résultat ne permet pas de conclure sur les effets du 20-HETE endogène en condition physiologique. Deux études ont tenté de quantifier la concentration de 20-HETE endogène contenue dans les cellules. Au niveau des reins de lapin par exemple, la quantité d'HETEs (16-, 17-, 18-, 19- et 20-HETE) estérifiés aux lipides membranaires, est de  $34.40 \text{ ng/g}$  de tissus dans le cortex et de  $22.76 \text{ ng/g}$  de tissus dans la médulla (Carrol et al., 1997). Le deuxième article a montré que, dans une culture de plaquette humaine, la quantité de 20-HETE endogène libérée par la  $PLA_2$  est de  $9.7 \text{ fmol}/10^6$  cellules (Zhu et al., 1995). Cependant, les résultats de ces études ne fournissent pas d'information sur la concentration de 20-HETE contenue dans le milieu interstitiel. Il serait donc important de pouvoir mesurer la concentration ou les variations de concentration du 20-HETE contenue dans le liquide bioactif du milieu interstitiel.

De plus, un coefficient de Hill (nH) de 0.77 a été déterminé à l'aide de la courbe dose-réponse et de l'équation 2. Ce coefficient est généralement utilisé pour estimer le nombre de molécule d'un ligand qui est requis pour permettre l'activation du récepteur et induire un effet fonctionnel. Le chiffre 0.77 ( $\approx 1$ ) suggère qu'un récepteur par lequel le 20-HETE induit un effet inotrope positif est présent sur les MLVR de cobaye. De plus, ce récepteur pourrait être localisé dans la membrane plasmique ou bien dans le cytosol.



Néanmoins, la présence d'un récepteur spécifique au 20-HETE reste encore un sujet de débat pour différentes raisons : les expériences de liaison spécifique sont difficile à réaliser car, comme dans le cas des EETs (Bernstrom et al., 1992), les propriétés hydrophobes de ces ligands induisent un très haut niveau de liaison non-spécifique. Par contre, des antagonistes comme le 5-HETE, le 15-HETE, le 19-HETE et le 6(Z),15(Z)-20-HEDE (WIT-002) qui sont des analogues au 20-HETE, bloquent complètement l'activité vasoconstrictrice des MLV d'artères cérébrales (Alonso-Galicia et al., 1999) et rénales (Gebremedhin et al., 2000) induit par le 20-HETE. Ceci suggère une existence possible d'un site de liaison spécifique au 20-HETE.

Nos avons montré que l'indométhacine diminue la tension de base des MLVR de cobaye en présence d'épithélium. Les cellules épithéliales des MLVR ont été rapporté comme étant le lieu de production d'une majorité des prostaglandines produites par les COX à partir de l'AA (Churchill et al., 1989; Eling et al., 1986). Cet effet de l'indométhacine pourrait s'expliquer par le fait que ces prostaglandines, produits par les COX, participent à la génération du tonus de base. Une de nos observations est néanmoins intrigante : l'effet inotrope positif du 20-HETE sur les MLVR de cobaye semble être dépendant de l'activité des COX car, lorsque ces enzymes sont bloquées par l'indométhacine, le 20-HETE n'a plus d'effet (Fig. 19). Sur les MLVR de lapin, le 20-HETE induit la relaxation des tissus précontractés à l'histamine ou au KCl, mais en présence d'indométhacine, cet effet relaxant est absent, montrant, aussi chez cette espèce, une dépendance de l'activité des COX (Jacobs et al., 1999). Ces résultats suggèrent que les effets inotropiques du 20-HETE sur les MLVR varient en fonction de l'espèce. Cette

variabilité pourrait s'expliquer selon le mécanisme suivant : les effets du 20-HETE sur la tonicités des tissus (MLVR) nécessitent une activité intacte des COX qui métaboliseraient le 20-HETE en des molécules qui possèderaient un effet contracturant chez le cobaye et relaxant chez le lapin. Par contre, il serait possible que l'indométhacine interagisse d'une manière compétitive avec le « récepteur » du 20-HETE qui induirait une tonicité différente des MLVR chez le cobaye (contraction) et le lapin (relaxation).

L'effet inotrope positif du 20-HETE exogène requiert très probablement une mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires. Cette augmentation provient des réserves calciques, qui sont impliquées dans la phase transitoire (Fig. 17). De plus, le  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait également venir du milieu extracellulaire. Cette entrée serait impliquée dans la phase tonique de la contraction induite par le 20-HETE tel que montrée dans la Figure 17. Le profil contractile induit par le 20-HETE sur les MLVR de cobaye, met en relation la contribution séquentielle du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et extracellulaire. Il ressemble beaucoup au profil d'une contraction muscarinique induite par une molécule comme le béthanechol (Tao et al., 2000). De plus une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans les cellules de MLVR est nécessaire pour induire et maintenir la contraction tonique qui survient suite au passage à 2.5 mM de  $\text{CaCl}_2$  dans une solution de Krebs non continue. Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le MLVR semble être dépendant de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans les réserves calciques. Ceci signifierait que cette entrée se produit d'une façon capacitative comme cela a été rapporté lors de stimulations à l'ACh (Sweeney et al. 2002).

La réponse tonique induite par le 20-HETE est partiellement relaxée après un ajout de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{GdCl}_3$  (Fig.18), une concentration utilisée pour bloquer les canaux cationiques non-sélectifs. Certains de ces canaux permettent une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire dans la cellule d'une manière non-capacitative, indépendamment de l'état des réserves calciques intracellulaires (Moneer et Taylor, 2002). La relaxation induite par le  $\text{Gd}^{3+}$  suggérerait donc le rôle éventuel de ce processus moléculaire. Dans ces conditions, l'ajout de la nifédipine, dans le bain à organe isolé, induit une relaxation du reste de la contraction induite par le 20-HETE et en présence du  $\text{Gd}^{3+}$  sur les MLVR de cobaye. Donc, lorsque les canaux cationiques non-sélectifs sont bloqués, lors de l'effet inotrope positif induit par le 20-HETE, il y aurait une participation des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant du voltage pour soutenir la contraction. Il a été rapporté que ces canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L jouent un rôle mineur dans le contrôle de la contraction des MLVR, induit par les agonistes muscariniques (Tao et al., 2000). Cependant, des expériences pharmacologiques et électrophysiologiques, sur les cellules des muscles lisses des bronches humaines et d'autres mammifères, ont démontré l'existence de ces canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dans ces préparations (Marthan et al., 1999). Une contribution des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L est plausible du fait que la nifédipine a un effet partiel sur la contraction des MLVR induite par le 20-HETE et qu'il a été rapporté que cet eicosanoïde induit une augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  suivant une activation en parallèle de ces canaux dans les MLV (Gebremedhin et al., 1998).

### **Effets électrophysiologiques du 20-HETE**

Nos résultats montrent que le 20-HETE induit une dépolarisation transmembranaire des cellules de MLVR de lapin (Fig. 20) et de cobaye qui est complètement réversible. La réponse dépolarisante des cellules au 20-HETE a également

été mesurée en absence d'épithélium chez le lapin. De plus, il a aussi été rapporté que le 20-HETE dépolarise de 10 mV les MLV d'artères rénales et basilaires de chien (Ma et al., 1993 et Obara et al., 2002 respectivement). Ces observations suggèrent donc que le 20-HETE est capable de moduler des conductances membranaires et que son mode d'action n'est pas strictement dépendant de l'épithélium; ce qui suggère des effets directs sur le MLVR. La modulation de ces conductances pourrait impliquer l'activation de canaux cationiques non-sélectifs.

Nous avons utilisé l'OAG, qui est un analogue stable du DAG et perméable à la membrane plasmique, pour déterminer si l'activation des conductances cationiques non-sélectives dépolarisait aussi la membrane des MLVR. Nos résultats ont montré que l'OAG induit une dépolarisation transmembranaire qui n'est pas entièrement réversible sur des cellules de MLVR de chien. Ceci est probablement causé par une interaction de haute affinité entre l'OAG et des composantes de la membrane plasmique des MLVR ou des systèmes enzymatiques intracellulaires (Slater et al., 2001). De plus, il a été rapporté que l'OAG, mimé par le DAG, active des conductances cationiques non-sélectives en dépolarisant aussi les membranes de surface des lymphocytes T par l'activation d'une entrée de  $\text{Na}^+$  dans un milieu ne contenant pas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette dépolarisation serait associée avec l'expression du canal TRPC6 (Gamberucci et al., 2002). Comme l'OAG induit une dépolarisation transmembranaire similaire à celle induite par le 20-HETE, nous avons postulé que cet eicosanoïde pouvait aussi induire l'activation de conductances cationiques non-sélectives, impliquant des canaux de type TRPC, susceptibles de produire une

dépolarisation qui favorise une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  et participe ainsi à l'effet inotrope positif sur les MLVR.

### **Le 20-HETE n'a pas d'effet direct sur les canaux ioniques**

Il a été rapporté, par des expériences de patch clamp en configuration « cell-attached », que le 20-HETE bloque l'activité des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  de la membrane de surface des cellules isolées de MLV d'artères cérébrales de chat (Harder et al., 1994). Nos expériences de bicouches lipidiques planes ont montré que l'application du 20-HETE directement sur les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  des MLVR reconstitués ne modifie pas leurs activités que ce soit la conductance unitaire ou la probabilité d'ouverture. Imig et al. (1996) ont rapporté que l'effet contracturant du 20-HETE sur les MLV d'artérioles rénales de rat est mimé par un blocage des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  via la TEA. Une addition de 20-HETE exogène à ces tissus n'a eu aucun effet sur le tonus vasculaire lorsque ces canaux sont bloqués par la TEA; le MLV reste contracté sans que la tension ne soit modifiée (Imig et al., 1996). De plus, Obara et al. (2001) ont montré que chez le chien, un blocage des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  par l'IbTX, la TEA et la ChTX prédispose l'artère basilaire à se contracter lors d'un étirement mécanique. Ces expériences montrent bien que le 20-HETE inhibe l'activité des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  des MLV par l'activation d'une cascade intracellulaire. Par contre, lors d'une série d'expériences réalisées par notre équipe (Benoît et al., 2001), il a été montré que 10 nM d'IbTX ne modifie pas le tonus de base des MLVR de cobaye. Ceci suggère que les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  ne participent pas au maintien du potentiel membranaire des MLVR. En conséquence, les effets électrophysiologiques et inotropes positifs du 20-HETE sur les MLVR de cobaye n'impliqueraient pas nécessairement un blocage des canaux de type  $\text{K}_{\text{Ca}}$  contrairement aux MLV (Imig et al., 1996; Obara et al., 2002).

Les canaux  $\text{Cl}^-$  des membranes plasmiques des muscles lisses, activés par une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , sont impliqués dans la génération du potentiel transmembranaire et dans le mécanisme de la dépolarisation des cellules des MLVR (Janssen 2002). Par la technique des BLP, nos expériences de reconstitution membranaire nous ont permis de montrer que le 20-HETE n'a aucun effet direct sur la conductance unitaire, ni sur la  $P_o$  des canaux  $\text{Cl}^-$  des MLVR bovin étudiés par notre équipe (Salvail et al., 1996). Ces canaux sont insensibles aux variations de concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre et proviennent de la même fraction microsomale que celle contenant les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$ . Nous avons tester le 20-HETE sur ces canaux  $\text{Cl}^-$  afin de déterminer s'il pouvait modifier leurs activités comme il a été rapporté avec l'utilisation des EETs (Salvail et al., 1998 et 2002). Il a été rapporté par notre laboratoire que les EETs, en plus de relaxer et d'hyperpolariser les MLVR (Benoît et al., 2001), diminue l'activité et bloque la conductance du canal  $\text{Cl}^-$  des MLVR de l'espèce bovine. Le 20-HETE, provenant du même précurseur des EETs, pourrait aussi modifier l'activité de ce canal, via une cascade enzymatique intracellulaire, pour induire une dépolarisation transmembranaire.

### **Modulation des courants cationiques non-sélectifs par le 20-HETE**

L'absence d'un effet pharmacologique direct du 20-HETE sur les canaux  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}_{\text{Ca}}$  ne peut donc pas expliquer les effets électrophysiologiques observés au niveau cellulaire (dépolarisation) et ou tissulaire (effet inotrope positif). Pour cette raison nous avons testé l'effet du 20-HETE pour déterminer s'il pouvait induire un courant macroscopique entrant qui est généré par des canaux de type TRPC. Une addition de 20-HETE exogène, à la solution de perfusion et sur des cellules de MLVR de cobaye,

augmente le courant macroscopique entrant en activant un courant cationique non-sélectif (Fig. 24). Il a été rapporté que ce type de courant est activé par le DAG (Hofmann et al., 1999; Venkatachalam et al., 2001) et par l'OAG (Okada et al., 1999; Hofmann et al., 1999). Une augmentation de ce courant entrant pourrait expliquer les dépolarisations transmembranaires induites par le 20-HETE et l'OAG sur les MLVR. Ces observations n'éliminent pas la possibilité que d'autres mécanismes de signalisation pharmacologiques (via les récepteurs aux eicosanoïdes) et biochimiques (via une cascade de signalisation intracellulaire) puissent être impliqués. Toutefois, elles montrent l'évidence que des eicosanoïdes, générés *in vitro* par les CYP450  $\omega$ -hydroxylase à partir de l'AA, pourrait réguler des conductances cationiques non-sélectives des membranes de surface impliquées dans le contrôle du tonus de base des MLVR. Il a été proposé puis démontré que les canaux de type TRPC sont impliqués dans le contrôle du tonus myogéniques des MLV par deux groupes indépendants (Broad et al., 1999; Welsh et al., 2002). L'équipe du Dr Brayden a montré que le canal responsable d'une activation par un étirement de la contraction des MLV est le canal TRPC6. De plus, ce groupe a récemment montré que ce canal était activé par la PLC et le DAG (Welsh et al., 2002). Par des expériences d'étirement lent « slow stretch » réalisées sur des artères basilaires canin, Obara et al. (2002) ont montré que 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Gd}^{3+}$  inhibe complètement l'effet inotrope positif induit par 100 nM de 20-HETE exogène, mais pas par le U-73122 (un inhibiteur de la PLC). Ce groupe a donc suggéré que l'activation de la contraction par la technique de l'étirement lent implique un canal qui est différent du canal TRPC6 qui s'active aussi à l'étirement de la paroi des MLV (Kirber et al., 1988; Davis et al., 1992; Langton, 1993).

Jusqu'à présent, la contribution des canaux de types TRPC et plus spécifiquement du TRPC6 n'avait pas été envisagée de façon définitive de contrôler physiologiquement le tonus des MLVR. Par contre, Snetkov et al (2001) ont postulé leurs implications à partir de l'effet bronchoconstrictif induit par le LTD<sub>4</sub>. Une implication directe du canal TRPC 6 dans le mode d'action du 20-HETE sur les cellules du MLVR est plausible dans la mesure où l'addition de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Gd}^{3+}$ , qui a été rapporté de bloquer l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  libre par une voie non-capacitative relaxe partiellement l'effet inotrope positif du 20-HETE (Moneer et Taylor, 2002; Jung et al., 2002). Nous avons aussi montré que l'OAG, qui active ces conductances cationiques non-sélectives (Hofmann et al., 1999), dépolarise aussi les MLVR comme il a été observé pour le 20-HETE. De plus, les résultats obtenues, par l'utilisation de la technique de RT-PCR, révèlent l'expression d'ARNm pour les isoformes de TRPC 3, 4, 5 et 6 dans les MLVR de rat et de cobaye.

Ces expériences, par l'effet relaxant du  $\text{Gd}^{3+}$  et dépolarisant de l'OAG, attestent donc qu'une présence entre autre du TRPC6 dans les cellules du MLVR de cobaye supporte davantage notre idée selon laquelle l'effet inotrope positif, induit par le 20-HETE sur ces tissus, pourrait passer via une activité du canal de type TRPC6.



## Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude nous ont permis de démontrer et de quantifier les effets du 20-HETE sur les MLVR de mammifère à l'aide de mesures de tension mécanique, électrophysiologiques et biochimiques. Nous avons notamment montré que le 20-HETE induit un effet inotrope positif qui est dépendant de la concentration avec une valeur de  $EC_{50}$  de 1.5  $\mu$ M. Cet effet est aboli par un prétraitement à l'indométhacine, une substance utilisée comme inhibiteur des cyclooxygénases mais qui est également connue pour interagir avec certains récepteurs aux prostaglandines. L'activation des contractions induites par le 20-HETE sur les MLVR de cobaye, semble être indépendante de l'épithélium mais elle implique une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  qui peut être décomposée en deux phases : une phase transitoire et en une composante tonique. La réponse transitoire est déclenchée par la libération du  $Ca^{2+}$  contenu dans des réserves intracellulaires, très probablement sensible à l' $InsP_3$  (Roux et al., 1998), alors que la réponse tonique, qui est soutenue, serait due à une entrée retardée de  $Ca^{2+}$  venant du milieu extracellulaire. Les conductances impliquées dans le contrôle de l'entrée de  $Ca^{2+}$  seraient des conductances cationiques non-sélectives, supportées par l'activation pharmacologique des canaux de type TRPC et les canaux  $Ca^{2+}$  de type L, dépendant du voltage et sensible aux dihydropyridines (Fig. 18). Par ailleurs, le 20-HETE n'a pas d'effet direct sur les activités des canaux  $Cl^-$  et  $K_{Ca}$  reconstitués dans les BLP. Par contre cela n'exclut pas la possibilité qu'il puisse avoir des effets indirects sur la cinétique de différents canaux par l'activation de cascades biochimiques intracellulaires, par exemple une phosphorylation dépendante de la PKC comme il a été démontré pour le canal  $K_{Ca}$  au

niveau des muscles lisses vasculaires (Imig et al., 1996; Lange et al., 1997; Obara et al., 2002).

Nos résultats sont originaux par le fait qu'ils démontrent pour la première fois que le mode d'action du 20-HETE induit une dépolarisation réversible du potentiel de membrane et une activation d'une conductance cationique non-sélective susceptible de laisser entrer des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  dans des cellules de MLVR. Cette conductance, sensible au  $\text{Gd}^{3+}$ , serait différente des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L. En conséquence, l'ajustement fin du tonus des MLVR serait placé non seulement sous le contrôle  $\beta$ -adrénergique et muscarinique, mais également sous la dépendance des EETs qui ont des effets relaxants (Benoît et al., 2001) et du 20-HETE endogène qui aurait un effet inotrope positif (Fig. 15). La production de ces eïcosanoïdes, dérivés de l'AA, pourrait varier en fonction des conditions physiopathologiques et ainsi déterminer la réactivité des MLVR lors d'épisodes immuno-inflammatoires.

## Perspectives

Nous avons réalisé plusieurs types d'expériences pour déterminer quels étaient les effets et le mode d'action du 20-HETE sur les propriétés mécaniques, électrophysiologiques et biochimiques des MLVR. Le mécanisme intracellulaire par lequel le 20-HETE induit ces effets reste à clarifier. Pour approfondir notre compréhension, il serait intéressant de déterminer quels types de CYP450  $\omega$ -hydrolases sont exprimés dans les MLVR de cobaye.

Il serait également intéressant de déterminer quels sont les métabolites du 20-HETE produits par les COX, en particulier la COX-2, qui sont impliqués dans le déclenchement de la réponse inotrope des MLVR de cobaye. Ceci pourrait être réalisé par une incubation du 20-HETE avec nos fractions cytosoliques et microsomales brutes fraîchement préparées. Cette étape devrait être suivie d'une séparation et d'une purification des produits de cette réaction pour déterminer leur identité et lesquels induisent des effets inotropes positifs. Alternativement, il serait probablement pertinent de vérifier si l'indométhacine ne modifierait pas la liaison du 20-HETE sur ses récepteurs.

Des mesures de Patch Clamp permettraient de vérifier si l'effet du 20-HETE sur les MLVR de cobaye induit l'inhibition des canaux  $K_{Ca}$  suite à l'activation des PKC comme cela a été rapporté au niveau des MLV (Lange et al., 1997 ; Sun et al., 1999 ; Obara et al., 2002). De plus l'acide cyclopiazoïque et la thapsigargin pourraient être utilisés pour vérifier si l'état des réserves calciques intracellulaires influence l'activation des conductances cationiques capacitatives ou non-capacitatives qui contrôlent l'entrée du  $Ca^{2+}$  dans les cellules des MLVR.

Une autre avenue serait d'utiliser les techniques de microspectrofluorimétrie sur des cellules isolées et mises en culture primaire pour visualiser et quantifier les variations de  $[Ca^{2+}]_i$  provoquées par l'activation des récepteurs au 20-HETE qui à ce jour reste évanescents.

## Remerciements

Je tiens à remercier grandement le Dr Éric Rousseau, professeur au département de Physiologie et Biophysique, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ses connaissances très larges dans ces disciplines ont grandement contribué à ma formation académique et scientifique.

Je remercie également les professeurs Paul C. Pape et Pierre Larivée pour avoir accepté d'évaluer ce travail de recherche fondamentale.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé de près où de loin dans la réalisation cette étude. En particulier le Dr Alain Cadieux qui m'a souvent fait part de ses commentaires scientifiques et techniques. Je remercie aussi les membres de son équipe : Mme Solange Cloutier et Charles Cuerrier qui m'ont appris à préparer les tissus de cobaye et à réaliser les mesures de tension mécanique.

Je remercie tous les membres de l'équipe du Bilarium en particulier Guy Page et Luc Picard, mes deux compagnons de travail qui m'ont encouragé et supporté tout au long de ma maîtrise et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir. Je tiens à remercier tout spécialement Mme Sonia Proteau pour m'avoir fait profiter de ses nombreux conseils et initier au bon fonctionnement d'un laboratoire.

Je tiens également à souligner le support indéfectible de tous les membres de ma famille, en particulier mes parents Claude, Lucille et mon frère Rémi. Ils m'ont toujours encouragé et supporté autant dans ma vie personnelle que dans la poursuite de mes études universitaires.

Je remercie les Instituts Canadiens de Recherche en Santé pour leur support financier à travers les subventions MT-15373 et MOP-57677.

## Bibliographie

**Adelroth E, Morris MM, Hargreave FE and O'Byrne PM.** Airway responsiveness to leukotrienes C4 and D4 and to methacholine in patients with asthma and normal controls. *N Engl J Med* 315: 480-484, 1986.

**Alonso-Galicia M, Falck JR, Reddy KM and Roman RJ.** 20-HETE agonists and antagonists in the renal circulation. *Am J Physiol* 277: F790-F796, 1999.

**Amedee T, Large WA and Wang Q.** Characteristics of chloride currents activated by noradrenaline in rabbit ear artery cells. *J Physiol* 428: 501-516, 1990.

**Barany M.** Biochemistry of Smooth Muscle Contraction. Academic Press, 1996.

**Barnes PJ.** Clinical studies with calcium antagonists in asthma. *Br J Clin Pharmacol* 20 Suppl 2: 289S-298S, 1985.

**Barnes PJ.** Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci* 52: 521-527, 1993.

**Barnes PJ.** Pharmacology of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 30: S123-S132, 1998.

**Baron A, Deval E, Salinas M, Lingueglia E, Voilley N and Lazdunski M.** Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. *J Biol Chem* 277: 50463-50468, 2002.

**Benchekroun M, Fournier A, St Pierre S and Cadieux A.** Inhibitory action of neuropeptide Y on agonist-induced responses in isolated guinea pig trachea. *Eur J Pharmacol* 216: 421-428, 1992.

**Benoit C, Renaudon B, Salvail D and Rousseau E.** EETs relax airway smooth muscle via an EpDHF effect: BK(Ca<sup>2+</sup>) channel activation and hyperpolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L965-L973, 2001.

**Bernstrom K, Kayganich K, Murphy RC and Fitzpatrick FA.** Incorporation and distribution of epoxyeicosatrienoic acids into cellular phospholipids. *J Biol Chem* 267: 3686-3690, 1992.

**Birks EK, Bousamra M, Presberg K, Marsh JA, Effros RM and Jacobs ER.** Human pulmonary arteries dilate to 20-HETE, an endogenous eicosanoid of lung tissue. *Am J Physiol* 272: L823-L829, 1997.

**Bokemeyer D, Friedrichs U, Backer A, Kramer HJ and Meyer-Lehnert H.** Cyclosporine A enhances total cell calcium independent of Na-K-ATPase in vascular smooth muscle cells. *Clin Investig* 72: 992-995, 1994.

**Bourreau JP, Kwan CY and Daniel EE.** Distinct pathways to refill ACh-sensitive internal Ca<sup>2+</sup> stores in canine airway smooth muscle. *Am J Physiol* 265: C28-C35, 1993.

**Brann MR, Ellis J, Jorgensen H, Hill-Eubanks D and Jones SV.** Muscarinic acetylcholine receptor subtypes: localization and structure/function. *Prog Brain Res* 98: 121-127, 1993.

**Broad LM, Cannon TR and Taylor CW.** A non-capacitative pathway activated by arachidonic acid is the major  $Ca^{2+}$  entry mechanism in rat A7r5 smooth muscle cells stimulated with low concentrations of vasopressin. *J Physiol* 517 ( Pt 1): 121-134, 1999.

**Cadieux A, Lanoue C, Sirois P and Barabe J.** Carbamylcholine- and 5-hydroxytryptamine-induced contraction in rat isolated airways: inhibition by calcitonin gene-related peptide. *Br J Pharmacol* 101: 193-199, 1990.

**Carroll MA, Balazy M, Huang DD, Rybalova S, Falck JR and McGiff JC.** Cytochrome P450-derived renal HETEs: storage and release. *Kidney Int* 51: 1696-1702, 1997.

**Churchill L, Chilton FH, Resau JH, Bascom R, Hubbard WC and Proud D.** Cyclooxygenase metabolism of endogenous arachidonic acid by cultured human tracheal epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 140: 449-459, 1989.

**Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N and Knopf JL.** A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA<sub>2</sub> contains a  $Ca^{2+}$ -dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 65: 1043-1051, 1991.

**Corompt E, Bessard G, Lantuejoul S, Naline E, Advenier C and Devillier P.** Inhibitory effects of large  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel blockers on beta-adrenergic- and NO-donor-mediated relaxations of human and guinea-pig airway smooth muscles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357: 77-86, 1998.

**Darby PJ, Kwan CY and Daniel EE.** Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in  $\text{Ca}^{2+}$  handling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1226-L1235, 2000.

**Davis MJ, Donovitz JA and Hood JD.** Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 262: C1083-C1088, 1992.

**Dennis EA, Rhee SG, Billah MM and Hannun YA.** Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J* 5: 2068-2077, 1991.

**Dumoulin M, Salvail D, Gaudreault SB, Cadieux A and Rousseau E.** Epoxyeicosatrienoic acids relax airway smooth muscles and directly activate reconstituted  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels. *Am J Physiol* 275: L423-L431, 1998.

**Eling TE, Danilowicz RM, Henke DC, Sivarajah K, Yankaskas JR and Boucher RC.** Arachidonic acid metabolism by canine tracheal epithelial cells. Product formation and relationship to chloride secretion. *J Biol Chem* 261: 12841-12849, 1986.

**Farley JM and Miles PR.** Role of depolarization in acetylcholine-induced contractions of dog trachealis muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 201: 199-205, 1977.



**Fish JE.** Calcium channel antagonists in the treatment of asthma. *J Asthma* 21: 407-418, 1984.

**Fleischmann BK, Wang YX, Pring M and Kotlikoff MI.** Voltage-dependent calcium currents and cytosolic calcium in equine airway myocytes. *J Physiol* 492 ( Pt 2): 347-358, 1996.

**Gamberucci A, Giurisato E, Pizzo P, Tassi M, Giunti R, McIntosh DP and Benedetti A.** Diacylglycerol activates the influx of extracellular cations in T- lymphocytes independently of intracellular calcium-store depletion and possibly involving endogenous TRP6 gene products. *Biochem J* 364: 245-254, 2002.

**Garcia RL and Schilling WP.** Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 279-283, 1997.

**Gebremedhin D, Lange AR, Narayanan J, Aebly MR, Jacobs ER and Harder DR.** Cat cerebral arterial smooth muscle cells express cytochrome P450 4A2 enzyme and produce the vasoconstrictor 20-HETE which enhances L-type  $Ca^{2+}$  current. *J Physiol* 507 (Pt 3): 771-781, 1998.

**Gebremedhin D, Lange AR, Lowry TF, Taheri MR, Birks EK, Hudetz AG, Narayanan J, Falck JR, Okamoto H, Roman RJ, Nithipatikom K, Campbell WB and Harder DR.** Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow. *Circ Res* 87: 60-65, 2000.

**Harder DR, Gebremedhin D, Narayanan J, Jefcoat C, Falck JR, Campbell WB and Roman R.** Formation and action of a P-450 4A metabolite of arachidonic acid in cat cerebral microvessels. *Am J Physiol* 266: H2098-H2107, 1994.

**Harder DR, Narayanan J, Birks EK, Liard JF, Imig JD, Lombard JH, Lange AR and Roman RJ.** Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ Res* 79: 54-61, 1996.

**Hardy CC, Bradding P, Robinson C and Holgate ST.** Bronchoconstrictor and antibronchoconstrictor properties of inhaled prostacyclin in asthma. *J Appl Physiol* 64: 1567-1574, 1988.

**Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T and Schultz G.** Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397: 259-263, 1999.

**Holgate ST, Bradding P and Sampson AP.** Leukotriene antagonists and synthesis inhibitors: new directions in asthma therapy. *J Allergy Clin Immunol* 98: 1-13, 1996.

**Honda K, Satake T, Takagi K and Tomita T.** Effects of relaxants on electrical and mechanical activities in the guinea-pig tracheal muscle. *Br J Pharmacol* 87: 665-671, 1986.

**Hulme EC, Birdsall NJ and Buckley NJ.** Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30: 633-673, 1990.

**Hyman AL, Mathe AA, Lippton HL and Kadowitz PJ.** Prostaglandins and the lung. *Med Clin North Am* 65: 789-808, 1981.

**Imig JD, Zou AP, Stec DE, Harder DR, Falck JR and Roman RJ.** Formation and actions of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in rat renal arterioles. *Am J Physiol* 270: R217-R227, 1996.

**Jacobs ER, Effros RM, Falck JR, Reddy KM, Campbell WB and Zhu D.** Airway synthesis of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid: metabolism by cyclooxygenase to a bronchodilator. *Am J Physiol* 276: L280-L288, 1999.

**Jacobs ER and Zeldin DC.** The lung HETEs (and EETs) up. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1-H10, 2001.

**Janssen LJ.** Acetylcholine and caffeine activate  $\text{Cl}^-$  and suppress  $\text{K}^+$  conductances in human bronchial smooth muscle. *Am J Physiol* 270: L772-L781, 1996.

**Janssen LJ, Walters DK and Wattie J.** Regulation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in canine airway smooth muscle by  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange mechanisms. *Am J Physiol* 273: L322-L330, 1997.

**Janssen LJ, Hague C and Nana R .** Ionic mechanisms underlying electrical slow waves in canine airway smooth muscle. *Am J Physiol* 275: L516-L523, 1998.

**Janssen LJ.** Ionic mechanisms and  $\text{Ca}^{2+}$  regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L1161-L1178, 2002.

**Jung S, Strotmann R, Schultz G and Plant TD.** TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C347-C359, 2002.

**Khan WA, Blobe GC and Hannun YA.** Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell Signal* 7: 171-184, 1995.

**Kirber MT, Walsh JV, Jr. and Singer JJ.** Stretch-activated ion channels in smooth muscle: a mechanism for the initiation of stretch-induced contraction. *Pflugers Arch* 412: 339-345, 1988.

**Kotlikoff MI.** Calcium currents in isolated canine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 254: C793-C801, 1988.

**Kotlikoff MI and Wang YX.** Calcium release and calcium-activated chloride channels in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 158: S109-S114, 1998.

**Kunert MP, Roman RJ, Alonso-Galicia M, Falck JR and Lombard JH.** Cytochrome P-450 omega-hydroxylase: a potential  $\text{O}_2$  sensor in rat arterioles and skeletal muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1840-H1845, 2001.

**Kwan CY, Triggle CR, Grover AK, Lee RM and Daniel EE.** An analytical approach to the preparation and characterization of subcellular membranes from canine mesenteric arteries. *Prep Biochem* 13: 275-314, 1983.

**Lange A, Gebremedhin D, Narayanan J and Harder D.** 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoconstriction and inhibition of potassium current in cerebral vascular smooth muscle is dependent on activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 272: 27345-27352, 1997.

**Langton PD.** Calcium channel currents recorded from isolated myocytes of rat basilar artery are stretch sensitive. *J Physiol* 471: 1-11, 1993.

**Lee CH, Poburko D, Kuo KH, Seow CY and van Breemen C.**  $Ca^{2+}$  oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1571-H1583, 2002.

**Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A and Davis RJ.** cPLA<sub>2</sub> is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72: 269-278, 1993.

**Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL and Randall RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.

**Ma YH, Gebremedhin D, Schwartzman ML, Falck JR, Clark JE, Masters BS, Harder DR and Roman RJ.** 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries. *Circ Res* 72: 126-136, 1993.

**Mackay DJ and Hall A.** Rho GTPases. *J Biol Chem* 273: 20685-20688, 1998.

**Marieb NH.** Anatomie et physiologie humaine. ERPI, Saint-Laurent. 1993 : Chap. 23.

**Marthan R, Hyvelin JM, Roux E and Savineau JP.** Electrophysiology and calcium signalling in human bronchial smooth muscle. *Therapie* 54: 79-83, 1999.

**Mathe AA and Hedqvist P.** Effect of prostaglandins F<sub>2α</sub> and E<sub>2</sub> on airway conductance in healthy subjects and asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis* 111: 313-320, 1975.

**McCann JD and Welsh MJ.** Calcium-activated potassium channels in canine airway smooth muscle. *J Physiol* 372: 113-127, 1986.

**McGiff JC and Quilley J.** 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *Am J Physiol* 277: R607-R623, 1999.

**Miller C and Racker E.** Ca<sup>2+</sup>-induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers. *J Membr Biol* 30: 283-300, 1976.

**Moneer Z and Taylor CW.** Reciprocal regulation of capacitative and non-capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in A7r5 vascular smooth muscle cells: only the latter operates during receptor activation. *Biochem J* 362: 13-21, 2002.

**Muthalif MM, Benter IF, Karzoun N, Fatima S, Harper J, Uddin MR and Malik KU.** 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid mediates calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12701-12706, 1998.

**Muthalif MM, Karzoun NA, Gaber L, Khandekar Z, Benter IF, Saeed AE, Parmentier JH, Estes A and Malik KU.** Angiotensin II-induced hypertension: contribution of Ras GTPase/Mitogen- activated protein kinase and cytochrome P450 metabolites. *Hypertension* 36: 604-609, 2000.

**Nixon GF, Mignery GA and Somlyo AV.** Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 15: 682-700, 1994.

**Nowicki S, Chen SL, Aizman O, Cheng XJ, Li D, Nowicki C, Nairn A, Greengard P and Aperia A.** 20-Hydroxyeicosa-tetraenoic acid (20 HETE) activates protein kinase C. Role in regulation of rat renal  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. *J Clin Invest* 99: 1224-1230, 1997.

**Obara K, Saito M, Yamanaka A, Uchino M and Nakayama K.** Involvement of different activator  $Ca^{2+}$  in the rate-dependent stretch-induced contractions of canine basilar artery. *Jpn J Physiol* 51: 327-335, 2001.

**Obara K, Koide M and Nakayama K.** 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid potentiates stretch-induced contraction of canine basilar artery via PKC $\alpha$ -mediated inhibition of  $K_{Ca}$  channel. *Br J Pharmacol* 137: 1362-1370, 2002.

**Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K and Mori Y.** Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7.  $Ca^{2+}$ -permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 274: 27359-27370, 1999.

**Pacaud P and Bolton TB.** Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells. *J Physiol* 441: 477-499, 1991.

**Pfizer G.** Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 91: 497-503, 2001.

**Piomelli D.** Arachidonic acid in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 5: 274-280, 1993.

**Rao GN, Baas AS, Glasgow WC, Eling TE, Runge MS and Alexander RW.** Activation of mitogen-activated protein kinases by arachidonic acid and its metabolites in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269: 32586-32591, 1994.



**Roman RJ.** P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev* 82: 131-185, 2002.

**Roux E, Molimard M, Savineau JP and Marthan R.** Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 31: 349-356, 1998.

**Salvail D, Alioua A and Rousseau E.** Functional identification of a sarcolemmal chloride channel from bovine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* 271: C1716-C1724, 1996.

**Salvail D, Dumoulin M and Rousseau E.** Direct modulation of tracheal Cl<sup>-</sup> channel activity by 5,6- and 11,12- EET. *Am J Physiol* 275: L432-L441, 1998.

**Salvail D, Cloutier M and Rousseau E.** Functional reconstitution of an eicosanoid-modulated Cl<sup>-</sup> channel from bovine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C567-C577, 2002.

**Savaria D, Lanoue C, Cadieux A and Rousseau E.** Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle. *Am J Physiol* 262: L327-L336, 1992.

**Shen S, Huang Y and Bourreau JP.** Efficacy of muscarinic stimulation and mode of excitation-contraction coupling in bovine trachealis muscle. *Life Sci* 67: 1833-1846, 2000.

**Slater SJ, Seiz JL, Stagliano BA, Cook AC, Milano SK, Ho C and Stubbs CD.** Low- and high-affinity phorbol ester and diglyceride interactions with protein kinase C: 1-O-

alkyl-2-acyl-sn-glycerol enhances phorbol ester- and diacylglycerol-induced activity but alone does not induce activity. *Biochemistry* 40: 6085-6092, 2001.

**Snetkov VA, Hapgood KJ, McVicker CG, Lee TH and Ward JP.** Mechanisms of leukotriene D4-induced constriction in human small bronchioles. *Br J Pharmacol* 133: 243-252, 2001.

**Somlyo AP and Somlyo AV.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372: 231-236, 1994.

**Somlyo AP and Somlyo AV.** Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522 Pt 2: 177-185, 2000.

**Stephens NL.** The mechanics of isolated airway smooth muscle. In airway dynamics, ed. par Boujuys A, Thomas CC, Springfield, 1970.

**Stephenson AH, Sprague RS, Weintraub NL, McMurdo L and Lonigro AJ.** Inhibition of cytochrome P-450 attenuates hypoxemia of acute lung injury in dogs. *Am J Physiol* 270: H1355-H1362, 1996.

**Sun CW, Falck JR, Harder DR and Roman RJ.** Role of tyrosine kinase and PKC in the vasoconstrictor response to 20-HETE in renal arterioles. *Hypertension* 33: 414-418, 1999.

**Sweeney M, McDaniel SS, Platoshyn O, Zhang S, Yu Y, Lapp BR, Zhao Y, Thistlethwaite PA and Yuan JX.** Role of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in bronchial contraction and remodeling. *J Appl Physiol* 92: 1594-1602, 2002.

**Tao L, Huang Y and Bourreau JP .** Control of the mode of excitation-contraction coupling by  $\text{Ca}^{2+}$  stores in bovine trachealis muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L722-L732, 2000.

**Venkatachalam K, Ma HT, Ford DL and Gill DL.** Expression of functional receptor-coupled TRPC3 channels in DT40 triple receptor  $\text{InsP}_3$  knockout cells. *J Biol Chem* 276: 33980-33985, 2001.

**Wang MH, Zhang F, Marji J, Zand BA, Nasjletti A and Laniado-Schwartzman M.** CYP4A1 antisense oligonucleotide reduces mesenteric vascular reactivity and blood pressure in SHR. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R255-R261, 2001.

**Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT and Brayden JE.** Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* 90: 248-250, 2002.

**Yaghi A, Webb CD, Scott JA, Mehta S, Bend JR and McCormack DG.** Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid but not cyclooxygenase- 2 metabolites contribute to the pulmonary vascular hyporeactivity in rats with acute *Pseudomonas pneumonia*. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 479-488, 2001.

**Yu M, McAndrew RP, Al Saghir R, Maier KG, Medhora M, Roman RJ and Jacobs ER.** Nitric oxide contributes to 20-HETE-induced relaxation of pulmonary arteries. *J Appl Physiol* 93: 1391-1399, 2002.

**Zeldin DC, Plitman JD, Kobayashi J, Miller RF, Snapper JR, Falck JR, Szarek JL, Philpot RM and Capdevila JH.** The rabbit pulmonary cytochrome P450 arachidonic acid metabolic pathway: characterization and significance. *J Clin Invest* 95: 2150-2160, 1995.

**Zeldin DC, Foley J, Ma J, Boyle JE, Pascual JM, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C and Wu S.** CYP2J subfamily P450s in the lung: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol* 50: 1111-1117, 1996.

**Zhu D, Bousamra M, Zeldin DC, Falck JR, Townsley M, Harder DR, Roman RJ and Jacobs ER.** Epoxyeicosatrienoic acids constrict isolated pressurized rabbit pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L335-L343, 2000a.

**Zhu D, Birks EK, Dawson CA, Patel M, Falck JR, Presberg K, Roman RJ and Jacobs ER.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction is modified by P-450 metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1526-H1533, 2000b.

**Zhu Y, Schieber EB, McGiff JC and Balazy M.** Identification of arachidonate P-450 metabolites in human platelet phospholipids. *Hypertension* 25: 854-859, 1995.

**Zou AP, Fleming JT, Falck JR, Jacobs ER, Gebremedhin D, Harder DR and Roman RJ.** Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K<sup>+</sup>-channel activity. *Am J Physiol* 270: F822-F832, 1996.